

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis funcional del gen SpDREB2A en plantas de
Solanum peruvianum y su posible papel en la defensa contra
el cáncer bacteriano”**

Tesis que presenta

Q.F.B María de Lourdes Enríquez Macías

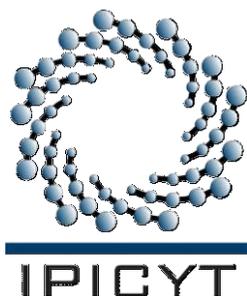
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero de 2013



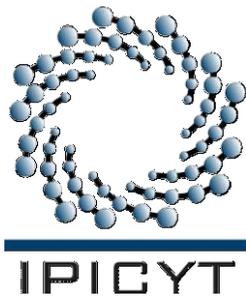
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Análisis funcional del gen SpDREB2A en plantas de *Solanum peruvianum* y su posible papel en la defensa contra el cáncer bacteriano” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María de Lourdes Enríquez Macías** y aprobada el **5 de Febrero de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Director de la tesis)

Dr. Sergio Casas Flores
(Miembro del Comité Tutorial)

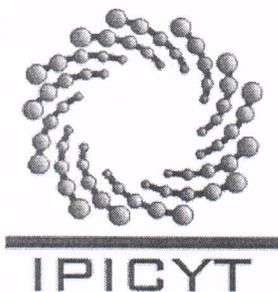
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 289863) y se contó con el apoyo del proyecto Control del Cáncer Bacteriano de Fundación Produce San Luis Potosí y FORDECYT2012-02-193512



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 106 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de febrero del año 2013, se reunió a las 18:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María de Lourdes Enríquez Macías

sobre la Tesis intitulada:

Análisis funcional del gen SpDREB2A en plantas de Solanum peruvianum y su posible papel en la defensa contra el cáncer bacteriano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de febrero de 2013.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dedicatorias

A mis padres, Juan Martín Enríquez Carlín y María de Lourdes Macías Parga, por por sus consejos, valores, por la motivación constante que me ha permitido salir adelante, pero sobre todo, por su amor.

A mis hermanos Paulina y Juan Andrés.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por todo lo que con su ejemplo, me ha enseñado.

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por sus enseñanzas, paciencia, y apoyo desde que formé parte de su grupo de trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio 1 de Biología Molecular de plantas, Mayra, Pablo, Omar, Bernardo, Rosy, Aída, Azucena, Edith, Sra. Rosy, Salvador, Vero y a todos los que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

A los Doctores Gerardo Rafael Argüello Astorga, Sergio Casas Flores, Lina Raquel Riego Ruíz, por su valiosa ayuda para completar este trabajo. También agradezco a todos los profesores que forman parte de la División de Biología Molecular del IPICYT, quienes me enseñaron las bases de esta disciplina.

Al Doctor Ramón Fernando García de la Cruz, por sus consejos.

A Lilia y Jorge Martínez por su apoyo durante estos años.

A mis amigos.

A CONACYT-SNI por el apoyo otorgado.

A todos gracias.

Contenido

Título	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de tablas suplementarias	ix
Lista de figuras	x
Lista de figuras suplementarias	x
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	14
2.1 Bacterias, virus y plantas utilizados.	14
2.2 Análisis bioinformático de la secuencia clonada en el vector ToMoV	14
2.3 Silenciamiento de genes.	15
2.4 Inoculación de la planta con el vector ToMoV.	16
2.5 Elección de la cepa de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> para infección.	17
2.6 Reto con Cmm	17
2.7 Análisis de daño en plantas.	18
2.8 Análisis de cuatro genes candidatos adicionales para clonación	18
2.8.1 Diseño de oligonucleótidos	18
2.8.2 Diseño y síntesis de los oligonucleótidos para amplificar los genes de interés	21
2.9 Diseño de oligonucleótidos a usar en RT-PCR para cuantificación de SpDREB2A.	21
2.10 Microscopia electrónica de barrido.	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1 Análisis bioinformático de la secuencia clonada en el vector ToMoV	23
3.1.1 BLAST-N	23
3.1.2 Alineamiento	23
3.2 Selección de la cepa de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Cmm para pruebas de reto	25
3.3 Efecto del silenciamiento del gen SpDREB2A mediante ToMoV, al retar plantas de <i>S. peruvianum</i> con Cmm	26
3.3.1 Fenotipos de silenciamiento	26

3.4 Niveles de expresión del gen DREB2A cuantificados por qRT-PCR, en plantas silenciadas con el vector ToMoV_SpDREB2A	36
3.5 Detección de Cmm por PCR en plantas silenciadas e infectadas	36
3.6 Área de daño en plantas silenciadas	38
3.7 Diseño de oligonucleótidos con sitios de restricción específicos para clonación en el vector ToMoV de genes candidatos adicionales a silenciar	39
4. REFERENCIAS	40
5. ANEXO	52
5.1 Extracción de ARN	52
5.2 Cuantificación de ADN y ARN.	52
5.3 RT-PCR	52
5.4 Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	53
5.5 Método de transformación mediante choque térmico.	53
5.6 Cultivo de células transformadas	54
5.7 Extracción de ADN plasmídico por el método de Birnboim (Miniprep).	54
5.8 Medio LB	55
5.9 Medio 802.	55
5.10 Preparación de soluciones	55

Lista de tablas

Título		Página
TABLA 1.	Tabla que muestra las diferentes combinaciones experimentales de plantas a silenciar con vector ToMoV y <i>Cmm</i>	15
TABLA 2.	Secuencias de genes obtenidas a partir de ADNc-AFLP para análisis mediante BLAST y claves de secuencias obtenidas en el análisis.	19

Lista de tablas suplementarias

Título		Página
TABLA S3.	Condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en la PCR.	53
TABLA S4.	Componentes de las soluciones de Birnboim (BD) Sambrook y col. (1989).	54

Lista de figuras

Título	Página
Figura 1. Alineamiento de secuencias encontradas por BLAST-N para la secuencia problema SpDREB2A.	24
Figura 2. Árbol filogenético de secuencias relacionadas con la secuencia problema (DREB2A).	25
Figura 3. Inoculación de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> con diferentes cepas de <i>Cmm</i> para prueba de virulencia <i>in vivo</i> .	26
Figura 4. Fenotipo de las diferentes combinaciones experimentales que se realizaron en la infección de plantas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. peruvianum</i> .	29
Figura 5. Colonización de la bacteria <i>Cmm</i> en un tallo de <i>S. peruvianum</i>	30
Figura 6. Scanning electron microscopy. Microfotografía de tallos de <i>Solanum</i> spp. infectados con <i>Cmm</i>	34
Figura 7. Gráfica de expresión normalizada del gen SpDREB2A en plantas de <i>S. peruvianum</i> inoculadas con ToMoV_SpDREB2A.	36
Figura 8. Gel de agarosa que muestra la amplificación de productos por PCR de <i>Cmm</i> en plantas silenciadas e infectadas.	37
Figura 9. Gráfica de porcentaje de daño de plantas de <i>S. peruvianum</i> con el gen SpDREB2A silenciado y ratadas con <i>Cmm</i> y plantas inoculadas con ToMoV Δ Cp e infectadas con <i>Cmm</i> .	38
Figura 10. Amplificación de genes para amplificación en ToMoV.	39

Lista de figuras suplementarias

Título	Página
Figura S1. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen SpOEE.	58
Figura S2. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen SpOEE.	58
Figura S3. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen SpPX1.	59
Figura S4. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen SpPX1.	60
Figura S5. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen Sptft8.	61
Figura S6. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen Sptft8.	61
Figura S7. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen SpChtB4.	62
Figura S8. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen SpChtB4.	62

Abreviaturas

VIGS	Silenciamiento génico mediado por virus
SpDREB2A	Gen DREB2A en <i>Solanum peruvianum</i>
Cmm	Clavibacter michiganensis

RESUMEN

“Análisis funcional del gen SpDREB2A en plantas de *Solanum peruvianum* y su posible papel en la defensa contra el cáncer bacteriano”

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), ofrece una alternativa rápida y atractiva para el análisis funcional de genes en plantas. Usando este sistema se puede reprimir la expresión de un gen sin la necesidad de modificar genéticamente a la planta. Se utilizan virus recombinantes que contienen una secuencia parcial del gen que se desea silenciar, para infectar a la planta de estudio. Una vez que el vector se esparce sistémicamente, los transcritos endógenos del gen a silenciar son degradados por las enzimas RISC y DICER de la planta que se activan específicamente por el transcrito del vector viral (VIGS). Este sistema es muy conveniente en el estudio de genes candidatos relacionados con mecanismos de defensa contra patógenos.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) es un patógeno bacteriano Gram-positivo que causa marchitamiento y cáncer bacteriano del tomate (*Solanum lycopersicum*), una enfermedad muy importante que produce enormes pérdidas económicas no solamente en México, sino en todo el mundo. *S. peruvianum* es una especie de tomate silvestre resistente al cáncer de tomate. Por medio del análisis de expresión diferencial de genes después del reto con *Cmm* podría identificarse genes potencialmente involucrados en la resistencia a esta enfermedad. En este trabajo, el gen SpDRE2A, involucrado en mecanismos de defensa de plantas, se evaluó para determinar si está relacionado con la defensa contra *Cmm*. Se encontró que cuando este gen se silencia en plantas de *Solanum peruvianum*, las plantas presentan un daño severo provocado por el patógeno *Cmm* y eventualmente mueren. Este resultado sugiere que este gen podría tener un rol importante en la defensa contra *Cmm* en el tomate. Como trabajo futuro, es necesario analizar la sobre-expresión del gen SpDREB2A en plantas susceptibles, para determinar si un cambio en los niveles de expresión de este gen sería suficiente para obtener una variedad de tomate comercial resistente a *Cmm* o bien, si sería necesario hacer modificaciones adicionales.

PALABRAS CLAVE: VIGS, cáncer bacteriano en tomate, SpDREB2A

ABSTRACT

“SpDREB2A gene functional analysis in *Solanum peruvianum* plants and its possible function in bacterial canker defense”

Virus-induced gene silencing (VIGS) offers an attractive and fast alternative for functional gene analysis in plants. Using this system we can down-regulate the expression of a gene without the need of genetically transform the plant. Recombinant virus carrying a host gene partial sequence to be silenced, is used to infect the plant under study. Once the viral vector is spread systemically, the endogenous gene transcripts are targeted by the transcript of VIGS vector as a post-transcriptional gene silencing process occurs mediated by DICER like and RISC enzymes. This system is very useful in the study of candidate genes related to defense mechanisms against plant pathogens. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is a Gram-positive bacterial pathogen that causes bacterial wilt and canker of tomato (*Solanum lycopersicum*), an economically important pest that produces enormous economic losses not only in Mexico, but all around the world. *S. peruvianum* is wild tomato specie with tomato canker resistance. Using differential expression analysis after challenging with *Cmm* can help to identify the possible resistance genes involved. In this work the SpDRE2A gene, involved in plant defense mechanisms, was tested to determinate if it is related to *Cmm* defense. We found that when this gene is silenced in *Cmm* resistant plants (*Solanum peruvianum*), plants get several damage caused by *Cmm* and eventually they die. That result means that this gene is probably playing an important role in tomato *Cmm* defense. Further work will need to analyze the over-expression of SpDREB2A gene in susceptible plants in order to determine if a transgenic change of this gene would be enough to get a resistant *Cmm* commercial tomato or if more modifications would be needed.

KEY WORDS:

VIGS, tomato bacterial canker, SpDREB2A

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es uno de los principales productos agrícolas en México, y el estado de San Luis Potosí genera 7.9% de la producción nacional total (SIAP 2010); sin embargo, en todo el país, la producción del tomate se ve mermada por patógenos como hongos (*Alternaria solani*), virus (Virus del Mosaico del tomate), nemátodos (*Meloidogyne incognita*) y bacterias como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, y *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, esta última causante de la enfermedad conocida como cáncer o cancro bacteriano, responsable de la pérdida (hace algunos años) de hasta 40 millones de dólares en cultivos de tomate en el país (Caerdenas et al. 2011).

No se han encontrado variedades comerciales de tomate resistentes a esta enfermedad; sin embargo, Van Heusden et al. (1999) y Coaker y Francis (2004), reportaron la existencia de especies silvestre emparentadas con el tomate que presentan resistencia natural a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Estas especies de tomate silvestre, *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, representan una alternativa viable al constituir una fuente potencial de resistencia genética compatible con la especie susceptible.

Las plantas son una fuente de nutrientes y agua para los microorganismos, los cuales pueden penetrar en ellas por heridas o aberturas naturales, como estomas o lenticelas. Sin embargo, las plantas presentan elementos estructurales que funcionan como barreras que impiden la entrada a patógenos, como la pared celular, pero ésta puede ser traspasada debido a la acción de enzimas que secretan los patógenos, por haustorios, pilis, estiletes, etc. Por esta razón un paso importante en la patogénesis bacteriana es el traspaso de proteínas de virulencia a las células vegetales. Dentro de los diferentes sistemas o tipos de secreción de proteínas de patógenos, los más importantes son los siguientes: a) Tipo II (TSII), este tipo de secreción es esencial para microorganismos con estilo de vida necrótica; esta vía usa dos pasos en la secreción, primero la exportación de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular como pectinasas, endo-glucanasas y celulasas; el segundo paso implica la acción de degradación

de la pared celular ocasionado por las enzimas, provocando posteriormente podredumbre y maceración; b) Tipo III (TTSS), este está relacionado con el flagelo bacteriano y la formación de pili que inyectan los efectores; dentro de la célula vegetal estos efectores modulan la fisiología de la planta para beneficio del patógeno y tienen diversas actividades como las de cisteína proteasa, ubiquitina-proteasa, fosfatasa, modificaciones postraduccionales, etc.. Este tipo de secreción se presenta en bacterias necrotróficas, simbióticas y biotróficas, dentro de las cuales se encuentra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. El sistema de secreción tipo IV (T4SS), tiene un papel crítico en la patogénesis de *Agrobacterium*. Este tipo de secreción media la transferencia eficiente y la integración de ADN bacteriano en el de la célula vegetal. El ADN bacteriano se inserta en el genoma del huésped e induce la producción de hormonas, lo que hace que se formen tumores o “agallas” en las plantas y se produzcan además algunas moléculas nitrogenadas como las opinas, las cuales son útiles como alimento de la bacteria. Varios patógenos requieren de múltiples sistemas de secreción. Otras moléculas de secreción actúan también como factores de virulencia, tales como hormonas vegetales, toxinas y exopolisacáridos (EPS), que promueven la enfermedad ocasionando el desarrollo de síntomas (Buchanan 2000; Abramovitch et al. 2006; Chisholm 2006; Starvrinides 2008, Zipfel 2008,).

Una vez que el patógeno ha evadido las barreras físicas, éste se encuentra con el sistema de defensa de la planta, el cual es una respuesta al ataque de un patógeno, y puede diferenciarse en dos, “basal o innata” y la “mediada por genes R”. La respuesta basal es una respuesta temprana que ocurre dentro de los primeros 40 minutos de iniciada la interacción planta-patógeno. En cambio la defensa “mediada por genes R” suele darse tardíamente, de 2 a 3 horas después de la interacción planta-patógeno o entrega de efectores. La inmunidad innata de las plantas, al igual que la de los mamíferos, involucra a proteínas de membrana de reconocimiento (PRR’s) de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP’s). Los PAMP’s son moléculas conservadas debido a que forman parte de una estructura útil para el patógeno. Esta inmunidad depende de la discriminación oportuna de lo propio y lo no propio. El reconocimiento está dado por receptores,

algunos de los cuales se caracterizan por presentar dominios repetidos ricos en leucinas (LRR) o tienen actividad de cinasas (FLS2, BAK1, EFR); otros, son proteínas de unión a membrana con peptidoglicanos unidos a dominios de lisina (Lysin Motif, LysM) como CEBiP y CERK1. El reconocimiento o percepción del patógeno en la superficie celular inicia con la activación mediada por PAMP's, esto induce la activación de la señalización de la cascada MAPK-cinasas, lo que resulta en la activación transcripcional de genes de defensa por reguladores transcripcionales específicos de plantas, incluyendo a los miembros de la familia WRKY. La respuesta de la planta mediada por genes R funciona en parte para contrarrestar la supresión causada por el patógeno de la defensa mediada por PRR's. Al ocurrir el reconocimiento de los efectores por los receptores "R", se activa la señal de defensa y al igual que la inmunidad innata, este tipo de respuesta está vinculada a la acumulación de especies reactivas de oxígeno, activación de genes, reprogramación transcripcional, y en última instancia conduce a la muerte celular programada conocida como respuesta hipersensible (HR), la cual limita la dispersión de la infección. Por otro lado, muchas proteínas "R" requieren para su función chaperonas citosólicas como HSP90 y HSC70, o co-chaperonas. También se ha reportado la translocación de proteínas "R" intracelulares dentro del núcleo, lo cual se requiere para la activación de la respuesta inmune, dirigiendo una reprogramación transcripcional de las células del hospedero para activar la respuesta inmune. Además de la respuesta inmune de la planta, existen tres señales moleculares que pueden regular la defensa de la planta contra el ataque de patógenos. Una compleja ruta de señalización inducida por hormonas, ácido salicílico (SA), etileno (Et) y ácido jasmónico (JA), regulan una resistencia sistémica y local para evadir a los patógenos. La ruta de defensa SA es mediada por una respuesta sistémica adquirida (SAR) la cual es activada por organismos biotrofos, principalmente; esta respuesta también es consecuencia de un incremento en los niveles de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP) y el establecimiento temprano de un estrés oxidativo por parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las rutas Et y JA son activadas por una respuesta sistémica inducida (ISR). y éstas por lo general son mutuamente

antagónicas, aunque en algunos casos pueden darse de modo simultáneo. La acumulación de hormonas fenólicas y sus derivados (SA) es importante para la resistencia a patógenos biotrofos. Las rutas JA y Et se integran a nivel de maquinaria transcripcional para inducir rutas de defensa a microorganismos necrotrofos y benéficos (Buchanan 2000; Wan y Bent 2002; Abramovitch et al. 2006; Chisholm 2006; Jones y Dangl 2006; Bent y Mackey 2007; Zipfel 2008; Panstruga 2009; Pandey 2009)

En 2011, Lara-Ávila et al., analizaron mediante cDNA-AFLP la expresión diferencial de genes de las especies resistentes al ataque de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, obteniendo 135 genes presuntamente involucrados en la resistencia a este patógeno; de estos 135 genes diferenciales detectados, se seleccionaron 12 para su validación por PCR-tiempo real. Posteriormente, Esparza-Araiza (datos no publicados) clonó algunos de estos genes en un vector de silenciamiento derivado del geminivirus Tomate Mottle Virus (ToMoV), para después analizarlos funcionalmente mediante silenciamiento en plantas de *Solanum peruvianum*, y determinar así el impacto de la ausencia de estos genes y su papel en los mecanismo de defensa cuando las plantas se retan con *Cmm*. Uno de los fragmentos génicos clonados corresponde a un factor de transcripción de tipo AP2/ERF. Esta secuencia génica se seleccionó para hacer el experimento de silenciamiento en plantas adultas de *S. peruvianum*.

El silenciamiento genético inducido por virus (VIGS) es una tecnología basada en el mecanismo de defensa antiviral de las plantas a través de la degradación de ARN de doble cadena, lo que previene la expresión del gen del que se derivó la secuencia heteróloga clonada en el vector viral. De esta manera al infectar la planta resistente de *Solanum* spp. con el vector que lleva el gen blanco, la planta presentará un fenotipo correspondiente a la pérdida de la función del gen silenciado, esperando por ello la pérdida de la resistencia a la infección bacteriana en las especies resistentes, en el caso de que el gen silenciado juegue un papel importante en la defensa (Liu et al. 2002).

En el presente trabajo se usa un vector viral de silenciamiento derivado de Tomate Mottle Virus (ToMoV) desarrollado en colaboración con el grupo del Dr.

Argüello-Astorga, empleando como gen de control de silenciamiento al gen que codifica a la magnesio quelatasa (chl), que al silenciarse causa un blanqueamiento de las hojas. Este vector se probó en varias especies de *Solanum*, para determinar su rango de hospederos, corroborando que funciona bien en *S. peruvianum* 2172 y *S. lycopersicum*. El gen del factor de transcripción con dominio AP2/ERF pertenece a una familia de genes que codifican proteínas involucradas en la regulación de vías de resistencia a patógenos; estos genes son miembros de la subfamilia de los factores de respuesta a etileno (ERF), los cuales tienen un solo dominio de unión a ADN. Los factores de transcripción juegan funciones primordiales en la transducción de señales para activar o suprimir la expresión de genes de defensa, así como en la regulación de la interacción entre las diferentes vías de señalización. Los factores de transcripción posicionados en el penúltimo paso de la cascada de señalización regulan directamente los objetivos río abajo la expresión de los genes, mediante la unión al ADN con elementos que actúan en cis en los promotores. Las respuestas y adaptaciones requieren la expresión diferencial de genes que está regulada por factores de transcripción específicos. Más de 1500 genes codifican factores de transcripción en el genoma de *Arabidopsis* por ejemplo: NAC, b-ZIP, Myb/c, WRKY y AP2/ERF (Riechmann et al. 2000).

La familia AP2/ERF ha recibido mucha atención en la década pasada. Se hipotetizó que una transferencia horizontal de una endonucleasa HNHAP2 de bacterias o virus a las plantas dió origen a la familia AP2/ERF (Magnani et al. 2004; Shigyo et al. 2006). Sakuma et al. (2002), clasificó los factores de transcripción AP2/ERF en cinco subfamilias: AP2 (APETALA2), RAV (relacionado a ABI3/VPI), DREB (proteína de unión a elemento de respuesta a deshidratación), ERF (factor de respuesta a etileno), y otros de acuerdo al número y similitud de los dominios de unión a ADN. Una variedad de genes AP2/ERF fueron identificados exitosamente e investigados en angiospermas (incluyendo mono y dicotiledóneas), gimnospermas y microorganismos (cianobacterias, ciliados y virus) (Magnani et al. 2004; Shigyo et al. 2006; Xu et al. 2008a).

Se demostró, que los factores de transcripción AP2/ERF regulan diversos procesos del desarrollo de la planta y respuestas a estrés, tales como desarrollo vegetativo y reproductivo, proliferación celular, respuestas a estrés biótico y abiótico y respuestas a hormonas vegetales (Nakano et al. 2006; Licausi et al. 2010; Sharoni et al. 2011). Por lo tanto, es importante elucidar los mecanismos implicados en la transmisión de señales de plantas sometidas a estrés para posteriormente manipular la expresión de los AP2/ERF con la intención de mejorar la resistencia a estrés de los cultivos.

DREBs y ERFs, dos grandes subfamilias de la familia AP2/ERF desempeñan un papel crucial en la regulación de las respuestas a estreses abióticos y bióticos. Por lo general, los factores de transcripción DREB activan múltiples genes que confieren tolerancia a deshidratación/ frío regulado (RD / COR), mediante la interacción con elementos DRE / CRT (a GCCGAC /) presentes en los promotores de los genes RD / COR, tales como COR15A, RD29A/COR78 y COR6.6 (Stockinger et al. 1997; Liu et al.1998; Lucas et al. 2011). Kishnaswamy et al. 2011, reportó que las proteínas DREB26 y DREB19 son transactivadores que tienen una expresión tejido específica y que participan en procesos de desarrollo de la planta así como en la señalización de estrés biótico y abiótico.

Los factores de transcripción ERF regulan directamente la expresión de los genes relacionados a patogénesis (PR) mediante la unión al ADN con la caja CCG (GCCGCC), por ejemplo: prb-1b (PR1), β -1, 3-glucanasa (PR2), quitinasa (PR3), y osmotina (PR5) (Ohme-Takagi y Shinshi 1995, Büttner y Singh 1997; Zarei et al. 2011), sin embargo, también las secuencias de flanqueo que se extienden más allá del dominio de unión AP2/ERF afectaron la actividad de unión a los elementos que actúan en cis (Tournier et al. 2003; Canella et al. 2010). Por otro lado, dos residuos de aminoácidos conservados 14Val (V) / Ala (A) (posición 14) y 19 Glu (E) / Asp (D) (posición 19) en la lámina β de los dominios AP2/ERF, juegan un papel importante en el reconocimiento de los elementos que actúan en cis (Sakuma et al. 2002). También podemos citar a la proteína de cebada DREB HvDRF1 que se une preferentemente a un elemento rico en CT [T (T / A

ACCGCCTT)], en lugar de motivo de DRE /CRT (Xue y Loveridge 2004). Otro dato reportado es que el factor de transcripción Tsi1 (Tobacco stress-induced gene1) con una secuencia homóloga al motivo de unión a ADN EREBP/AP2, puede estar involucrado como un factor de transactivación positivo en dos vías de señales de transducción separadas bajo estrés biótico y abiótico (Park et al. 2001). Cabe mencionar que el factor ERF de tabaco ORC1 requiere la presencia tanto del motivo GCC (TGCGCCC) y la caja G (GCACGTTG) en los promotores de los genes para la biosíntesis de la nicotina del tabaco para transactivación máxima (De Boer et al. 2011). Por lo tanto, es posible que diferentes factores de transcripción DREB / ERF estén implicados en la regulación de diferentes genes río abajo. Recientemente, Sun et al. (2008) reportó que TINY, un factor similar a DREB, era capaz de unirse a ambos DRE y la caja CCG con afinidad similar y podría activar la expresión de ambos el DRE y los genes de la caja CCG. Interesantemente, varias proteínas del ERF también se unen al elemento DRE / CRT además de la caja GCC *in vitro*. Además, la sobreexpresión de estos genes ERF dio lugar a una elevada expresión de los genes DRE / CRT que contienen RD / COR (revisado por Xu et al. 2008a).

Las regulaciones transcripcional y post-transcripcional desempeñan un papel esencial en la adaptación de las funciones celulares en los cambios ambientales (Saibo et al. 2009; Walley y Dehesh 2010). Se reportó que la actividad de los factores de transcripción tipo DREB-2 está sujeta a la modificación post-transcripcional o a respuestas de fosforilación. Por ejemplo, la sobreexpresión de AtDREB2A de Arabidopsis y OsDREB2A de arroz no activó los genes río abajo, en condiciones normales de crecimiento, lo que sugiere que AtDREB2A y OsDREB2A requieren modificación o activación post-traducciona (Liu et al. 1998; Dubouzet et al. 2003). Recientemente, Agarwal et al. (2007), mostró que PgDREB2A fosforilado no podía unirse a los elementos DRE / CRT. Sakuma et al. (2006a), encontró que la delección de una región entre los residuos 136 y 165, con un motivo rico en Ser / Thr lleva a una forma constitutivamente activa de AtDREB2A.

Se aisló un gen DREB de trigo TaAIDFa, el cual codifica una proteína que carece de una región rica en Ser / Thr (un sitio de fosforilación putativo) en relación con TaAIDFb / c. En este caso, la sobreexpresión de TaAIDFa activó la transcripción de RD29A, COR15A y ERD10 en plantas transgénicas de Arabidopsis. Por lo tanto, los sitios putativos de fosforilación en estas proteínas tipo DREB-2, son posibles motivos para la regulación negativa (Xu et al. 2008b). Sin embargo, hasta la fecha, ningún tipo de factores DREB-2 fosforilados por una proteína cinasa Ser / Thr han sido aislados. Por lo tanto, si la región rica en Ser / Thr está implicada en la supresión de la fosforilación requiere de una investigación más rigurosa debido a la falta de pruebas. Por el contrario, la fosforilación por la proteína Ser / Thr cinasa Pto y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) BWMK1, potenciaron la actividad de unión al ADN de los ERFs Pti4 y OsEREBP1, respectivamente (Gu et al. 2000; Cheong et al. 2003).

En la actualidad, el mecanismo de transducción de señales mediado por DREB y su vía de señalización no están claros. Algunos DREBs/ERFs regulan indirectamente la expresión ya sea interactuando físicamente con otras proteínas o activando factores de transcripción. Al respecto se demostró que DBF1 interactuó con la proteína 1 que interactúa con DBF1 (DIP1), una proteína que contiene un dominio conservado de unión a ADN de cadena sencilla R3H, que mejora la actividad del promotor del maíz rab17 y controla los niveles de expresión de genes objetivo en condiciones de estrés (Saleh et al. 2006). Se ha reportado que la interacción de VvDREB de uva con el factor de transcripción ASR VvMSA en el núcleo, regula la expresión de un transportador de glucosa (Saumonneau et al. 2008). Por otro lado, se sabe que ORC1 y un factor básico hélice-vuelta-hélice (bHLH) media de forma cooperativa la biosíntesis de la nicotina elicitada por JA en el tabaco (De Boer et al. 2011). Schramm et al. (2008), encontraron que la sobreexpresión de DREB2A regula directamente la expresión de la transcripción del factor de choque térmico HsfA3 que activa la expresión de muchos genes inducibles por calor en la cascada transcripcional.

Aunque la regulación de AP2/ERFs ha sido ampliamente analizada en los últimos años, falta información sobre la regulación postraduccional. Por lo tanto, es

imperativo aislar e identificar las proteínas que interactúan entre sí, para profundizar en el mecanismo de resistencia de los factores de transcripción, por ejemplo, se demostró preliminarmente que el factor DREB W18 puede estar involucrado en la vía de la E2 ubiquitina y en la vía de transducción de señales mediada por la proteína calcio-proteína cinasa dependiente (CDPK). El CDPK recibe la señal de Ca^{2+} y activa DREB W18 que regula la expresión de los genes relacionados a estrés río abajo bajo condiciones de estrés. Cuando la planta no necesita demasiadas proteínas DREB, E2-Ub/E3 interactuaron con W18 para formar un complejo ubiquitinado que será degradado por el proteasoma 26S (Xu et al, 2008). La interacción con diferentes factores proporciona una posibilidad de que AP2/ERFs funcionen en muchos procesos biológicos. Se espera que más proteínas que interactúan entre sí sean identificadas para proporcionar una visión general de las funciones biológicas de la familia de genes AP2/ER en la transducción de señales, la regulación de genes, y la defensa en respuesta a ambientes de estrés. Estudios recientes indican que la dinámica molecular como homodimerizaciones y heterodimerizaciones específicas así como la flexibilidad modular y modificaciones postraduccionales, determinan la especificidad funcional de los factores de transcripción en la adaptación al medio ambiente (revisado por Gollack et al. 2011).

Algunos factores de transcripción pueden ser modulados por el silenciamiento post-transcripcional mediado por miRNA y la señalización de especies reactivas del oxígeno. Además la metilación del ADN, y modificaciones post-traduccionales de las histonas altamente influyen la eficiencia de la expresión de genes inducidos por estrés (revisado por Gollack et al. 2011). El entendimiento de las interacciones de distintos factores, será esencial para la ingeniería específica y eficaz para mejorar la tolerancia al estrés en las plantas; por lo tanto, la investigación en esta área es urgente.

Recientemente, se demostró que el motivo CE1-like CACCG en el promotor ABI5 se requiere para la transactivación de ABI4 en protoplastos de *Arabidopsis* (Bossi et al. 2009). Por lo tanto, ABA puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad transcripcional de DREBs, los cuales muestran una

variación en algunos motivos conservados y funciones biológicas en especies divergentes y son dicotomizadas como DREB1 y DREB2, que están involucrados por separado en las vías de transducción de señales bajo estrés abiótico (Dubouzet et al. 2003). La expresión de genes de tipo DREB1 fue específicamente inducida por el estrés por baja temperatura, en *Arabidopsis* y arroz (Liu et al. 1998; Sakuma et al. 2002; Dubouzet et al. 2003; Lucas et al. 2011). En contraste, genes de tipo DREB2, responden al estrés por deshidratación y salinidad (Liu et al. 1998.; Dubouzet et al. 2003). Por lo tanto, es posible que DREBs pertenecientes al mismo tipo muestren patrones de respuesta diferentes en virtud del estrés del medio ambiente. Existen trabajos donde genes tipo DREB1 insertados en las plantas por transformación, fueron capaces de mejorar múltiples tolerancias abióticas en cultivos agrícolas como tabaco (Kasuga et al. 2004), trigo (Pellegrineschi et al. 2004), el arroz (Dubouzet et al. 2003; Oh et al. 2005; Ito et al. 2006), crisantemo (Hong et al. 2006a, b, c), papa (Pino et al. 2008), y *korshinskii* C. (Wang et al. 2011). Los genes tipo DREB2 han sido estudiados en sólo un número limitado de especies de plantas (revisado por Agarwal et al. 2006). Por lo tanto, es necesario analizar más genes tipo DREB2A para lograr un panorama completo de la regulación DREB.

La sobreexpresión de HRD de *Arabidopsis*, un grupo de DREB IIIb (Nakano et al. 2006), mostró tolerancia a la sequía y mejoró la eficiencia del uso de agua, medida como la tasa de biomasa producida por el agua que se utilizó, mediante el mejoramiento de la asimilación fotosintética y la reducción de la transpiración de arroz bajo condiciones de invernadero normales (Karaba et al. 2007).

Diversos estudios han demostrado que el mejoramiento de la tolerancia a estrés por DREBs está asociada con eficiencia fotoquímica y la capacidad fotosintética sostenida (Savitch et al. 2005; Oh et al. 2007; Hong et al. 2009). Sin embargo, los conocimientos en cuanto a los genes relacionados con la fotosíntesis (respuestas estomales y no estomales) es todavía limitada. La sobreexpresión de varios factores de transcripción, mostraron mejoramiento en la tolerancia a estrés abiótico relacionado a parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas. Sin

embargo, pocos parámetros fotosintéticos suelen ser evaluados en condiciones naturales de campo (Saibo et al. 2009).

Como se mencionó anteriormente hay un complejo lenguaje cruzado entre etileno (ET), JA, ácido salicílico (SA), y el ácido abscísico (ABA) (McGrath et al. 2005), que resultan en interacciones antagonistas por ejemplo el SA y las vías JA, así como las vías de JA / ET y ABA, de tal forma que se puedan afinar las respuestas de defensa (Anderson et al. 2004; Takahashi et al. 2004; Kariola et al. 2005). Por consiguiente, algunos genes de defensa de plantas coordinan las pautas de inducción utilizando múltiples vías de señalización durante las respuestas de defensa. Los genes ERF integran diferentes estímulos relacionados con enfermedad y patógenos (es decir ET, JA, y SA), vías de señalización, tales como las vías de ET y JA (Gutterson y Reuber 2004). La transducción de señales de SA puede actuar antagónicamente con la vía ET / JA (León-Reyes et al. 2010; An y Mou 2011), mientras que varios ERFs son inducidos por SA, JA, o ET (Gu et al. 2000; Oñate-Sánchez y Singh 2002; Zhang et al. 2004b; Zhang et al. 2010a; Seo et al. 2010; Zarei et al. 2011).

Estos resultados indican que los ERFs pueden integrar coordinadamente la vía SA y la vía de ET / JA, pero no antagonizarlos, para modular finamente la respuesta de defensa durante el reto con patógenos. La sobreexpresión de algunos ERFs confiere resistencia a plantas transgénicas a patógenos fúngicos y bacterianos. Además, se observó resistencia a múltiples patógenos en plantas transgénicas ERF (revisado por Xu et al. 2008a). Por otro lado, algunos ERFs fueron activados por ABA (Qin col. 2004; Lee et al. 2005; Wang et al. 2004, Zhang et al. 2004a; Zhang et al. 2010a), lo que indica una vía de lenguaje cruzado entre las respuestas de estrés abiótico y biótico, aunque haya interacciones antagónicas entre las vías de ABA y la señalización de JA / ET.

Por lo tanto, los genes ERF codifican factores multifuncionales que responden a múltiples estreses, integran varias transducciones de señales y así potencialmente juegan roles duales en estrés biótico y abiótico en plantas. Estreses abióticos, tales como la sequía, la salinidad, y la congelación, activan la

expresión de algunos genes ERF de Clusters II, Va, VIb y VII (Xu et al. 2008a; Zhu et al. 2010).

Un gran desafío para la biotecnología agrícola actual es satisfacer una demanda cada vez mayor en la producción de alimentos frente a un mundo en constante aumento de la población que puede llegar a ser de más de 9 billones en 2050 (Godfray et al. 2010; Tester y Langridge 2010). Esta creciente demanda de alimentos tiene su paralelo en dramáticas pérdidas de tierras cultivables debido a la creciente gravedad de la tierra destrucción por las condiciones ambientales (Golldack et al. 2011). Las estrategias de ingeniería genética de plantas para la reprogramación celular y metabólica, parecen aumentar la eficiencia de la planta de adaptación procesos. En contraste con la mejora genética clásica, los productos de ingeniería genética están diseñados para mejorar la tolerancia por medio de la incorporación de genes específicos deseados en un organismo, limitando la transferencia de genes indeseables a partir del organismo donante. Por lo tanto, la tecnología de generar transgénicos se consideran formas eficientes y precisas para la mejora de un rasgo deseado. Los rápidos avances en la tecnología transgénica se han traducido en transformación eficiente y la generación de líneas transgénicas de un número de cultivos para mejorar rasgos como la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Los genes DREB podrían ser utilizado como candidatos para mejorar los estreses abióticos (Saibo et al. 2009; Hussain et al. 2011) y bióticos (Park et al., 2001 ; Krishnaswamy et al., 2011)

La sobre-expresión de algunos genes del ERF a partir de grupos Ia, II, V bis, y VII dió lugar a un amplio espectro de resistencia a patógenos, y tolerancia a sequía, salinidad y congelación en plantas transgénicas (Xu et al. 2008). Sin embargo, las funciones de la mayoría de DREBs o ERFs aún se desconocen. Por lo tanto, para obtener una visión general en esta área de gran potencial de impacto agronómico, es esencial identificar y caracterizar funcionalmente nuevos genes DREB / ERF. Dado que no todas las posibles funciones biológicas se pueden deducir con el uso de técnicas bioinformáticas, más genes DREB / ERF de más especies, especialmente especies silvestres, deben ser aislados y evaluarlos funcionalmente ya sea apagándolos o sobre-expresándolos. Sin embargo, la

expresión descontrolada de genes diana en ciertas plantas puede dar lugar a fenotipos enanos y la reducción de los rendimientos. Para superar el retraso del crecimiento, parece que un promotor inducible por estrés es más eficiente en la conducción de la expresión de los genes diana relacionados con el estrés en plantas transgénicas. Plantas que sobre-expresan el gen DREB mediante un promotor inducible por estrés, rd29A, en *Arabidopsis*, han demostrado tolerancia mejorada al estrés abiótico, sin comprometer el rendimiento (Kasuga et al. 2004; Pino et al. 2007).

En el presente trabajo, además, de analizar funcionalmente el silenciamiento de AP2/DREB, se seleccionaron otros 4 genes con base en la función reportada (Jasinski et al. 2002), para su clonación en un vector de silenciamiento, para análisis funcionales posteriores. También se pretende en un futuro sobre-expresar alguno de estos 4 genes y realizar un reto con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los genes a evaluar son los que codifican para las proteínas mencionadas a continuación: Endoquitinasa, que es una enzima que degrada la quitina, un polisacárido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con enlaces $\beta(1, 4)$, sobre los cuales actúan, hidrolizándolos. Peroxidasa (Perox), que funciona como mensajero secundario intercelular e intracelular induciendo la respuesta de defensa mediada por genes. Oxygen evolving enhancer (OEE), proteína que regula reacciones de desfosforilación durante la fotosíntesis. 14_3_3 que es una familia de proteínas relacionadas con procesos de señalización. Al respecto de estos 4 genes, en este trabajo, se realizó un análisis bioinformático para determinar que secuencia genética tiene mayor similitud con los fragmentos obtenidos por Lara-Ávila et al. 2011 y se diseñaron oligonucleótidos específicos para su clonación en el vector ToMoV; con esto, se pretende empezar el proceso del análisis funcional del silenciamiento de estos 4 genes en plantas adultas de *S. peruvianum*, para determinar su papel en la defensa contra *Cmm*, y de esta manera buscar alternativas en el control y manejo de esta enfermedad del tomate. Es probable que si más de un gen tiene papeles relacionados con defensa contra *Cmm*, lo ideal es generar un tomate transgénico que sobreexpresé más de uno de estos genes.

(2) PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.1 Bacterias, virus y plantas utilizados. Se utilizaron las siguientes cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* donadas por Lara-Ávila o aisladas en nuestro grupo de investigación: 1387 (Querétaro), 2966 (Irapuato), 1569 (Chiapas) y Arista (San Luis Potosí). La secuencia viral de los virus usados Tomato Mottle Virus (ToMoV) se encuentra en el GenBank NC_001938 y NC_001939. Se solicitaron semillas de *S. peruvianum* 2172 al TGRC (Tomato Genetic Resources Center, Univ of California, Davis) y *S. lycopersicum* (cv Ailsa craig).

2.2 Análisis bioinformático de la secuencia clonada en el vector ToMoV.

Mediante ADNc-AFLP, Lara-Ávila indentificó secuencias derivadas de transcritos expresados diferencialmente en tomate (*S. peruvianum*, *S. habrochaites* y *S. lycopersicum*) al ser retado con *Cmm*; por lo tanto se pensó que estas secuencias están relacionadas con la resistencia a *Cmm*. Para llevar a cabo el análisis funcional de los fragmentos aislados por Lara Ávila, se utilizó el vector ToMoV-VIGS, que se modificó en la región Cp (eliminación de 649 pb y generación de una región múltiple de clonación con los sitios: *EcoRI*, *EcoRV* y *Hind III*) e insertado en el plásmido Bluescript (Bañuelos-Hernández, no publicado). Con el fin de corroborar la funcionalidad de esta construcción de ToMoV como vector de silenciamiento, se realizó la inserción de un fragmento de 250 pb del gen de quelatasa en la región de la cápside, ya que la pérdida de función de este gen evita la síntesis de clorofila produciendo un fenotipo de blanqueamiento en la planta; una vez que se comprobó que el vector era funcional, Esparza-Araiza, aisló y clonó algunas de las secuencias encontradas por Lara-Ávila en este vector. La secuencia clonada en el vector ToMoV, que ocupa este trabajo, está descrita como homóloga de algún gen de la familia AP2/ERF (Lara-Ávila), sin embargo, se hizo una búsqueda para tener una descripción más precisa de la similitud del fragmento obtenido usando diferentes bases de datos, con lo que se pretendía interpretar de manera adecuada el fenotipo que se observe en las plantas a las

<i>S. peruvianum</i>	-	-
<i>S. peruvianum</i>	-	+
<i>S. peruvianum</i>	ToMoV_ΔCp	-
<i>S. peruvianum</i>	ToMoV_ΔCp	+
<i>S. peruvianum</i>	ToMoV_chII	-
<i>S. peruvianum</i>	ToMoV_SpDREB2A	-
<i>S. peruvianum</i>	ToMoV_SpDREB2A	+

Los tratamientos anteriores para análisis funcional, se eligieron para asegurar que el fenotipo que se obtuviera en la planta silenciada con el gen de interés (DREB2A) fuera exclusivamente por el silenciamiento del gen. Las plantas que se infectaron con el vector ToMoV_ChII, se utilizaron como control para verificar el tiempo en el que se empezó a mostrar fenotipo blanco, que indica el inicio probable del silenciamiento del gen de interés en las plantas silenciadas con el vector.

2.4 Inoculación de la planta con el vector ToMoV. Para la inoculación de la planta a silenciar con el gen DREB2A se realizó el procedimiento como se describe a continuación: los componentes con genomas híbridos ToMoV A ΔCp_DREB2A y ToMoV B fueron liberados del vector plasmídico en donde estaban clonados (pBS) usando la enzima *Apa* I. Plantas de *Solanum lycopersicum* y *Solanum peruvianum* crecidas en invernadero se inocularon con una mezcla de 1 μg del componente A y 1 μg del componente B. La inoculación se llevó a cabo usando un aparato de distribución de ADN por biobalística a baja presión (Carrillo-Trip *et al.* 2006). Para cada grupo de genomas híbridos se inoculó un grupo de 5 plantas. Las plantas inoculadas se mantuvieron en un invernadero a temperatura ambiente (en Mayo y Junio) durante 45 días después de la inoculación; en este periodo las plantas mostraron la aparición de síntomas, los cuales, fueron registrados por fotografía. El mismo procedimiento se llevó a cabo para las demás inoculaciones cambiando únicamente el componente ToMoV A

según se necesitara (ToMoV A Δ Cp como control negativo y ToMoV A Δ Cp_Ch II como positivo).

2.5 Elección de la cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* para infección. Para elegir con cuál de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con las que se cuenta en el laboratorio se infectaría a las plantas de estudio, se realizó un experimento en el cual se germinaron y crecieron 20 plantas de *S. lycopersicum*. Las cepas de *Cmm* (2966, 1569, Arista y 1387) se cultivaron en medio 802 hasta que alcanzaron una densidad de 10^5 cel/mL. Diez días después de haber germinado las plantas se les inyectó 1 mL de la suspensión con las diferentes cepas de *Cmm*; además se mezclaron las 4 cepas de *Cmm* y se inyectó un mL de esta mezcla en una planta, también se inyectaron 2 controles, uno con agua y otro con medio 802. Se observaron los síntomas 5 días post-infección, la cepa que se eligió utilizar fue la 1387 por que presentó un fenotipo de infección con *Cmm* más agresivo que las otras.

2.6 Reto con *Cmm*. Cuando se infectaron las plantas con el control positivo de silenciamiento, se observó el fenotipo de blanqueamiento aproximadamente a los 18-22 días después de la inoculación, al mismo tiempo se inocularon nuestras plantas con el gen DREB2A a silenciar; 22 días después del comienzo de este fenotipo de silenciamiento (para permitir se realice totalmente el silenciamiento en la planta problema), se realizó la extracción de ARN de las plantas inoculadas con ToMoV_ Δ cp_DREB2A, con el objetivo de confirmar el silenciamiento mediante la disminución del ARNm del gen (DREB2A); esto se realizó mediante RT-PCR. Los retos con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se realizaron 45 días después de comenzar a ver blanqueamiento en las plantas inoculadas con ToMoV_ Δ cp_chII, tal como se mencionó anteriormente, inyectando entre el tallo y la segunda rama de las plantas que se inocularon con ToMoV_ Δ cp_DREB2A y ToMoV_ Δ cp; la densidad utilizada fue de 10^5 cel/mL (A_{620} = 0.02). Después de 22 días del reto se observó que se presentaron síntomas en las plantas en las que se inoculó ToMoV_ Δ cp_DREB2A. Una planta silenciada con ToMoV_ Δ cp_DREB2A

no se retó y sirvió para corroborar si el silenciamiento *per se* de este gen no afecta la viabilidad de la planta.

2.7 Análisis de daño en plantas. El daño observado en las plantas retadas con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e inoculadas con ToMoV_Δcp_DREB2A, se cuantificó midiendo el área dañada con respecto al área total de la planta y se comparó con el daño observado en las plantas inoculadas con ToMoV_Δcp y retadas de igual forma con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Esta medición se llevó a cabo con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), y se siguió la metodología desarrollada en la Universidad de Guelph por el doctor Paul H. Goodwin.

2.8 Análisis de cuatro genes candidatos adicionales para clonación

2.8.1 Diseño de oligonucleótidos. Se realizó un análisis bioinformático para determinar cuáles son las secuencias nucleotídicas de proteínas más cercanas filogenéticamente a cada uno de los fragmentos de genes mencionados en la introducción (correspondientes a las proteínas: DREB2A, Endoquitinasa, Peroxidasa, OEE, 1433) que se amplificaron por ADNc-AFLP, y ver si existen familias de genes relacionadas, de tal forma que pudieran diseñarse oligonucleótidos para diferenciar entre componentes de la familia y tratar de obtener el ADNc completo. El análisis se realizó para los 4 genes adicionales a DREB2A mencionados, pero por cuestión de espacio de la tesis solo se muestra el análisis para el gen OEE. El procedimiento para los alineamientos fue similar para los 5 genes y se describe a continuación:

Se hizo un Blast de la secuencia obtenida por ADNc-AFLP (Tabla 2) en tres bases de datos (NCBI, Gene indices, Sol Genomics) diferentes debido a que además de los datos obtenidos en NCBI, gene índices agrupa ESTs y Sol Genomics arroja datos de Solanáceas lo que brinda datos específicos relacionados con el tomate.

TABLA 2. Secuencias de genes obtenidas a partir de ADNc-AFLP utilizadas para análisis BLAST-N y claves de secuencias obtenidas en el análisis.

Secuencia obtenida por ADNc-AFLP	Códigos de secuencias obtenidas por BLAST en las diferentes bases de datos y porcentaje de identidad
<p>>SpOEE1</p> <p>GATTGAGGGACCATTTGAAGTGTCTCCGGA TGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG AATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCAGCTT CCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTC ACTATCAAACAGCTTGTGGCAAGCGGCAAG CCAGAAAGCTTTAGTGGTGAGTTCCTTGTTG CCATCATAACAGAGGTTTCATCCTTCCTTGACC CAAAGGGACGAGGTGGATCTACTGGCTATG ACAACGCTGTTGCATTGCCTGCTGGAGGGA GAGGAGACGAGGAGGAGCTTCAGAAGGAG AACGTAAAGAACACTGCATC</p>	<p>AK319582.1 (100%), Z11999.1 (100%), HQ534294.1 (98%), AY952375.1 (97%), AY220076.1 (97%), X64349.1 (96%), X17578.1 (90%), TC235533 (87%), SGN-U268446 (97%), SGN- U450055 (96%), SGN- U511355 (90%).</p>
<p>>SpPX1</p> <p>GAAGCTGTAGAAAGGGAATGCCCTGGTGT GTTTCTTGTGCTGATATTCTTGTTTTGTCAG GTAGAGATGGTATTGTTGCTCTAGGAGGGC CACACTTTCCTCTCAAACTGGAAGAAGAGA TGGAAGAAAAGCAGAGCAGACATTCTTGA GCAACACCTCCCAGATCACAATGAAAGCAT GAGTGTGTTCTCGAAAGATTTGCTAACATT GGAATCAACACCCCTGGAGTTGTTGCCTTG CTAGGGTCACACAGTGTGGA</p>	<p>AK322518.1 (97%), AF149251.1 (91%), SGN-U268273 (96%), SGN-E701819 (97%), TC244400 (97%),</p>
<p>>Sptft8</p> <p>TAGAGGAAANGAGCAGAATGTGAAGCGGAN CCAGGGGTACCGCCAAAAGTAGAGTCANA</p>	<p>NM_001247338.1 (98%), EF371798.1 (94%),Tomato_SGNlocusID_18</p>

NCTCACCGACATTTGCAATAATATCATGACT GTGATTGATGAGCATCTGATTCCGTCATGTA CTGCTGGTGAATCAACTATGTTTTACTACAA AATGAAAGGAGATTATTATCGATATCTTGC AGAGTTCAAAACAGGTGATGACAAGAAAGA AGTTTCTGATCTGTC	_X98864 (97%), Tomato_SGNlocusID_18_SGN- U577857 (97%), TC226027 (97%).
>SpChtB4 CAATCCTGATTTAGTAGCCACAGATCCAGTT ATCTCATTCAAATCAGCTATCTGGTTCTGGA TGACCCCTCAATCACCAAAGCCTTCTTGCCA CAATGTCATCACCGGAAGATGGCAACCATC TGGTGCTGACAGAGCAGCCAATCGCCTCCC TGGATTCGGTGTGATTACAAACATCATCAAT GGTGGCCTAGAATGTGGTCGTGGCAGTGAC AGCAGGGTCCAGGA	AK322000.1 100%, U02608.1 100%, U02605.1 100%, SGN- U580366 99%, SGN-U268802 94%

OEE: SpOEE (*Solanum peruvianum* Oxigen Evolving Enhancer); 14_3_3: Shtft8 *Solanum habrochaites* 1433 protein; Peroxidasa: SpSPX1 *Solanum peruvianum* peroxidase; Endoquitinasa: SpChtB4 *Solanum peruvianum* Chitinase.

A partir de este momento, se designaron nombres diferentes para cada uno de los fragmentos de genes con base a la secuencia encontrada con mayor similitud: OEE: SpOEE; 14_3_3: Shtft8; Peroxidasa: SpSPX1 Endoquitinasa: SpChtB4 y SpDREB2A.

Se alinearon las secuencias, se identificaron codones de inicio y codones de paro y con base en esto, se recortaron según fuera necesario para un mejor alineamiento (Figs.S1-S8). Después del alineamiento se realizó un árbol filogenético para determinar la cercanía entre las secuencias de genes encontradas y tratar de predecir en que grupo se encuentra la secuencia con la que contamos.

2.8.2 Diseño y síntesis de los oligonucleótidos para amplificar los genes de interés. Se diseñaron oligonucleótidos consenso-degenerados basados en secuencias disponibles en el GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), utilizando el programa de alineamiento BioEdit® (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y en los resultados obtenidos a partir del análisis de los árboles filogenéticos realizados. Una vez diseñados los oligonucleótidos, se enviaron para su síntesis a la empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT). Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua milli “Q” estéril en campana a una concentración de 100 µM, haciéndose alícuotas a una concentración de 10 µM para utilizarse como solución de trabajo.

2.9 Diseño de oligonucleótidos a usar en RT-PCR para cuantificación de SpDREB2A. Utilizando la secuencia FN649467.1, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región diferente de DREB2B, a la obtenida por ADNc-AFLP, y usarlos después para comprobar el silenciamiento del gen en plantas de *S. peruvianum* (SpDREB2A F 5'-AGTTAGACAACGCCATTGGG-3' y SpDREB2A R 5'-TAAGCCAAAGCAGCCTCTTC-3'). Los oligonucleótidos se diseñaron en la región externa para asegurar que el silenciamiento se llevara a cabo en secuencias endógenas de la planta y que no hubiera confusión con las secuencias insertadas en el vector viral.

2.10 Microscopia electrónica de barrido. Para documentar mediante microscopia electrónica de barrido muestras de las diferentes condiciones del experimento de silenciamiento del gen SpDREB2A, se realizó de manera siguiente la preparación de muestras: Se fijaron con glutaraldehído al 3% en buffer Sörensen; se lavaron tres veces con buffer, posteriormente se sumergieron las muestras en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en buffer durante 2h, se lavaron tres veces con buffer, le siguió una deshidratación con etanol:H₂O al 30, 50, 70, 90, 95% durante 15 min en cada cambio, después lavados con etanol absoluto por 15 min, tres veces, posteriormente se trataron con óxido de propileno dos veces, se cambió por óxido de propileno una vez más y finalmente se dejaron secar. Para

observar la muestra se montaron en el equipo (Marca Cressington Modelo sputter coated 108auto) en el LINAN-IPICYT, se ionizaron y observaron.

problema; SpDREB2A se agrupa con un alto porcentaje de identidad con secuencias de *Solanum lycopersicum*, pero estas secuencias, son ESTs (*Expressed Sequence Tags*) también llamadas secuencias de bibliotecas genómicas; la secuencia completa descrita más parecida es la que corresponde a FN649467.1, de *Nicotiana tabacum*.

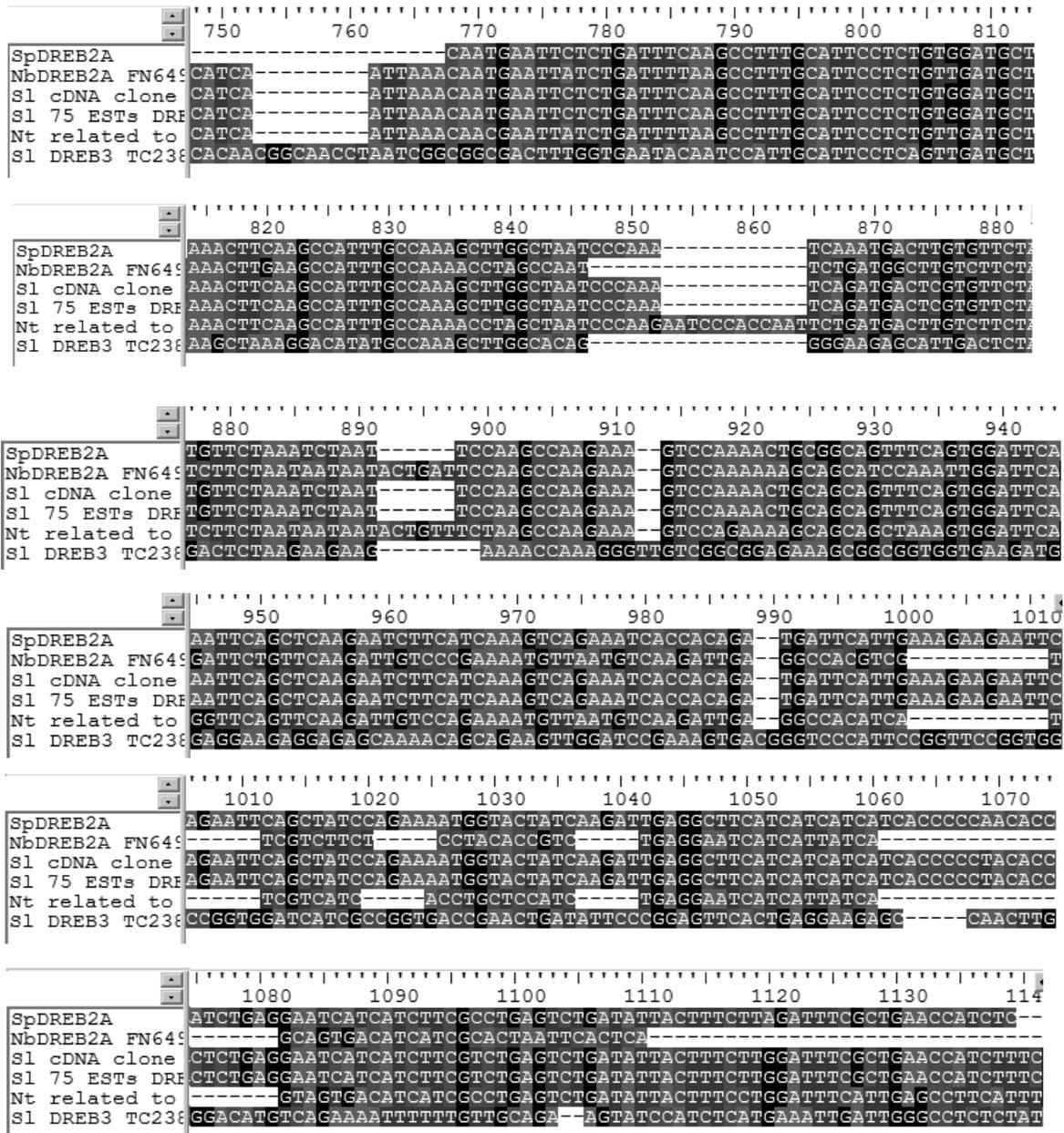


Figura 1. Alineamiento de secuencias con mayor identidad, encontradas por BLAST-N para la secuencia problema SpDREB2A. SpDREB2A: Secuencia correspondiente a DREB2A de *Solanum peruvianum*. Nb DREB2A: Secuencia

correspondiente a DREB2A de *Nicotiana benthamiana*. SI cDNA clone: Secuencia de una clona de cDNA en *Solanum lycopersicum*. SI 75 EST's DREB: Secuencia de 75 EST's agrupados correspondiente a DREB. Nt related to AP2 : Secuencia correspondiente a AP2 en *Nicotiana tabacum*. SI DREB3: Secuencia correspondiente en DREB3 en *Solanum lycopersicum*.

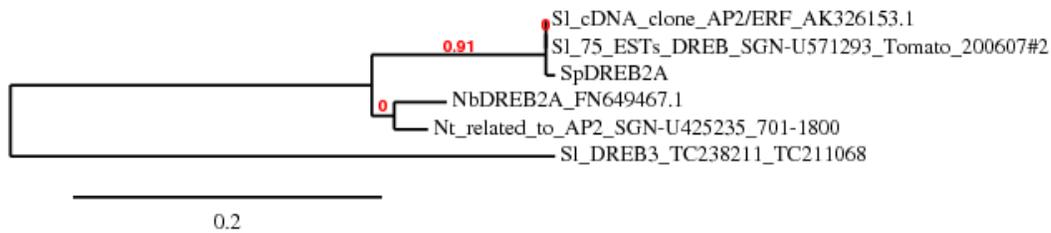


Figura 2. Árbol filogenético de secuencias relacionadas con la secuencia problema (DREB2A). SpDREB2A: Secuencia correspondiente a DREB2A de *Solanum peruvianum*. Nb DREB2A: Secuencia correspondiente a DREB2A de *Nicotiana benthamiana*. SI cDNA clone: Secuencia de una clona de cDNA en *Solanum lycopersicum*. SI 75 EST's DREB: Secuencia de 75 EST's agrupados correspondiente a DREB. Nt related to AP2: Secuencia correspondiente a AP2 en *Nicotiana tabacum*. SI DREB3: Secuencia correspondiente en DREB3 en *Solanum lycopersicum*.

3.2 Selección de la cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Cmm para pruebas de reto

En el laboratorio de Biología Molecular de Plantas se cuenta con varias cepas de *Cmm* aisladas de diferentes regiones del país. Para este ensayo probamos 4 cepas y una mezcla de las mismas para elegir a la más virulenta. Se observaron síntomas 5 días post-infección, la cepa que se eligió utilizar fue la 1387 por que presentó un fenotipo de infección con *Cmm* más virulento que las otras. En la Figura 3 se observan las plantas antes y después de la infección con *Cmm* y se observa que la planta infectada con la cepa 1387 presenta un daño severo.

A



B

Plantas de tomate con 10 días de germinación

5 DÍAS POST-INFECCIÓN CON *Cmm*

Figura 3. Inoculación de plantas de *Solanum lycopersicum* con diferentes cepas de *Cmm* para prueba de virulencia *in vivo*. Se utilizaron cepas de *Clavibacter michiganensis* 1387 (Querétaro), 2966 (Irapuato), 1569 (Chiapas) y Arista (San Luis Potosí).

3.3 Efecto del silenciamiento del gen SpDREB2A mediante ToMoV, al retar plantas de *S. peruvianum* con *Cmm*

3.3.1 Fenotipos de silenciamiento

Se observaron diferentes fenotipos en las plantas según las combinaciones experimentales a las que se sometieron. En la Figura 4A se muestra la imagen de *Solanum lycopersicum* silvestre (WT) en condiciones normales. En la Figura 4B se muestra *Solanum lycopersicum* WT 15 días después de haber sido infectada con *Cmm* (95 días después de germinar); se observa senescencia en las hojas proximales al sitio de infección, y se presenta senescencia y necrosis también en hojas distales al sitio de infección, lo que significa que la bacteria se diseminó en la planta. En la Figura 4C, se observa una planta de *Solanum peruvianum* (WT) sin retar, que presenta hojas verdes completas, de buen aspecto. Cuando se retó *Solanum peruvianum* con *Cmm* se observó que se mantiene el fenotipo sano (Figura 4D) aunque las primeras hojas presentan marchitamiento debido al

contacto directo con el fertilizante, que dañó las hojas; sin embargo, el resto de la planta no presenta daño, demostrando así resistencia a *Cmm*. Para tener la certeza de que la infección con el vector ToMoV_ΔCp no provocaría daño en la planta *per se*, se inoculó una planta de *Solanum peruvianum* con el vector ToMoV_ΔCp y no se observó diferencia en relación a la planta control (*Solanum peruvianum* WT) (Figura 4E); además, otra planta de *Solanum peruvianum* que se inoculó con el vector ToMoV_ΔCp, se infectó también con *Cmm* para verificar que el vector viral no alteraba la capacidad de resistencia a *Cmm*; el fenotipo obtenido en este caso fue una planta sana sin signos de infección (Figura 4F). En la Figura 4G, se muestra el fenotipo de una planta de *Solanum peruvianum* infectada con el vector ToMoV_ΔCp_ChII. Se demuestra que el silenciamiento del gen *ChII* (quelatasa de magnesio) resulta en la ausencia de clorofila debido a que este gen codifica un componente del complejo quelatasa de magnesio, indispensable para la síntesis de clorofila, lo que resulta en un fenotipo amarillo al inicio y posteriormente blanco (Robertson 2004).

Además de contó con un control de *Solanum peruvianum* inoculada con ToMoV_ ΔCp_SpDREB2A, pero sin retar con *Cmm*, para verificar que el silenciamiento *per se* de DREB2A no sea la causa del fenotipo de enfermedad en la planta. Se observó que el fenotipo es similar al de una planta control negativo de esta especie. En la Figura 4H, se muestra la imagen del experimento anterior, similar al control negativo (Fig. 4E), aunque con las hojas inferiores un poco marchitas por efecto del fertilizante accidentalmente depositado sobre las mismas. Finalmente, en la Figura 4I se muestra el fenotipo de una planta de *Solanum peruvianum* infectada con ToMoV_ ΔCp_SpDREB2A y retada con *Cmm*, y se observa un daño por senescencia y necrosis con origen en la región proximal al sitio de infección de *Cmm* y difusión a las hojas distales, lo cual nos indica un posible papel de DREB2A en la defensa contra *Cmm*.

<i>Solanum lycopersicum</i> WT	<i>Solanum lycopersicum</i> + <i>Cmm</i>	<i>Solanum peruvianum</i> WT
<p style="text-align: center;">A</p> 	<p style="text-align: center;">B</p> 	<p style="text-align: center;">C</p> 
<i>Solanum peruvianum</i> + <i>Cmm</i>	<i>Solanum peruvianum</i> + ToMoV_ΔCp	<i>Solanum peruvianum</i> + ToMoV_ΔCp + <i>Cmm</i>
<p style="text-align: center;">D</p> 	<p style="text-align: center;">E</p> 	<p style="text-align: center;">F</p> 

<i>Solanum peruvianum</i> + ToMoV_ ΔCp_ChII	<i>Solanum peruvianum</i> + ToMoV_ ΔCp_SpDREB2A	<i>Solanum peruvianum</i> + ToMoV_ ΔCp_SpDREB2A + <i>Cmm</i>
<p style="text-align: center;">G</p> 	<p style="text-align: center;">H</p> 	<p style="text-align: center;">I</p> 

Figura 4. Fenotipo de las diferentes combinaciones experimentales que se realizaron en la infección de plantas de *S. lycopersicum* y *S. peruvianum*. A. *Solanum lycopersicum* silvestre (WT); B. *Solanum lycopersicum* infectada con *Cmm*. C. *Solanum peruvianum* silvestre (WT); D. *Solanum peruvianum* infectada con *Cmm*; E. *Solanum peruvianum* inoculada con ToMoV_ΔCp; F. *Solanum peruvianum* inoculada con ToMoV_ΔCp e infectada con *Cmm*; G. *Solanum peruvianum* inoculada con ToMoV_ΔCp_ChII; H. *Solanum peruvianum* inoculada con ToMoV_ΔCp_SpDREB2A; I. *Solanum peruvianum* inoculada con ToMoV_ΔCp_SpDREB2A e infectada con *Cmm*.

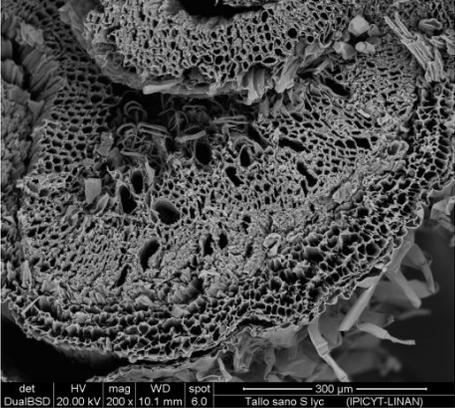
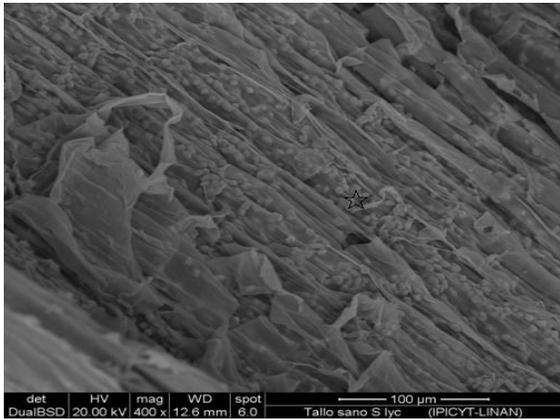
En la Figura 5 se muestra un corte longitudinal de un segmento de tallo necrosado de una planta de *S. peruviaunum* con el gen SpDREB2A silenciado, e infectada con *Cmm*, donde se observó la presencia de chancros necróticos en regiones del tallo distales al sitio de infección.



Figura 5. Colonización de la bacteria *Cmm* en un tallo de *S. peruvianum*, con el gen SpDREB2A silenciado, e infectada con *Cmm*.

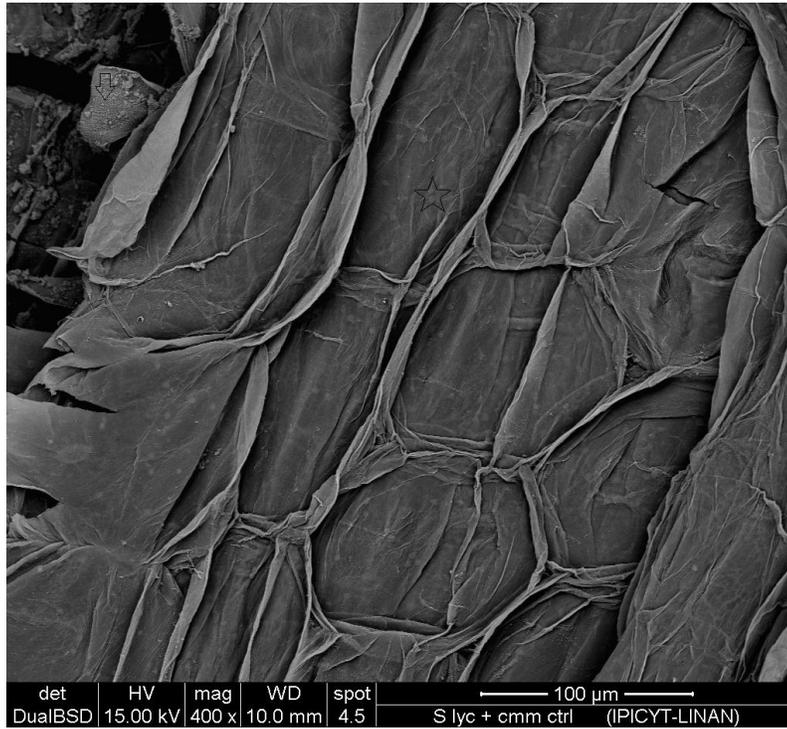
Se corroboró la presencia de la bacteria mediante microscopía electrónica de barrido como se muestra en la Fig. 6. La Figura 6A muestra una micrografía del corte transversal de un tallo de *S. lycopersicum* sin infectar, amplificada 200x, en ella se observan las estructuras de sistema de transporte de fluidos del tallo; después, en la figura 6B, se muestra un corte longitudinal del mismo tallo de *S. lycopersicum* sin infectar, amplificada 3000x donde se observan estructuras esféricas que son cloroplastos. En la figura 6C, se observa la imagen de un corte longitudinal de un tallo de *S. lycopersicum* infectado con *Cmm* amplificada 400x, en ella se pueden observar (marcado con la flecha) bacilos de *Cmm* y cloroplastos (marcados con una estrella). La figura 6D, se muestra un corte longitudinal de un tallo de *S. lycopersicum* infectado con *Cmm* amplificada 400x, en ella se pueden observar (marcado con la flecha) bacilos de *Cmm*. En las figura 6E (400x) y 6F (3000x), se observan cortes longitudinales de tallo de *Solanum peruvianum* sin infectar, donde solo se observan (Fig.6F) estructuras esféricas correspondientes a cloroplastos (marcados con una estrella). La figura 6G, se muestra la imagen de un corte longitudinal de un tallo de *Solanum peruvianum* inoculado con ToMoV_ΔCP e infectado con *Cmm*, amplificado 3000x, y no se observan estructuras bacilares. En la figura 6H, se muestra un corte transversal de tallo de *Solanum peruvianum* inoculado con ToMoV_DREB2A e infectado con *Cmm* amplificado 400x, aunque no se observan estructuras bacilares, se pueden ver estructuras esféricas que corresponden a cloroplastos (marcado con una estrella).

La figura 6l, muestra la imagen de un corte longitudinal de tallo de *Solanum peruvianum* inoculado con ToMoV_DREB2A e infectado con *Cmm* amplificado a 3000x, donde se aprecian estructuras bacilares similares a las observadas en la muestra de *Solanum lycopersicum* infectado con *Cmm*, con lo que se comprueba la presencia de *Cmm* en planta de *Solanum peruvianum* con el gen DREB2A silenciado e infectadas con *Cmm*. Se comprobó que las estructura bacilar corresponde a *Cmm*, mediante un PCR con oligonucleótidos específicos para la región Cel A de *Cmm*.

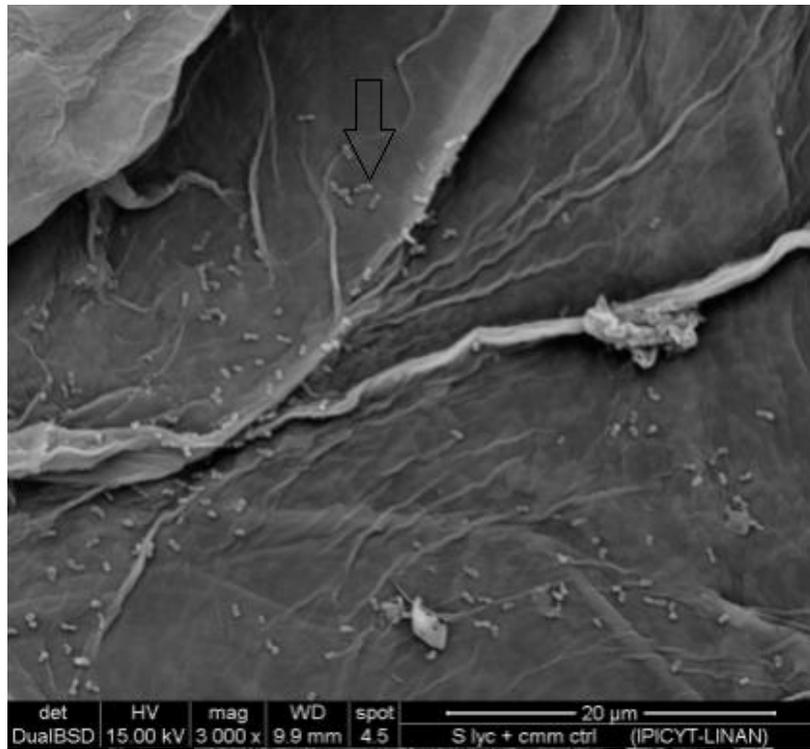
Muestra	Imagen Amplificada
<p><i>Solanum lycopersicum</i> control (sin infectar)</p>	<p>A</p> 
	<p>B</p> 

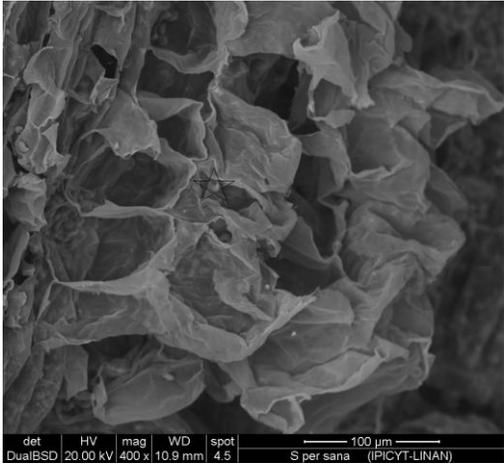
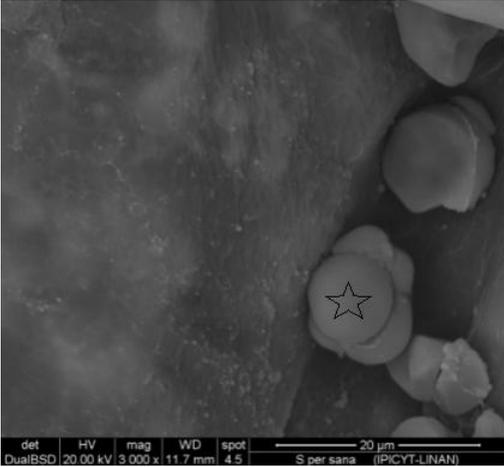
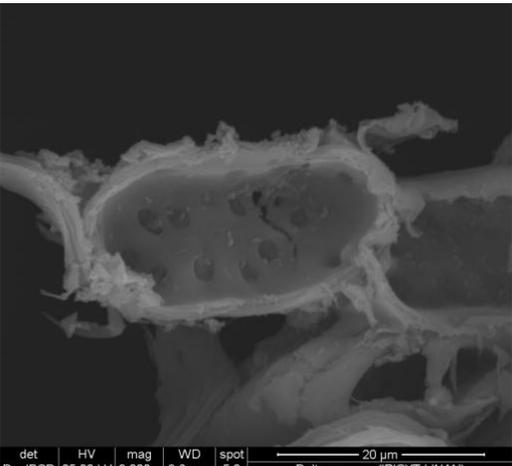
Solanum lycopersicum
infectada con
Cmm

C



D



<p><i>Solanum peruvianum</i> control (sin infectar)</p>	<p>E</p> 
	<p>F</p> 
<p><i>Solanum peruvianum</i> inoculada con ToMoV_ΔCP e infectada con <i>Cmm</i></p>	<p>G</p> 

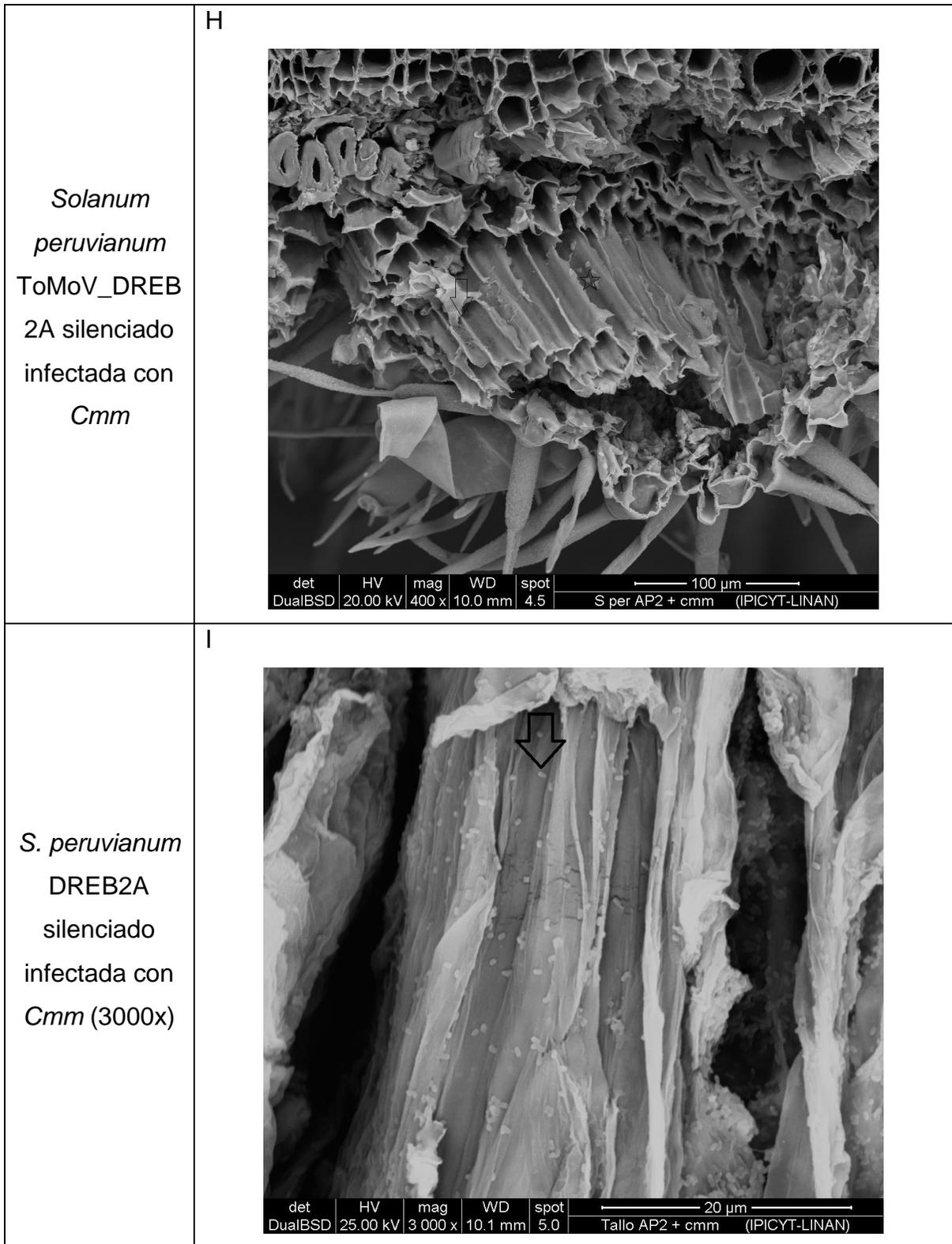


Figura 6. Micrografía electrónica de barrido de tallos de *Solanum* spp. infectados con *Cmm*. (A) *S. lycopersicum* sin infectar (400x); (B) *S. lycopersicum* control (sin

infectar)(3000x); (C) *S. lycopersicum* infectada con *Cmm* (400x); (D) *S. lycopersicum* infectada con *Cmm* (3000x); (E) *S. peruvianum* control (sin infectar) (400x); (F) *S. peruvianum* control (sin infectar) (3000x); (G) *S. peruvianum* Δ CP infectada con *Cmm* (3000x); (H) *S. peruvianum* DREB2A silenciado infectada con *Cmm* (400x); (I) *S. peruvianum* DREB2A silenciado infectada con *Cmm* (3000x). Las flechas señalan bacilos de *Cmm* y las estrellas cloroplastos.

La bacteria *Cmm* al colonizar el xilema (Figuras 5, 6C, 6D y 6I) obstruye el flujo del líquidos en la planta y produce deshidratación, lo que conduce al marchitamiento de las hojas; así, se propone una opción por la cual la especie resistente manifiesta síntomas de susceptibilidad (marchitez) al retarse con *Cmm* después silenciar el gen SpDREB2A es que se reduzca la expresión de genes de tolerancia a deshidratación ya que SpDREB2A, codifica una proteína DREB2A que interactúa con DRE/CRT (*cis-acting dehydration-responsive element/C-repeat*), un sitio involucrado en la expresión de genes de respuesta a frío y sequía. Se ha demostrado que la sobreexpresión del gen constitutivo DREB2A en *Arabidopsis thaliana*, resulta en un incremento significativo a la tolerancia de la sequía (Sakuma et al. 2006). Kishnaswamy et al. 2011, reportaron que las proteínas DREB26 y DREB19 actúan como transactivadores con una expresión tejido específica y participan en procesos de desarrollo de la planta así como en la señalización de estrés biótico y abiótico. El factor de transcripción Tsi1 (Tobacco stress-induced gene1) con una secuencia homóloga al motivo de unión a ADN EREBP/AP2, puede estar involucrado en (¿?) como un factor de transactivación positivo en dos vías de señales de transducción separadas bajo estrés biótico y abiótico (Park et al., 2001). Datos como los anteriores, sugieren que factores de transcripción como DREB2A pueden estar involucrados en la regulación de la tolerancia al estrés biótico en plantas.

3.4 Niveles de expresión del gen DREB2A cuantificados por qRT-PCR, en plantas silenciadas con el vector ToMoV_SpDREB2A

En el ensayo de qRT-PCR, se encontró que el silenciamiento del gen SpDREB2A, en plantas de *S. peruvianum*, disminuye su expresión aproximadamente 22 veces, respecto a la expresión en condiciones de la planta previas al silenciamiento del mismo gen, estos datos se muestran en la Figura 7, en la cual se grafica la expresión normalizada del gen SpDREB2A después de ser silenciado.

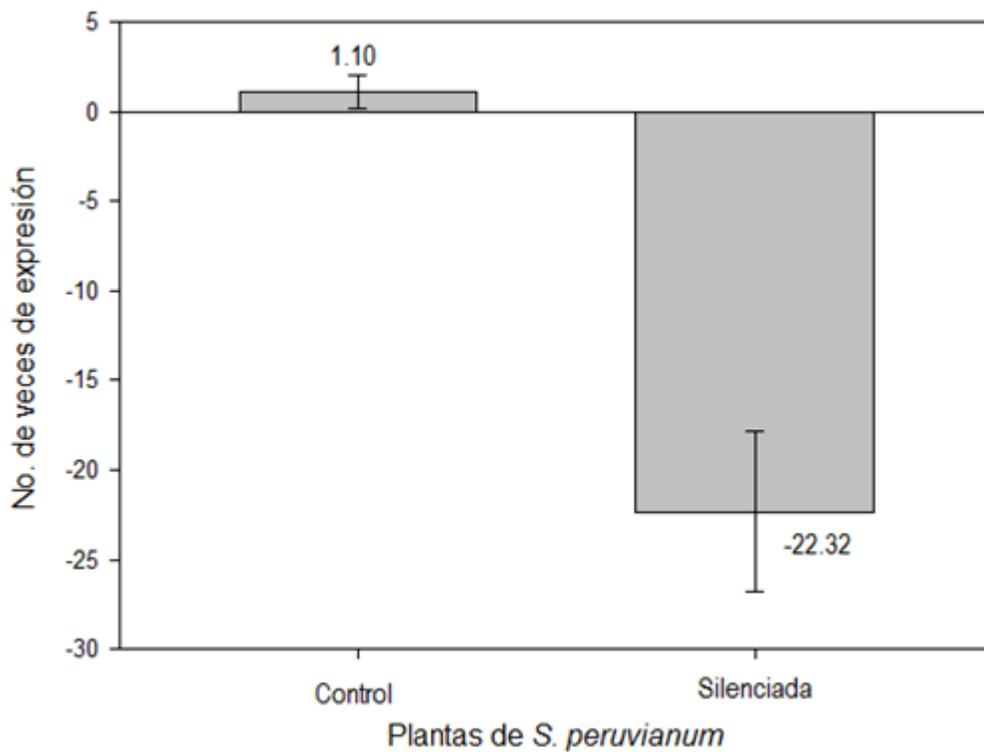


Figura 7. Nivel de expresión del gen SpDREB2A normalizado con el gen de actina, en plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_SpDREB2A.

3.5 Detección de *Cmm* por PCR en plantas silenciadas e infectadas

Se ha postulado que las plantas silvestres resistentes a *Cmm* confinan a la bacteria al sitio de infección y ésta no se disemina en toda la planta, por lo que nos

dimos a la tarea de corroborar si había diseminación en plantas silenciadas en el gen SpDREB2A. Después de que se infectaron con *Cmm* las plantas de *S. peruvianum* con el gen SpDREB2A silenciado, se realizó un PCR para amplificar regiones de *Cel A* que corresponde a un gen que codifica una endo- β -1,4 glucanasa y la región *CM3/CM4* que amplifican selectivamente una región única de ADN de *Cmm*. Es importante resaltar que esta última región ha sido evaluada por Álvarez y Kaneshiro (1999) y demostraron que es la región más conservada en diferentes cepas de *Cmm*, ya que otros grupos han usado iniciadores como CM5 y CM6 (Dreier et al. 1995) para la detección de cepas virulentas, hipovirulentas y avirulentas de *Cmm*, pero no son tan confiables. Para dicho ensayo se usaron hojas distales al sitio de infección para la detección de la bacteria. En la Figura 8 se muestra un gel con los productos de amplificación de muestras tomadas de las plantas silenciadas antes de infectar, 10 días después de la infección y 20 días después de la infección; con esto se corrobora que la bacteria se dispersó en la planta.

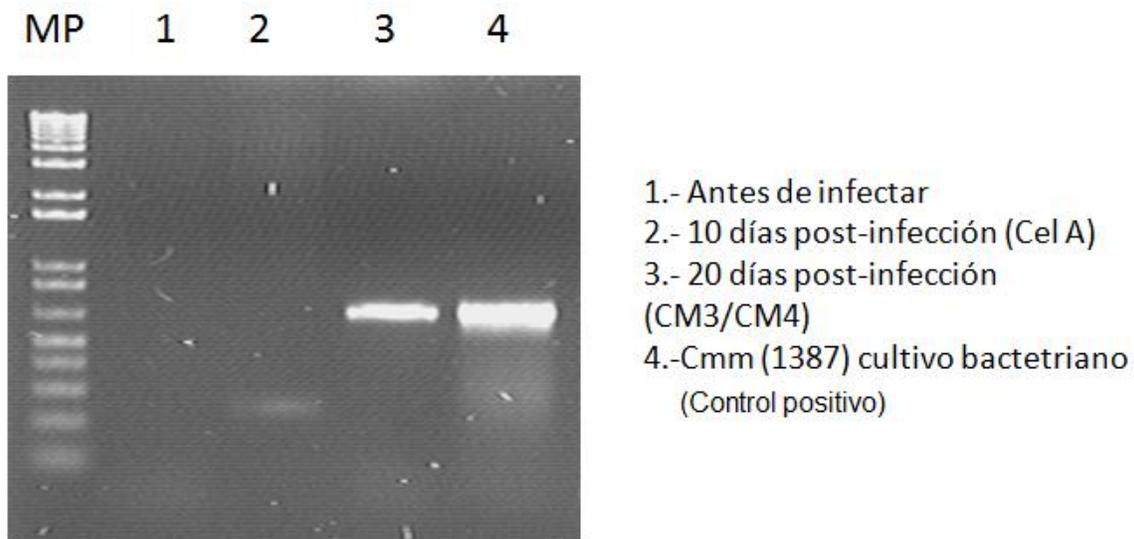


Figura 8. Gel de agarosa que muestra la amplificación de productos por PCR de *Cmm* en plantas silenciadas e infectadas. 1: Muestra tomada de una hoja proximal al sitio de infección antes de infectar. 2: Muestra tomada de una hoja distal al sitio de infección 10 días post-infección. 3: Muestra tomada de una hoja distal al sitio de infección 20 días post-infección. 4: Amplificación de *CM3/CM4* en cultivo bacteriano de la cepa 1387 de *Cmm* como control positivo.

3.6 Área de daño en plantas silenciadas

Se determinó el área dañada de las plantas a las que se les silenció el gen SpDREB2A, con el programa ImageJ, considerando hojas necrosadas y marchitas, y se comparó con el daño medido en plantas inoculadas con ToMoV_ΔCp, se encontró que hay una diferencia del 41.21% de daño (Figura 9), es decir, las plantas con el gen SpDREB2A silenciado, sufrieron 41.21% más daño que las plantas control, lo cual corrobora que el gen SpDREB2A es importante en la contención de la infección por *Cmm*.

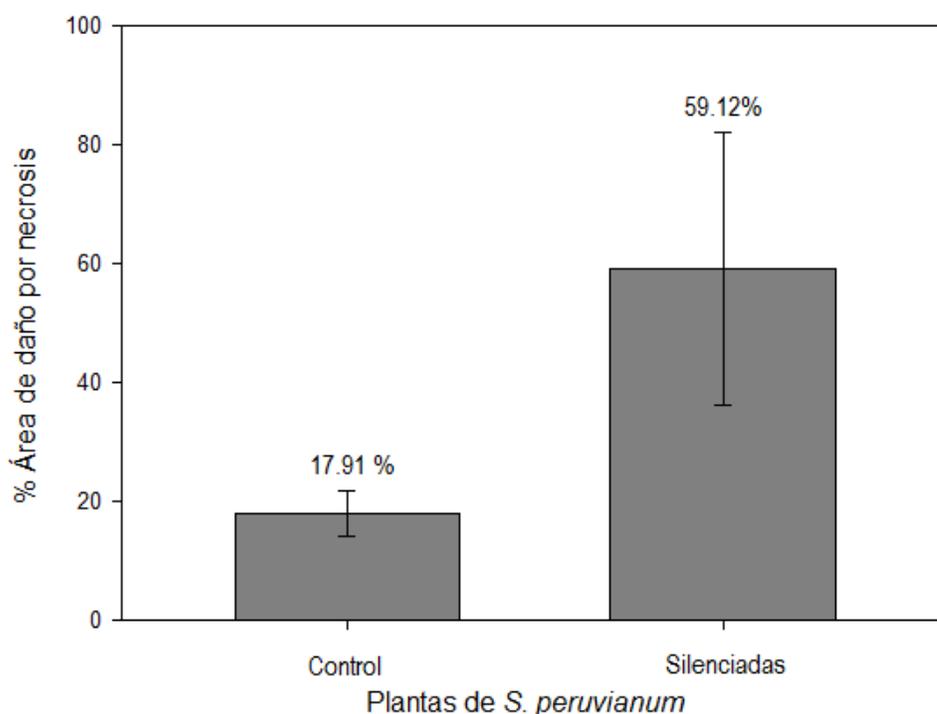


Figura 9. Gráfica de porcentaje de daño de plantas de *S. peruvianum* con el gen SpDREB2A silenciado y tratadas con *Cmm*, comparadas con plantas control inoculadas con ToMoV ΔCp e infectadas con *Cmm*.

3.7 Diseño de oligonucleótidos con sitios de restricción específicos para clonación en el vector ToMoV de genes candidatos adicionales a silenciar

Para amplificar regiones de los genes que posteriormente servirán como blanco para silenciamiento, se realizaron alineamientos de diferentes secuencias con identidades de aproximadamente del 90% con cada una de las secuencias de los genes obtenidas por ADNc-AFLP (Tabla 2, ver Metodología), y se consideró que los oligonucleótidos tuvieran sitios de restricción necesarios para que el producto de amplificación pudiera clonarse en el vector ToMoV con los extremos *EcoRI* y *HindIII*. Para los genes SpChtB4 (quitinasa), SpX1 (peroxidasa), SpOEE (oxygen evolving enhancer) y Sptft8 (de la familia de proteínas 14_3_3, involucradas en procesos de señalización), se obtuvieron los siguientes pares de oligonucleótidos: SpChtB4 F TTT GAA TTC GCC ACG ACC ACA TT; SpChtB4 R GCG AAG CTT TCC AGT TAT CTC AT; SpX1 F ATT GAA TTC GTT GTT TCT TGT GCT G; SpX1 R GCG AAG CTT ATG TCT GCT CTG; SpOEE F AGA GAATTC TTG ATT ATG CTG CTG TTA C; SpOEE R GCG AAGCTT ATG AAC CTC TGT ATG; Sptft8 F AAA GAA TTC ACC GCC AAA AAG TAG AG; Sptft8 R CAG AAG CTT CTT GTC ATC ACC TG. A continuación se muestra un gel (Fig. 10), con los productos de amplificación de cada uno de los fragmentos de los genes a clonar en el vector ToMoV, con lo que se comprueba que los oligonucleótidos son funcionales.

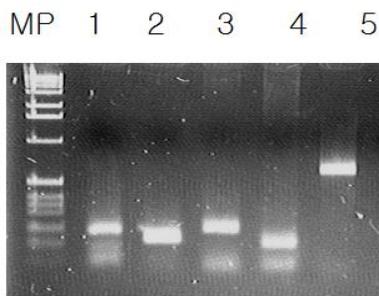


Figura 10. Amplificación de genes de interés para clonación en ToMoV. (MP) Marcador de peso molecular 1Kb; (1) SpChtb4; (2) SpPX1; (3) SpOEE; (4) Sptft8; (5) Control positivo (actinas).

(4) REFERENCIAS

Abramovitch R., Anderson J., Martin G. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Cell Biol. USA.* 7:601-611.

Agarwal P., Agarwal P.K., Nair S., Sopory S.K., Reddy M.K. 2007. Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. *Mol. Genet. Genomics* 277:189–198.

An C., Mou Z. 2011. Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53: 412–428.

Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R., Kazan K. 2004 Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3460–3479.

Bent A.F., Mackey D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 399–436.

Bossi F., Cordoba E., Dupre P., Mendoza M.S., Roman C.S., Leon P. 2009. The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling. *Plant J.* 59:359–374.

Buchanan B., Gruissem W. y Jones R. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Pp. 1367.

Büttner M., Singh K.B. 1997. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5961–5966.

Canella D., Gilmour S.J., Kuhn L.A., Thomashow M.F. 2010. DNA binding by the *Arabidopsis* CBF1 transcription factor requires the PKKP/RAGRxKFxETRHP signature sequence. Biochim. Biophys. Acta 1799:454–462.

Cárdenas-Sierra, N., Medina-Ramos, G., Godoy-Hernández, H., Villalobos-Reyes, S., y Delgadillo-Sánchez, F. 2011. Evaluación de la patogenicidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante del cáncer bacteriano en jitomate (*Solanum lycopersicum*) en diferentes localidades del estado de Guanajuato, México. En: Memorias del XIII Congreso internacional y XXXVIII Congreso nacional de Fitopatología. Tlaxcala. México. p 19.

Carrillo-Tripp J., Shimada-Beltran H., Riviera-Bustamante R. 2006. Use of geminiviral vectors for functional genomics. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 209–215.

Cheong Y.H., Moon B.C., Kim J.K., Kim C.Y., Kim M.C., Kim I.H., Park C.Y., Kim J.C., Park B.O., Koo S.C., Yoon H.W., Chung W.S., Lim C.O., Lee S.Y., Cho M.J. 2003. BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. Plant Physiol. 132:1961–1972.

Chisholm S., Coaker G., Day B., Staskawicz B. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell. 124: 803-814.

Coaker G.L., Francis D.M. 2004. Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*. Theor. Appl. Genet. 108:1047–1055.

De Boer K., Tilleman S., Pauwels L., Vanden Bossche R., De Sutter V., Vanderhaeghen R., Hilson P., Hamill J.D., Goossens A. 2011. ApetalA2/ethylene response factor and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J* 66(6):1053-65.

Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33: 751–763.

Godfray H.C., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., Toulmin C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327:812-818.

Golldack D., Lüking I., Yang O. 2011. Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep* 30(8):1383-91.

Gu Y.Q., Yang C., Thara V.K., Zhou J., Martin G.B. 2000. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12: 771–785.

Gutterson N., Reuber T.L. 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 465–471.

Hong B., Tong Z., Li Q.H., Ma C., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Gao J.P. 2006a. Regeneration and transformation through somatic embryogenesis, and determination of cold stress tolerance in ground cover *Chrysanthemum* cv. Fall color. *Sci. Agric. Sin.* 39: 1443–1450.

Hong B., Tong Z., Ma N., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Gao J.P. 2006b. Expression of *Arabidopsis DREB1A* gene in transgenic chrysanthemum enhances tolerance to low temperature. *J. Hortic. Sci. Biot.* 81: 1002–1008.

Hong B., Tong Z., Ma N., Li J.K., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Gao J.P. 2006c. Heterologous expression of the *AtDREB1A* gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. *Sci. China C Life Sci.* 49: 436–445.

Hussain S.S., Kayani M.A., Amjad M. 2011. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnol. Prog.* 27: 297–306.

Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47: 141–153.

Jasinski M., Stukkens Y., Degand H., Purnell B. 2002. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13:1095–1107.

Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.

Karaba A., Dixit S., Greco R., Aharoni A., Trijatmiko K.R., Marsch-Martinez N., Krishnan A., Nataraja K.N., Udayakumar M., Pereira A. 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15270–15275.

Kariola T., Brader G., Li J., Palva E.T. 2005. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell* 17: 282–294.

Kasuga M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *RD29A* promoter improved drought and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45: 346– 350.

Krishnaswamy S., Verma S., Rahman M., Kav N. 2010. Functional characterization of four APETALA2-family genes (*RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26*) in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 75(1-2):107-27.

Lara-Ávila J., Isordia-Jasso M., Castillo-Collazo R., Simpson J., Alpuche-Solís A.G. 2011. Gene expression analysis during interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30(2): 498-511.

Lee J.H., Kim D.M., Lee J.H., Kim J., Bang J.W., Kim W.T., Pai H.S. 2005. Functional characterization of NtCEF1, an AP2/EREBP-type transcriptional activator highly expressed in tobacco callus. *Planta* 222: 211–224.

Licausi F., Giorgi F.M., Zenoni S., Osti F., Pezzotti M., Perata P. 2010. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* 11: 719–734.

Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2 with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406.

Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant J.*, 31: 777–786.

Lucas S., Durmaz E., Akpınar B.A., Budak H. 2011. The drought response displayed by a DRE-binding protein from *Triticum dicoccoides*. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 346–351.

Magnani E., Sjölander K., Hake S. 2004. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* 16(9):2265-77 .

McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.R., Udvardi M.K., Kazan K. 2005. Repressor and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* 139: 949–959.

Nakano T., Suzuki K., Fujimura T., Shinshi H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 140: 411–432.

Oh S.J., Song S.I., Kim Y.S., Jang H.J., Kim S.Y., Kim M.J., Kim Y.K., Nahm B.H., Kim J.K. 2005. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138: 341–351.

Ohme-Takagi M., Shinshi H. 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173–182.

Oñate-Sánchez L., Singh K.B. 2002. Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol.* 128: 1313–1322.

Pandey S.P., Somssich I.E. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* 150: 1648–1655.

Panstruga R., Parker J., Schulze Lefert, P. 2009. SnapShot: Plant immune response pathways. *Cell* 136(5):978.e1-3.

Park J.M., Park C.J., Lee S.B., Ham B.K., Shin R., Paek K.H. 2001. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2- type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13: 1035–1046.

Pino M.T., Skinner J.S., Jeknic Z., Hayes P.M., Soeldner A.H., Thomashow M.F., Chen T.H.H. 2008. Ectopic *AtCBF1* overexpression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant Cell Environ.* 31: 393–406.

Pellegrineschi A., Reynolds M., Pacheco M., Brito R.M., Almeraya R., Yamaguchi-Shinozaki K., Hoisington D. 2004. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47: 493–500.

Qin J., Zhao J., Zuo K., Cao Y., Ling H., Sun X., Tang K. 2004. Isolation and characterization of an ERF-like gene from *Gossypium barbadense*. *Plant Sci.* 167: 1383–1389.

Riechmann J.L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C-Z., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J.Z., Ghandehari D., Sherman B.K., Yu G.L. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290 (5499): 2105-2110.

Robertson D. 2004. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 495–519.

Saibo N.J., Lourenço T., Oliveira M.M. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Bot.* 103: 609–623.

Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 998–1009.

Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292–1309.

Saibo N.J., Lourenço T., Oliveira M.M. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Bot.* 103: 609–623.

Saleh A., Lumberras V., Lopez C., Puigjaner E., Kizis D., Pages M. 2006. Maize DBF1-interactor protein 1 containing an R3H domain is a potential regulator of DBF1 activity in stress responses. *Plant J.* 46: 747–757.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saumonneau A., Agasse A., Bidoven M.T., Lallemand M., Cantereau A., Medici A., Laloi M., Atanassova R. 2008. Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett.* 582: 3281–3287.

Savitch L.V., Allard G., Seki M., Robert L.S., Tinker N.A., Huner N.P., Shinozaki K., Singh J. 2005. The effect of overexpression of two *Brassica* CBF/DREB1-like

transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1525–1539.

Seo Y.J., Park J.B., Cho Y.J., Jung C., Seo H.S., Park S.K., Nahm B.H., Song J.T. 2010. Overexpression of the ethylene-responsive factor gene *BrERF4* from *Brassica rapa* increases tolerance to salt and drought in *Arabidopsis* plants. *Mol. Cells* 30: 271–277.

Schramm F., Arkindale L., Kiehlmann E., Ganguli A., English G., Vierling E., von Koskull-Döring P. 2008. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*. *Plant J.* 53: 264–274.

Sharoni A.M., Nuruzzaman M., Satoh K., Shimizu T., Kondoh H., Sasaya T., Choi I.R., Omura T., Kikuchi S. 2011. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol.* 52: 344–360.

Shigyo M., Hasebe M., Ito M. 2006. Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene* 366(2):256-65.

SIAP. <http://www.siap.gob.mx> (Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera 2012).

Starvrinides J., McCan H., Guttman D. 2008. Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cellular Microbiology.* USA. 10: 285-292.

Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in

response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035–1040.

Sun S., Yu J.P., Chen F., Zhao T.J., Fang X.H., Li Y.Q., Sui S.F. 2008. TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283: 6261–6271.

Takahashi H., Kanayama Y., Zheng M.S., Kusano T., Hase S., Ikegami M., Shah J. 2004. Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant Cell Physiol.* 45: 803–809.

Tester M., Langridge P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327: 818–822.

Tournier B., Sanchez-Ballesta M.T., Jones B., Pesquet E., Regad F., Latche A., Pech J.C., Bouzayen M. 2003. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett.* 550: 149–154.

Van Heusden A.W., Koornneef M., Voorrips R.E., Bruggemann W., Pet G., Vrielink-van Ginkel R., Chen X., Lindhout P. 1999. Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* 99:1068–1074.

Walley J.W., Dehesh K. 2010. Molecular mechanisms regulating rapid stress signaling networks in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 354–359.

Wan Dunning J., Bent F. 2002. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Funct. Integr. Genomics*. 2:259-273.

Wang X., Chen X., Liu Y., Gao H., Wang Z., Sun G. 2011. *CkDREB* gene in *Caragana korshinskii* is involved in the regulation of stress response to multiple abiotic stresses as an AP2/EREBP transcription factor. *Mol. Biol. Rep.* 38: 2801–2811.

Wang H., Huang Z., Chen Q., Zhang Z., Zhang H., Wu Y., Huang D., Huang R. 2004. Ectopic overexpression of tomato *JERF3* in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol. Biol.* 55: 183–192.

Xue G.P., Loveridge C.W. 2004. HvDRF1 is involved in abscisic acid mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant J.* 37: 326–339.

Xu Z.S., Chen M., Li L.C., Ma Y.Z. 2008. Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany* 86: 969–977.

Zarei A., Körbes A.P., Younessi P., Montiel G., Champion A., Memelink J. 2011. Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 75: 321–331.

Zhang G., Chen M., Chen X., Xu Z., Li L., Guo J., Ma Y. 2010a Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.). *Mol. Biol. Rep.* 37: 809– 818.

Zhang H., Huang Z., Xie B., Chen Q., Tian X., Zhang X., Zhang H., Lu X., Huang D., Huang R. 2004b. The ethylene, jasmonate, abscisic acid and NaCl-responsive

tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* 220: 262–270.

Zhu Q., Zhang J., Gao X., Tong J., Xiao L., Li W., Zhang H. 2010. The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene* 457:1–12.

Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20:10-16.

(5) ANEXO

5.1 Extracción de ARN. Las muestras a analizar, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriormente realizar la extracción de ARN por el método de Trizol® que consiste en la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, al ARN extraído se le dió un tratamiento con DNAsa (Invitrogen), según especificaciones del fabricante y finalmente las muestras se almacenaron a – 70 °C.

5.2 Cuantificación de ADN y ARN. La cuantificación de ARN y ADN se realizó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop®.

5.3 RT-PCR. La síntesis de ADNc y el análisis cuantitativo de RT-PCR se realizó utilizando el iScript™ One-Step RT-PCR kit con SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La mezcla de reacción se hizo en un volumen total de 25 µL con un total de 50 ng de ARN, 12.5 µL de 2X SYBR Green RT-PCR reaction mix, 200 nM de cada oligonucleótido y 1 µL de transcriptasa reversa iScript MMLV 50X (Bio-Rad). Las condiciones de la RT-PCR en un solo paso fueron 10 min a 50°C (síntesis de cDNA), 5 min a 95°C (inactivación de la transcriptasa reversa iScript MMLV) seguida de 40 ciclos de PCR de 10 s a 95°C (desnaturalización), y 30 s a 60°C (alineación de oligonucleótidos y extensión). Las curvas de disociación “melt” se realizaron por 80 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 10 s a 55°C incrementando la temperatura 0.5°C cada ciclo usando el 7500 Fast de Applied Biosystems. Para cada muestra, se analizaron 3 replicados biológicos (n=3), con sus respectivos replicados técnicos. Los datos se analizaron con el Fast de Applied Biosystems Software. La cuantificación se basó en la normalización de los valores con “ACTINA” (ACT-TOM5-F 5'-CCTCACCGAGAGAGGTTACATGT-3' y ACT-TOM5-R 5'-CATGTGCGGACAATTTCC-3'; Accession no. FJ532351.1). Se corroboró la ausencia de ADN genómico contaminante mediante PCR de las muestras de ARN.

5.4 Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A continuación se presentan los parámetros utilizados para la amplificación de genes mediante PCR. Componentes: Oligo F (10 μ M) 0.5 μ L, Oligo R (10 μ M) 0.5 μ L, dNTP's (10 mM) 0.5 μ L, MgCl₂ (50 mM) 0.75 μ L, Buffer 10X 2.5 μ L, *Taq* DNA polimerasa 0.5 μ L (5U/ 5 μ L), H₂O milli "Q" 18.25 μ L, ADN 1 μ g/ μ L, todo para un volumen final de 25 μ L.

Las reacciones de PCR se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, alineación de oligonucleótidos y amplificación (Tabla S3), utilizando el equipo TouchGene[®] (Techne).

TABLA S3. Condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en la PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Evento
1	94	3	Desnaturalización inicial
2	94	0.5	Desnaturalización
3	56 (según los oligonucleótidos)	0.5	Alineamiento
4	72	3	Extensión
5		30 ciclos del paso 2 al 4	
6	72	7	Extensión final

Los productos de la amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/mL), observados y digitalizados en el equipo UVP Chemisystem (UVP, Inc.).

5.5 Método de transformación mediante choque térmico. Para verificar construcciones virales se transforman células de *E. coli* calcio competentes, las cuales se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0 μ L del ADN a introducir en ellas, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se mantuvieron

en un baño a 43°C por 1 minuto y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 minutos. Se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y se incubó 40 minutos a 37°C y 150 rpm.

5.6 Cultivo de células transformadas. Con el objetivo de identificar las células transformadas, en una caja de petri con medio LB sólido con carbenicilina (100 mg/L), se distribuyó de manera homogénea y en condiciones de esterilidad lo siguiente: 20 µL de medio LB, 20 µL de IPTG, 20 µL de X-Gal. Una vez hecho lo anterior se inocularon 100 µL del producto de transformación. El crecimiento de colonias azules, indica que no hubo transformación, las colonias blancas, corresponden a colonias de *E. coli* transformadas con el inserto. Cuando hay inserto en el pGEM T-Easy se interrumpe el gen de la beta-galactosidasa y las colonias se ven blancas, cuando no hay inserto el color azul se debe a la producción de la beta-galactosidasa cuando se religa el vector, y el sustrato X-gal se degrada por la producción de beta-galactosidasa y se forma el color azul.

5.7 Extracción de ADN plasmídico por el método de Birnboim (Miniprep). Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el método que se describe a continuación [(miniprep método de lisis alcalina de Birnboim (BD) Sambrook et al. (1989)].

TABLA S4. Componentes de las soluciones de Birnboim (BD) Sambrook et al. (1989).

Solución I	Solución II*	Solución III
EDTA 10mM pH 8.0	NaOH 0.2N	Acetato de Potasio 3M
Tris-HCl 25mM pH 8.0	SDS 1%	Ácido acético glacial
Glucosa 2M		5.75mL

*Esta solución se prepara al momento de su uso.

Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante. Enseguida se añadió 150 µL de la solución I de Birnboim (BD) y se resuspendió con vórtex. Inmediatamente se

agregaron 300 μL de la solución II de BD recién preparada, la muestra se agitó por inversión 5 veces, hasta observar como la solución tiende a verse ligeramente transparente. Se añadieron 225 μL de la solución III de BD, se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y finalmente se recuperó la fase acuosa. Cuando se necesitó, al notar la fase acuosa turbia se agregó un volumen de fenol-cloroformo (50:50), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm, de lo contrario se precipitó el ADN recuperando el sobrenadante y se adicionó un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20°C por 30 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500 μL de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm; se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por un periodo de aproximadamente 10 minutos. Se agregó RNAsa (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se incubó a 37°C por 30 minutos, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:2) y se precipitó el ADN en un volumen de isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm y se secó la pastilla a $50-60^{\circ}\text{C}$, finalmente se resuspendió en 20 μL de agua milli "Q".

5.8 Medio LB. Para preparar un litro de medio LB se pesaron 20 g de base para medio de cultivo LB, se disolvió en agua desionizada y se aforó a 1. Se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos. Para preparar medio LB sólido, se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico. Se aforó con agua destilada y se esterilizó de igual forma. Cuando se requirió medio con antibiótico, se agregaron 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina.

5.9 Medio 802. Para un litro se mezclan, 1g de polipeptona, 2 g de extracto de levadura y 0.92 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se aforan a 1 litro con agua destilada.

5.10 Preparación de soluciones. Las soluciones empleadas se prepararon de acuerdo a las instrucciones del manual de Sambrook et al. (1989).

TAE 50X: 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó a un litro con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

Agarosa: Se preparó de acuerdo al porcentaje a utilizar, por ejemplo, si se desea prepararla al 1%, se añadió un gramo de agarosa y se aforó a 100 mL con TAE 1X, se calentó en microondas hasta disolver y la agarosa no utilizada, se almacenó a temperatura ambiente.

Agua DEPC: A un litro de agua destilada se le agregó 1 mL de dietilpircarbonato, se agitó hasta disolver y se dejó reposar 10 horas, posteriormente se esterilizó por 15 min a 15 lb/pulg² a 120°C.

Marcador de peso molecular: Para preparar 25 µL de marcador de peso molecular de 1Kb se mezcló: 15 µL de Buffer TE 1X, 5 µL de 1Kb Leader (New England Biolabs) y 5 µL de Buffer de carga 6X.

Buffer de carga 6X: Para 100 mL de buffer de carga 6X, se disolvieron 15 g de Ficoll (Type 400 Pharmacia) en 100 mL de agua milliQ, después se agregaron 0.25 g de F-F Xilenocianol y 0.25 g de azul de bromofenol.

IPTG: Se disolvieron 0.36 g de IPTG (Promega) en 1.5 mL de agua y se almacenó a -20°C.

X-Gal: En 1 mL de N-N formamida, se disolvieron 40 mg de X-Gal (Promega) y se almacenó a -20°C al abrigo de la luz.

Carbenicilina: Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 g de carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C, en alícuotas de 5 mL.

Buffer de Sörensen (Fosfato de sodio 100mM pH 7.4): se mezclaron 77 mL de fosfato bibásico 0.1M y 23 mL de fosfato monobásico 0.1M

(6) FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Alineamientos de secuencias y árboles filogenéticos obtenidos para la identificación de genes de interés posiblemente involucrados en tolerancia a estrés biótico (Ver metodología).

6.1 Gen SpOEE

	510	520	530	540	550	560	570	580
SpOEE1	-----GATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCCGGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
SLOEE Z11999	CACTCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCCGGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
StOEE HQ5342	CACTCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCCGGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
NbOEE AY9523	CACCCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCTGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
NtOEE AY2200	CACCCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCTGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
NtOEE X64349	CACCCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCTGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
StOEE X17578	CACCTTTGGATGAGATTGAGGGACCCTTTTGAAGTATCTCCTGACGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
CaOEE GU2562	CACCTTTGGATGAGATTGAGGGACCCTTTTGAAGTATCTCCTGATGGCACCGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
SLOEE TC2355	CACCTTTGGATGAGATTGAGGGACCCTTTTGAAGTATCTCCTGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
StOEE SGN-U2	CACCTCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCCTGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
NtOEE SGN-U4	CACCCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCTGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
NbOEE SGN-U5	CACCTCTTGATGAGATTGAGGGACCCTTTTGAAGTATCCCCTGATGGCACAGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							
SLOEE AK3195	CACTCTTGATGAGATTGAGGGACCATTTGAAAGTGTCTCCGGATGGCACTGTTAAGTTTGAGGAGAAGGATGG							

	640	650	660	670	680	690	700
OEE1	TCTTCACTATCAAACAGCTTGTGGCAA	GCGGCAAGCCA	GAAAAGCTTTAGTGGTGAGTTCCTTGTC	CCAT			
OEE Z11999	TCTTCACTATCAAACAGCTTGTGGCAA	GCGGCAAGCCA	GAAAAGCTTTAGTGGTGAGTTCCTTGTC	CCAT			
OEE HQ5342	TCTTTACTATCAAACAGCTTGTGGCAA	GCGGCAAA	CCAGAAAAGCTTTAGTGGTGAGTTCCTTGTC	CCAT			
OEE AY9523	TCTTCACTATCAAACAGCTAGTGGCAA	GCGGCAAA	CCAGAAAAGCTTTAGCGGTGAATTCCTTGTC	CCAT			
OEE AY2200	TCTTCACTATCAAACAGCTAGTGGCAA	GCGGCAAA	CCAGAAAAGCTTTAGCGGTGAATTCCTTGTC	CCAT			
OEE X64349	TCTTCACTATCAAACAGCTAGTGGCAA	GCGGCAAA	CCAGAAAAGCTTTAGCGGTGAATTCCTTGTC	CCAT			
OEE X17578	TCTTCACTATCAAACAACTTGTGGCATCTGGAAA	GCCCTGAGAGCTTCA	GTGTTGACTTCCTTGTC	CCAT			
OEE GU2562	TCTTCACTATCAAACAACTTGTGGCATCTGGAAA	GCCCGACAGCTTCA	GTGGTGAATTCCTTGTC	CCAT			
OEE TC2355	TCTTCACTATCAAACAACTTGTGGCATCTGGAAA	GCCCTGAGAGCTTCA	GTGGTGAATTCCTTGTC	CCAT			
OEE SGN-U2	TCTTTACTATCAAACAGCTTGTGGCAA	GCGGCAAA	CCAGAAAAGCTTTAGTGGTGAGTTCCTTGTC	CCAT			
OEE SGN-U4	TCTTCACTATCAAACAGCTAGTGGCAA	GCGGCAAA	CCAGAAAAGCTTTAGCGGTGAATTCCTTGTC	CCAT			
OEE SGN-U5	TCTTCACTATCAAACAGCTCGTGGCATCTGGAAA	GCCCGACAGCTTTAGTGGCGAGTTCCTCGT	GCCAT				
OEE AK3195	TCTTCACTATCAAACAGCTTGTGGCAA	GCGGCAAGCCA	GAAAAGCTTTAGTGGTGAGTTCCTTGTC	CCAT			

	580	590	600	610	620	630	640
SpOEE1	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
SLOEE Z11999	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
StOEE HQ5342	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
NbOEE AY9523	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
NtOEE AY2200	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
NtOEE X64349	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
StOEE X17578	GATGGAATTGATTACGCTGCTGTTACTGTCCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGCGTTCCTTCCTTTTCAC					
CaOEE GU2562	GATGGAATTGATTACGCTGCTGTTACTGTCCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGCGTTCCTTCCTTTTCAC					
SLOEE TC2355	GATGGAATTGATTACGCTGCTGTTACTGTCCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTTCGGTTCCTCTTCAC					
StOEE SGN-U2	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
NtOEE SGN-U4	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					
NbOEE SGN-U5	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGCGTTCCTTCCTCTTCAC					
SLOEE AK3195	GATGGAATTGATTATGCTGCTGTTACAGTTCA	GCTTCCTGGTGGTGAGCGTGTGCCCTTCCTCTTCAC					

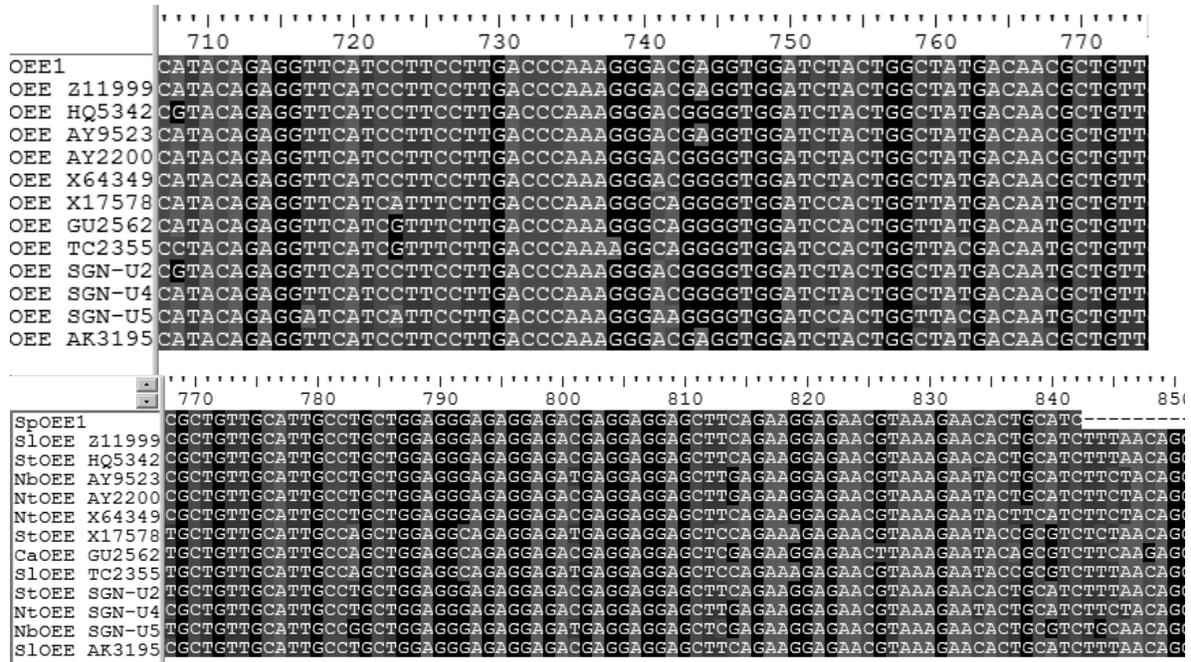


Figura S1. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen SpOEE. SIOEE AK319582.1; SIOEE Z11999.1; StOEE HQ534294.1; NbOEE AY952375.1; NtOEE AY220076.1; NtOEE X64349.1; StOEE X17578.1; SIOEE TC235533; StOEE SGN-U268446; NtOEE SGN-U450055; NbOEE SGN-U511355. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Nb: *Nicotiana benthamiana*).

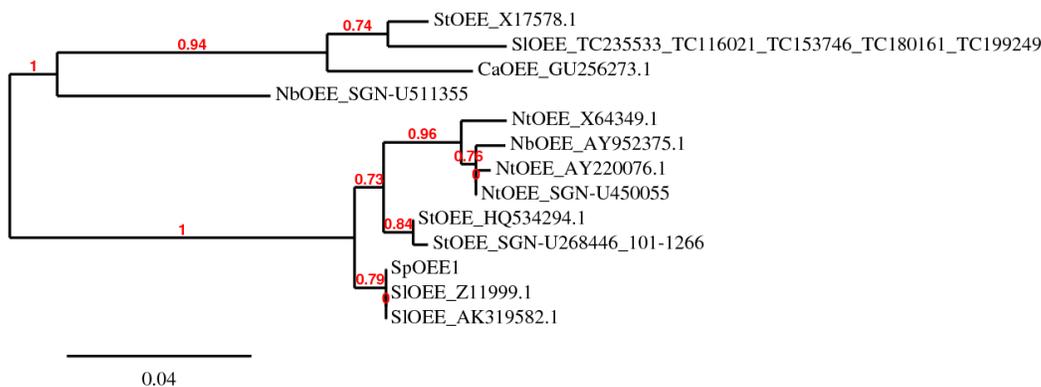


Figura S2. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen SpOEE. SIOEE AK319582.1; SIOEE Z11999.1; StOEE HQ534294.1; NbOEE AY952375.1; NtOEE AY220076.1; NtOEE X64349.1; StOEE X17578.1; SIOEE TC235533; StOEE SGN-U268446; NtOEE SGN-U450055; NbOEE SGN-

U511355. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Nb: *Nicotiana benthamiana*).

6.2 Gen SpPX1

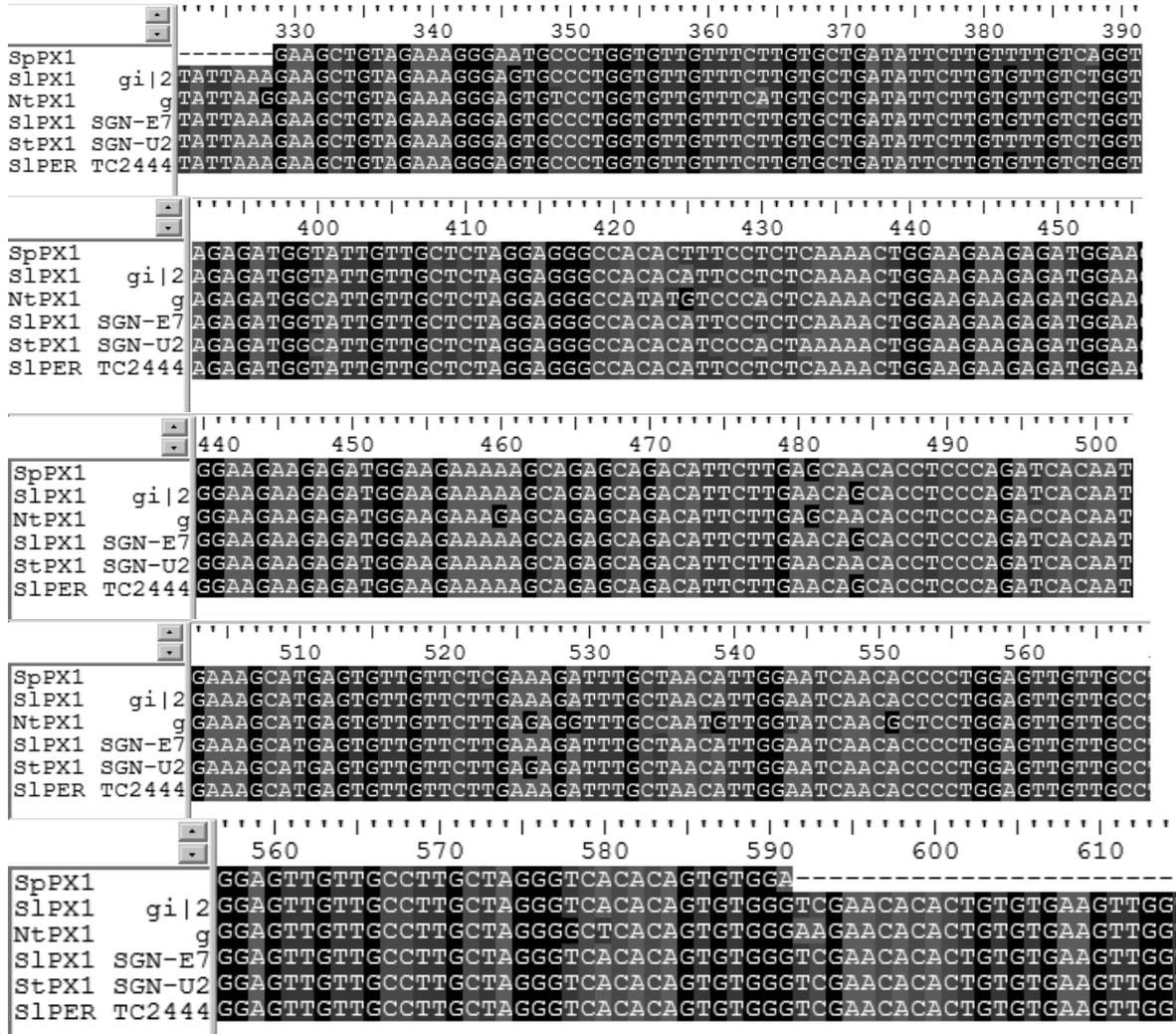


Figura S3. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen SpPX1. SIPX1 AK322518.1; NtPX1 AF149251.1; SpPX1 SGN-U268273; SIPX1 SGN-E701819; SIPER TC244400. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Nt: *Nicotiana tabacum*)

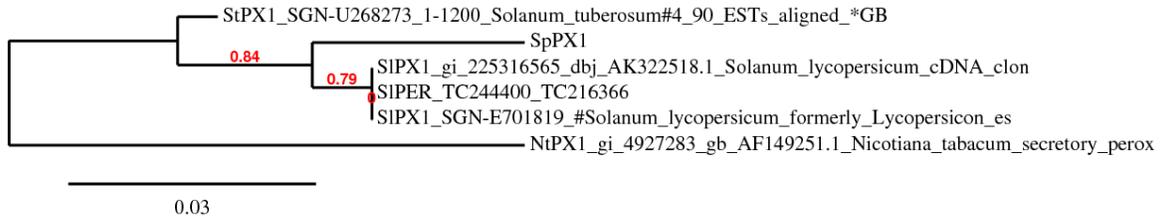


Figura S4. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen SpPX1. SIPX1 AK322518.1; NtPX1 AF149251.1; SpPX1 SGN-U268273; SIPX1 SGN-E701819; SIPER TC244400. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Nt: *Nicotiana tabacum*).

6.3 Gen Sptft8

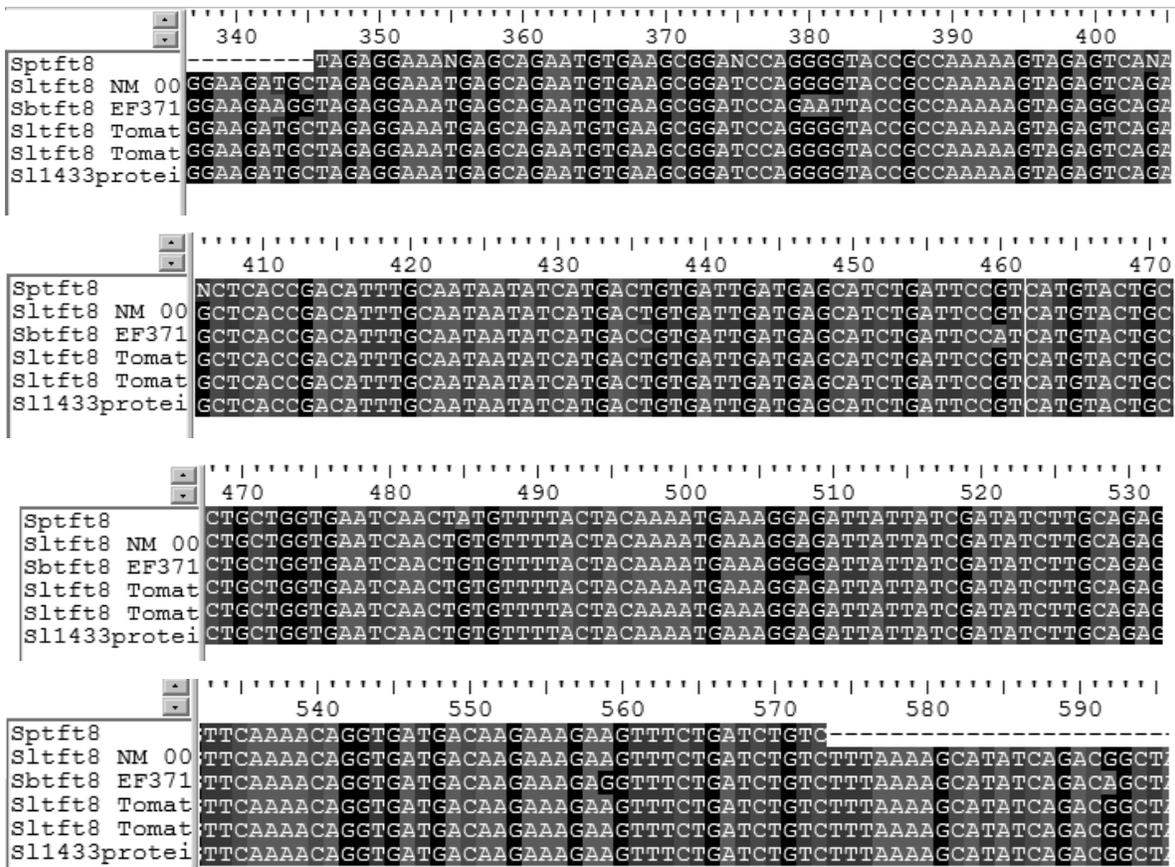


Figura S5. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen. Slftf8 NM_001247338.1, Sbftf8 EF371798.1; Slftf8 Tomato_SGNlocusID_18_X98864; Slftf8 Tomato_SGNlocusID_18_SGN-U577857; SI1433protein TC226027. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Sb: *Solanum berthaultii*).

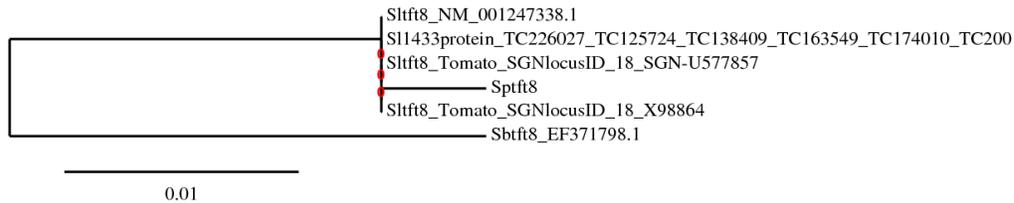


Figura S6. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen. Slftf8 NM_001247338.1; Sbftf8 EF371798.1; Slftf8 Tomato_SGNlocusID_18_X98864; Slftf8 Tomato_SGNlocusID_18_SGN-U577857; SI1433protein TC226027. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Sb: *Solanum berthaultii*).

6.4 Gen SpChtB4

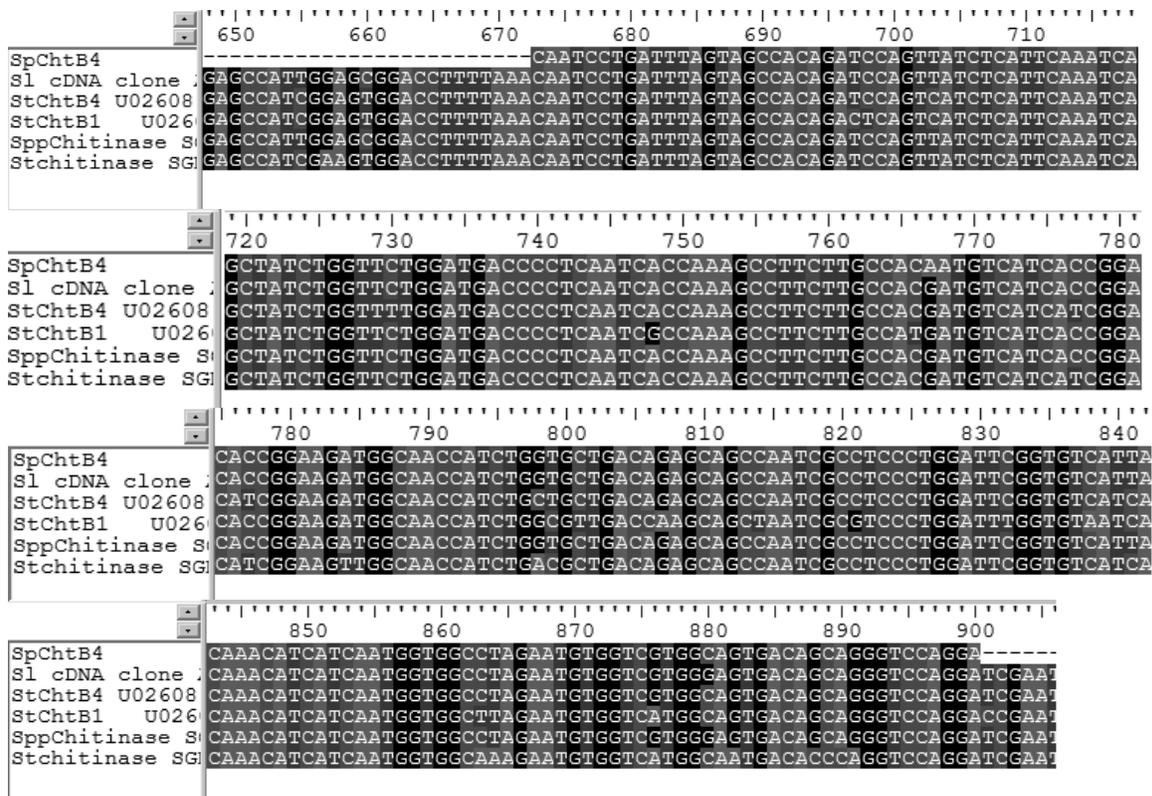


Figura S7. Alineamiento de secuencias de genes homólogos al gen SpChtB4. SI cDNA clone AK322000.1; StChtB4 U02608.1; StChtB1 U02605.1; SppChitinase SGN-U580366; Stchitinase SGN-U268802. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*).

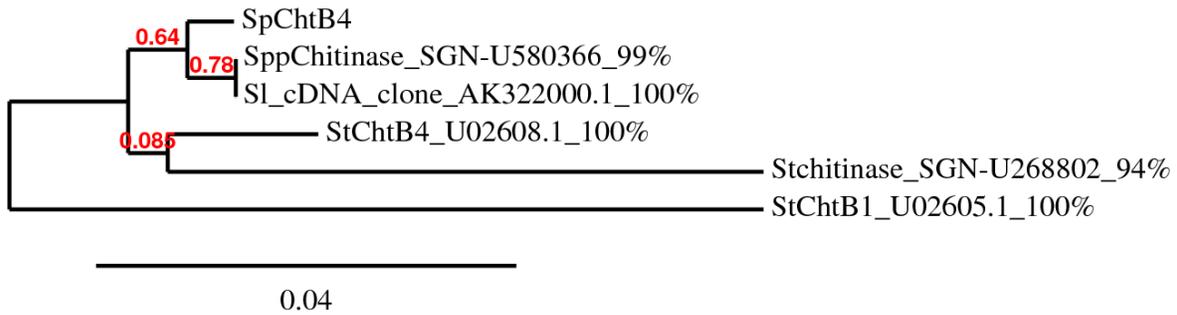


Figura S8. Árbol filogenético de secuencias de genes homólogos al gen SpChtB4. SI cDNA clone AK322000.1; StChtB4 U02608.1; StChtB1 U02605.1; SppChitinase SGN-U580366; Stchitinase SGN-U268802. (Sp: *Solanum peruvianum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*).