



*"Enseñar la Explotación de la
Tierra, no la del Hombre"*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
AGRÍCOLA**

**PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CRISANTEMO
QUE ACUMULAN TREHALOSA MUESTRAN
TOLERANCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

PRESENTA:

ROCIO CUELLAR OLALDE



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2015



"PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CRISANTEMO QUE ACUMULAN TREHALOSA MUESTRAN TOLERANCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO", Tesis realizada por Rocio Cuellar Olalde bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESORA: _____



Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESORA: _____



Dra. Edith del Rocio García Hernández

DEDICATORIAS

A mi pequeño Osvaldito, eres el gran amor de mi vida y aunque el camino se tornó complicado por instantes, tus sonrisas me dieron la fuerza para concluir pese a las adversidades. TE AMO HIJO.

A mi esposo, Hugo Sánchez Alatorre, gracias por darme ánimos para terminar este proyecto, por todos tus consejos por fin estamos cerrando un círculo y vamos por más, esto es el inició de muchos triunfos que si Dios nos permite pasaremos en familia.

A mis queridos padres, Cecilia Olalde Cervantes y Felipe Cuellar Suaste por apoyarme siempre, amarme, confiar en mí y darme palabras de aliento cuando más lo necesitaba, así como ustedes dicen sentirse orgullosos de mí, yo me siento no sólo orgullosa de ustedes sino la hija más afortunada por tener a unos padres que me han enseñado a ser una persona de bien con el ejemplo. Gracias por la valiosa herencia de la educación.

A mi abuelita Elena, mi viejita hermosa que me consiente con tanto cariño y entrega, gracias por tanto amor y cuidarme como si en mí no hubieran pasado los años.

A mis hermanos Felipe de Jesús y Marisol por tantas aventuras, risas, platicas y enseñanzas, pero sobre todo por su infinito amor y tantos “eres las mejor hermana”.

AGRADECIMIENTOS

Esta es la culminación de dos años de Maestría y otro poco más del proceso de titulación, tiempo en que he podido disfrutar de las alegrías y aprender de las penas que da la ciencia. Todo este camino recorrido no hubiera sido posible sin las personas que han estado a mi lado apoyándome incondicionalmente. Todos y cada uno de ellos han aportado su granito de arena y me gustaría mostrarles mi agradecimiento, aunque un par de líneas se quedan cortas.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a mi Director de Tesis, el Dr. José Oscar Mascorro Gallardo, por todo el apoyo, confianza pero sobre todo paciencia depositada en mí desde el día que me acerque a él para conocer su trabajo de investigación.

A la Dra. Edith del Rocio García Hernández y la Dra. Alejandrina Robledo Paz, quienes fungieron como mis asesoras de tesis, gracias por su continua disponibilidad y valiosas aportaciones.

Al Dr. Sergio Aranda del COLPOS, por haberme donado las cepas bacterianas usadas para los ensayos de infección en crisantemo.

A mi amigo, el Dr. Anselmo de Jesús Cabrero Hidalgo por la enorme paciencia así como el tiempo dedicado en la identificación de los patógenos causantes de la marchitez en plantas de crisantemo.

A los chicos del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia (Samir, Carmen, Claudia, Anita y Abraham) por tener siempre la disposición para ayudarme en lo que necesitaba y enseñarme a mirar la ciencia desde otra perspectiva. Así mismo a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Esbeydi y Victor, por haber hecho que me sintiera como en casa y resolverme algunos problemas técnicos.

A mis compañeros de la Maestría (Vic, Dany, Jeff y Carmencita)...quienes se convirtieron en muy buenos amigos, gracias por su amistad, charlas inolvidables, convivencia y ayuda, tanto en el plano profesional como en el personal. Han sido un ejemplo de profesionalidad y madurez para mí, aguantando heroicamente (sobre todo Vic) los últimos meses de estrés haciendo derroche de alegría, buen humor y paciencia, mucha paciencia.

Finalmente, agradezco el apoyo de la Universidad Autónoma Chapingo que me dio la oportunidad para realizar la maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado otorgada.

DATOS BIOGRÁFICOS

Rocio Cuellar Olalde nació en Tecomán, Colima el 10 de enero de 1986.

En 2004 inició sus estudios de Licenciada en Biología en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, obteniendo su título en 2010, con la tesis titulada “PRODUCCIÓN HETERÓLOGA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA GLOBULINA 11S DE AMARANTO EN *Escherichia coli*”

En Marzo de 2010, inició un curso intensivo de inglés en la Universidad de Bakersfield, California, E.U.A. (CSUB, Intensive English Language Center).

Trabajó del 16 de Febrero de 2011 al 15 de Mayo de 2012 como Auxiliar de Inspección Fitozoosanitaria dentro del Programa Apoyo Técnico-Operativo para la prevención del Ingreso de Plagas y Enfermedades Exóticas Bajo Campaña en México mediante convenio con SAGARPA-SENASICA-IICA.

Fungió como Técnico de Servicios Técnicos de Fumigación en TETENGO A Rentokil Company (en la ruta 6 Manzanillo-Colima) del 14 de Junio de 2012 al 05 de Enero de 2013.

El 14 de enero de 2013 ingresó a la maestría en el Programa de Biotecnología Agrícola (2013-2014) del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CRISANTEMO QUE ACUMULAN TREHALOSA Y SU TOLERANCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO

TRANSGENIC PLANTS OF CHRYSANTHEMUM ACCUMULATING TREHALOSE AND THEIR TOLERANCE TO BIOTIC AND ABIOTIC STRESS

Rocio Cuellar Olalde¹; José Oscar Mascorro Gallardo²

RESUMEN

Resulta posible incrementar la acumulación endógena de trehalosa y la tolerancia a factores bióticos (patógenos) así como a factores abióticos (particularmente estrés hídrico) al sobre-expresar los genes de biosíntesis de este azúcar. En éste trabajo se analizó por un lado, la tolerancia a estrés hídrico y vida post-cosecha de plantas de crisantemo var. Harman transformadas por agroinfección con la construcción pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS y por otro lado, la tolerancia al hongo *Puccinia horiana* en plantas transgénicas var. Indianapolis pBIN35S::ScTPS1TPS2::NOS. Se recuperaron 16 líneas transformadas con el promotor Rd29A, con resistencia a kanamicina, mientras que los genes de biosíntesis de la trehalosa TPS y TPP se detectaron por RT-PCR. Después de medir la acumulación de trehalosa por HPLC bajo condiciones no inducibles (crecimiento a 26 °C) e inducibles (crecimiento a 4 °C por 48 h), se seleccionaron tres líneas para una caracterización más exhaustiva. La acumulación de trehalosa bajo condiciones inducidas fue de 27.5, 76.25, 62.5 y 52.5 µg/g de peso fresco para la línea no transformante (NT) var. Harman, la línea Rd18, Rd10 y Rd8, respectivamente. Las plantas se llevaron hasta la floración y se evaluó la vida post-cosecha, encontrándose que mientras que la variedad NT alcanzó la senescencia a los 10 días, las líneas Rd8, Rd10 y Rd18, a los 20 días aún mostraban turgencia en el florero. Las líneas transgénicas también mostraron mayor tolerancia a la sequía, a la deshidratación en hojas y finalmente a un complejo de hongos que se identificó aquí. Por otro lado, transformantes var. Indianapolis (35S-19 y 35S-8) mostraron tolerancia al hongo *Puccinia horiana*.

Palabras clave: trehalosa, crisantemo, estrés hídrico, patógenos, vida postcosecha.

ABSTRACT

It is possible to increase the endogenous trehalose accumulation and tolerance to biotic factors (pathogens) and abiotic factors (particularly water stress) to overexpress genes of this sugar biosynthesis. In this work, on the one hand, tolerance to water stress and post-harvest plant life chrysanthemum var. Harman transformed for agroinfection with the construction pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS and on the other hand, *Puccinia horiana* tolerance in transgenic plants var. Indianapolis pBIN35S::ScTPS1TPS2::NOS was analyzed. Sixteen transformed lines with the RD29A promoter were recovered, with kanamycin resistance, whereas the biosynthesis genes trehalose TPS and TPP were detected by RT-PCR. After measuring the accumulation of trehalose by HPLC under non-inducible conditions (growth at 26 °C) and inducible (growth at 4 °C for 48 h), three lines for a more thorough characterization were selected. The accumulation of trehalose under induced conditions was 27.5, 76.25, 62.5 and 52.5 µg /g fresh weight for non-transforming line (NT) var. Harman, the RD18, RD10 and Rd8 respectively line. The plants were brought to flowering and post-harvest life was evaluated, finding that while the variety NT reached senescence at 10 days, the Rd8, RD10 and RD18 lines, at 20 days still showed firmness in the vase. The transgenic lines also showed increased tolerance to drought, leaves dehydration and eventually a complex of fungi were identified here. Furthermore, transformants var. Indianapolis (35S-19 and 35S-8) showed tolerance to the fungus *Puccinia horiana*.

Keywords: trehalose, chrysanthemum, water stress, pathogens, post-harvest life

¹Autor de la tesis, ²Director de la tesis

*El cultivo de la mente es un
alimento para el alma humana.*

Marco Tulio Cicerón

*Para unos, la ciencia es una sublime diosa,
para otros, una vaca que suministra
excelente mantequilla.*

Friederich Von Schiller

ÍNDICE	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Objetivo General.....	6
1.2. Objetivos Específicos.....	6
1.3. Hipótesis.....	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. El cultivo del crisantemo.....	7
2.1.1. Historia del crisantemo.....	7
2.1.2. Descripción botánica.....	7
2.1.3. Clasificación taxonómica.....	9
2.1.4. Importancia.....	9
2.1.5. Variedades cultivadas.....	10
2.1.6. Enfermedades del crisantemo.....	11
2.2. Estrés en plantas.....	15
2.2.1. Concepto de estrés.....	15
2.2.2. Tipos de estrés.....	15
2.2.3. Importancia del estudio del estrés en plantas.....	15
2.2.4. Mecanismos de respuesta de las plantas al estrés.....	16
2.3. Estrés abiótico en plantas.....	18
2.3.1. Estrés hídrico por sequía.....	19
2.4. Estrés biótico en plantas.....	20
2.4.1. El reconocimiento planta-patógeno.....	20
2.4.2. Respuestas específicas al patógeno.....	23
2.4.3. Resistencia frente a patógenos biotrofos.....	25
2.4.3.1. Respuestas basadas en ácido salicílico.....	25
2.4.4. Resistencia frente a patógenos necrótrofos.....	27
2.4.4.1. Respuestas basadas en ácido jasmónico y etileno.....	27
2.5. Trehalosa.....	30
2.5.1. Estructura y distribución de la trehalosa.....	30
2.5.2. Biosíntesis de la trehalosa.....	32
2.5.3. Mecanismos de protección de la trehalosa.....	34

2.5.3.1. Papel de la trehalosa en resistencia a factores abióticos.....	38
2.5.3.2. Papel de la trehalosa en resistencia a factores bióticos.....	39
2.5.4. Biotecnología de la trehalosa.....	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1. Diagrama general de trabajo.....	45
3.2. Material biológico.....	47
3.2.1. Plantas de crisantemo.....	47
3.2.2. Patógenos.....	49
3.3. Plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa (pBIN35S::BIF).....	50
3.3.1. Ensayos de infección con bacterias.....	50
3.3.2. Infección con <i>Puccinia horiana</i>	51
3.3.2.1. Extracción de ARN vegetal.....	52
3.3.2.2. Cuantificación y calidad del ARN total.....	53
3.3.2.3. Síntesis de ADNc.....	53
3.3.2.4. Genes utilizados en el estudio de expresión génica.....	55
3.3.2.5. Diseño de cebadores y PCR.....	56
3.4. Plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa (pBINRd29A::BIF).....	58
3.4.1. Protocolo de transformación estable para la variedad Harman.....	58
3.4.1.1. Detección de trehalosa por HPLC de líneas transformantes...	60
3.4.1.2. Detección mediante RT-PCR de los genes de biosíntesis de la trehalosa.....	61
3.4.1.3. Medición de niveles de desecación.....	62
3.4.1.4. Contenido relativo de agua (CRA).....	62
3.4.1.5. Ensayo de recuperación después de la sequía.....	63
3.4.1.6. Vida post-cosecha de las flores.....	63
3.4.1.7. Etiología de la marchitez de plantas de crisantemo cv. Harman.....	64
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
4.1. Plantas transgénicas pBIN35S::BIF.....	65

4.1.1. Ensayos de infección con bacterias: <i>E. chrysanthemi</i> y <i>P. syringae</i>	65
4.1.2. Tolerancia al hongo: <i>P. horiana</i>	67
4.1.2.1. Calidad del ARN extraído de plantas infectadas con <i>P. horiana</i>	69
4.1.2.2. Diseño de cebadores para la detección de genes relacionados con patogenicidad.....	71
4.1.2.3. Optimización de las condiciones de la RT-PCR.....	71
4.1.2.4. Detección de genes relacionados con patogenicidad.....	73
4.2. Plantas transgénicas pBINRd29A::BIF.....	75
4.2.1. Las flores de plantas transformadas senescen más lento.....	77
4.2.2. Tolerancia de las líneas transgénicas a estrés hídrico.....	79
4.2.3. Etiología de la marchitez causada por patógenos.....	82
V.CONCLUSIONES.....	85
VI. LITERATURA CITADA.....	86
VII. ANEXO.....	101

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de crisantemo resulta de gran importancia dentro del contexto de producción en vivero, al ocupar el tercer lugar a nivel nacional, en lo que respecta a especies ornamentales más demandadas después de las rosas y los claveles. El Estado de México es la principal entidad productora de flores en el país, con un volumen de más de 28, 450 000 ton en 2012, equivalentes a un 88 % de la producción nacional de flores. Las variedades Indianápolis y Harman tienen una demanda en el mercado media y alta, respectivamente, siendo el Estado de México, en particular la región de Texcoco donde se comercializan mayoritariamente (SIAP-SAGARPA, 2013).

Las condiciones ambientales pueden ser factores severos que limitan el crecimiento y la producción de cultivos. Entre estos factores están el estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas, los cuales deshidratan los tejidos vegetales y causan daño celular irreversible y la muerte (Azcón-Bieto y Talón, 2008). El rendimiento de los cultivos se ve mermado también a factores bióticos (plagas y enfermedades) (Nielsen y Orcutt, 1996). Los factores bióticos causan pérdidas promedio del 15 %, mientras los abióticos hasta el 70 %. Ambos tipos de factores estresantes activan en las plantas un gran número de genes cuyo objetivo es lograr la adaptación a las condiciones desfavorables y lograr la sobrevivencia con el menor daño posible. Las plantas optimizan su repertorio de genes tanto en estrés biótico como en el abiótico (Tambussi, 2004).

Los genes de biosíntesis de trehalosa se encuentra ampliamente documentados en la respuesta al estrés abiótico (sequia, salinidad, calor y heladas) (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005), algunos organismos como las plantas de la resurrección o incluso levaduras pueden sobrevivir largos periodos en un estado de escasa humedad y tienen la capacidad de rehidratarse y reiniciar sus funciones metabólicas después de que hay suministro de agua (Crowe *et al.*, 1992). Estos organismos tienen en común la capacidad de sintetizar y acumular grandes concentraciones de trehalosa (Elbein *et al.*, 2003). Cabe resaltar que

algunas plantas de interés han sido transformadas genéticamente para evaluar el papel de la trehalosa en su efecto protector bajo condiciones de estrés. Entre esas plantas se encuentran el tabaco, *Arabidopsis thaliana*, arroz, papa y jitomate. Los resultados han sido muy variados, pero resalta la característica de que siempre ha habido una mejora en la respuesta de las plantas a la sequía (Garg *et al.*, 2002). Además existen evidencias que la trehalosa podría contribuir a mejorar la calidad post-cosecha de los cultivos ornamentales, pues su uso en solución en floreros con flores de tulipán y gladiolo, alargo su vida al mejorar su estatus hídrico (Iwaya-Inoue y Takata, 2001).

El estrés abiótico como el déficit hídrico y las bajas temperaturas tiene amplia repercusión para el crecimiento (Nielsen y Orcutt, 1996). Se ha elegido el punto de estrés hídrico en la presente tesis como uno de los temas de estudio, fundamentalmente por su relevancia en aspectos ecofisiológicos de las plantas y su impacto en la producción agrícola. En cuanto a factores bióticos se optó por el estudio de la interacción crisantemo-*Puccinia horiana* como modelo para determinar la expresión de genes relacionados con la patogenicidad.

Sin embargo, existen menos evidencias sobre el efecto de la trehalosa en la interacción plantas-microorganismos, aunque hay reportes que indican relación con la activación de genes de defensa a patógenos (Reignault *et al.*, 2000). Por ejemplo, la acumulación de trehalosa en microorganismos simbiotes como *Rhizobium* y *Azospirillum* se le ha asociado con una mayor efectividad para realizar una simbiosis eficiente con sus hospedantes bajo condiciones de sequía (Iturriaga *et al.*, 2009).

Por tanto, el estudio de plantas transgénicas de crisantemo que acumulen trehalosa resultaría factible debido a que existen protocolos de transformación y regeneración para esta especie, además de que el análisis de tolerancia a patógenos en este tipo de plantas transformantes permitiría elucidar que vías de señalización se pueden estar activando por acción de la producción endógena

de trehalosa y por otro lado el determinar como el uso de la construcción pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS con promotor inducible a frío y sequía podría actuar sobre el estrés hídrico por sequía y la vida post-cosecha de las flores.

Considerando lo anterior, la presente tesis tuvo los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo General

Caracterizar la tolerancia a patógenos y estrés hídrico de plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa.

1.2. Objetivos Específicos

- a) Caracterizar la tolerancia a *Puccinia horiana* de plantas de crisantemo transgénicas cv. 'Indianápolis' (líneas 35S-19 y 35S-8).
- b) Obtener líneas transgénicas de crisantemo var. Harman con la construcción pBINRd29A::ScTPS1ScTPS2::NOS que contiene un promotor inducible a frío y sequía.
- c) Evaluar la vida post-cosecha y la morfología de flores de plantas transgénicas de crisantemo cv. 'Harman' (líneas Rd18, Rd10 y Rd8).
- d) Determinar los niveles de deshidratación en hojas, contenido relativo de agua y recuperación a déficit hídrico.

1.3. Hipótesis

Las plantas transgénicas de crisantemo con la capacidad de producir y acumular trehalosa endógena presentaran tolerancia a estrés hídrico y a *Puccinia horiana* así como flores con mayor vida post-cosecha.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo del crisantemo

2.1.1. Historia del Crisantemo

El crisantemo es una planta originaria de Asia oriental, cuyo valor ornamental es apreciado por la diversidad de formas y colores de sus flores. China se considera como su centro de origen, donde todavía es utilizado en ceremonias y la flor es el símbolo de una vida larga. La esfera en la bandera del Japón no representa al sol naciente sino el corazón de un crisantemo despojado de sus pétalos que simboliza el poder. (Arbos-Lavila, 1992; Dole y Wilkins, 2005). Se cultiva como ornamental desde hace más de dos mil años. Su nombre *Chrysanthemum* procede de dos palabras griegas: *Khrysos* y *anthemon*, “la flor de oro”.

Su cultivo fue introducido en Europa a través de Francia en el último tercio del siglo XVIII. En España se establecieron a inicio del siglo XIX. El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo generado de especies nativos de china como: *Chrysanthemum indicum* L., *Chrysanthemum morifolium* Ramat. y *Chrysanthemum arcticum* L. (Arbos-Lavila, 1992). En la actualidad aparece bajo la denominación *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam (Dole y Wilkins, 2005).

Han surgido un sinnúmero de variedades de crisantemos generados por hibridación o cruzamiento y mutaciones inducidas, principalmente mediante radiación (Otaola et al., 2001; Shinoyana, 2005; Kumar et al., 2012). Por otro lado, la ingeniería genética ofrece también la posibilidad de obtener variedades resistentes a enfermedades o con un color especial (Valle-Sandoval, 2008).

2.1.2. Descripción Botánica

Las plantas de crisantemo se propagan vegetativamente de manera convencional mediante esquejes homogéneos en consistencia y tamaño, que se extraen de plantas en desarrollo vegetativo, a los cuales se les aplica en su

extremo basal una sustancia promotora del enraizado antes de ser establecidos en sustratos ligeros con buen drenaje y aireación en invernadero o cubiertas plásticas (Enríquez *et al.*, 2005). En la especie *Dendranthema grandiflora* Tzvelev, la plantación debe iniciarse con esquejes enraizados de calidad, con tallo fuerte de 7 a 8 cm de longitud, seis a siete hojas de color verde intenso, libres de plagas y enfermedades, raíces de 1 a 2.5 cm de largo de color crema y sólidas, ya que de lo contrario, la fertilización poco ayudará para su posterior desarrollo en campo (Ball, 1991). Además, la nutrición, el pH del suelo, el agua y la temperatura influyen en la velocidad de crecimiento y desarrollo del cultivo, lo cual determina, de manera considerable, la calidad de la flor cortada (Kofranek, 2004).

De acuerdo con Arbos-Lavila (1992), los crisantemos deben plantarse en lugares soleados, con sombra las flores son pequeñas y los tallos delgados, descendiendo considerablemente la calidad del producto. Estas plantas se consideran de “día corto”, puesto que muchas variedades florecen al alargarse las noches; el punto crítico se halla entre las 13 y las 14½ horas de luz, cuando el número de horas de luz es inferior se produce la floración. Con más de 15 horas diarias de luz las plantas continúan desarrollándose sin florecer. En muchas variedades de crisantemos puede provocarse la floración en diferentes épocas del año, mediante luz artificial o reduciendo la duración del día tapando las plantas con plástico o tela negra.

En cuanto a su morfología, las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de tricomas (polvillo blanquecino) que le da un aspecto grisáceo, casi siempre son aromáticas. Lo que se conoce como flor, realmente es una inflorescencia en capítulo, siendo la lígula correspondiente a la flor femenina, el elemento decorativo. Existen diversos tipos de capítulo cultivados comercialmente, en general, esta inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas (radiales; corresponden con la hilera exterior en las margaritas) y hermafroditas

o masculinas (concéntricas; corresponden con las centrales). El receptáculo es plano o convexo y está rodeado de una envoltura de brácteas (caliz) (Arbos-Lavila, 1992; Barrera *et al.* 2007).

Las lígulas de las flores pueden curvarse hacia arriba, hacia abajo, o hacia los dos sitios a la vez, dando lugar a diferentes formas de flores: curvadas, recurvadas, incurvadas, mixtas o sin ningún tipo de curva, denominadas radiales. Al mismo tiempo, estas lígulas pueden ser planas o más o menos tubulares, dando lugar a flores planas o tubulares (Arbos-Lavila, 1992).

La clasificación de los crisantemos puede hacerse aplicando diferentes caracteres: forma de la flor, tamaño de ésta o de la planta, forma de las lígulas, utilización, o número de semanas necesarias para la floración, etc. (Barrera *et al.*, 2007).

2.1.3. Clasificación Taxonómica

El género *Dendranthema* pertenece a la familia Asteraceae y comprende numerosas especies con floración en diferentes épocas del año. Según IAPT (2014) la clasificación taxonómica del crisantemo es la siguiente: Reino: Plantae, Phylum: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Asterales, Familia: Asteraceae, Género: *Dendranthema*, Especie: *D. grandiflorum*.

2.1.4. Importancia

De acuerdo con Panya y Saxena (2001) el crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) es una de las flores cultivadas para maceta y flor cortada con alta demanda en el mercado, la variación del color de la flor es su máxima atracción. Su producción para flor de corte, requiere de la provisión continua de material inicial, de excelente calidad fisiológica y sanitaria (Dole y Wilkins 1999; Fernández *et al.* 2007).

Las flores están disponibles en muchas formas y rango de colores como blanco, amarillo, rosado y lavanda, además de coralino, salmón, púrpura y rojo intenso (vino tinto), que son adecuados para todos los días y fiestas ocasionales a lo largo del año. Se usan en bouquet para agregar volumen, color y textura en arreglos florales. Las flores de cabeza pequeñas son excelentes para disecar (Otahola *et al.* 2001; Enríquez *et al.* 2005).

La producción es importante en países europeos, como los países Bajos, Gran Bretaña, Francia, Colombia, Estados Unidos y Canadá, donde, desde tiempos antaños, el cultivo se industrializa; en países como Japón la flor tiene un valor simbólico. En Europa Central, Japón y Estados Unidos el crisantemo tiene gran demanda, lo que ha generado estudios de mejoramiento genético con el fin de obtener cultivares con formas y colores diversos (Yamaguchi, 1987)

En México, el crisantemo es de gran importancia dentro de la floricultura como flor de corte, al ocupar el tercer lugar de las especies más demandadas después de las rosas y los claveles. En 2012 se reportaron 2,466.75 ha sembradas con una producción de 9, 655,152 t, que alcanzaron un valor de 1, 067,947 de miles de pesos, siendo el Estado de México, en particular el municipio de Texcoco de los primeros productores, principalmente de las variedades Harman e Indianápolis (SIAP-SAGARPA, 2013).

2.1.5. Variedades cultivadas para flor de corte

La clasificación de las diferentes variedades de crisantemo fue establecida en 1895 por la National Chrysanthemum Society de Londres, y se basa en el tipo de propósito o fin al que se destina la planta, teniendo en cuenta el tamaño de esta y sus características particulares (Arbos-Lavila, 1992). Estas variedades se clasifican en unifloras (una flor por tallo) o multifloras (varias flores por tallo). En las primeras se eliminan los botones laterales para dar lugar a una sola flor, son de tallo largo entre 75 cm y 1.5 m, este tipo se utilizan en la decoración de interiores y cementerios. Mientras que en las multifloras se promueve la

formación de varias flores, aunque en algunas variedades se elimina el botón floral principal; este último grupo es el más importante y del que se origina el mayor número de variedades (Salinger, 1991).

Según Larson (1994), para clasificar las variedades de crisantemo también se usa la forma de la inflorescencia, existen flores simples donde la inflorescencia está formada por un disco amarillo con flores tubuladas muy cortas con una o dos filas de flores liguladas; anémonas, donde las flores del disco se desarrollan más y las flores exteriores están dispuestas en varias filas; pompones con capítulos pequeños, flores liguladas poco desarrolladas, formando una bola y las decorativas que son flores radiales, pero las flores de las hileras exteriores son más ligeras, por último las flores grandes, en las cuales el diámetro de las inflorescencias es mayor de 10 cm y las flores del disco en la mayoría no aparecen.

2.1.6. Enfermedades del crisantemo

Según el concepto de enfermedad acuñado por Roberts y Boothroyd (1984), ésta resulta de “una serie de procesos fisiológicos perjudiciales originados por la interacción continua de la planta con un agente causal primario, que se manifiestan en sus tejidos y órganos por respuestas patológicas características llamadas síntomas”. El agente causal primario puede ser de naturaleza biótica y se denomina patógeno (plantas parásitas, nematodos, hongos, bacterias, espiroplasmas y fitoplasmas, virus y viroides), o abiótica (factores medioambientales como temperatura, luz, humedad, etc, nutricionales y químicos), en cuyo caso algunos autores la denominan fisiopatías o desórdenes fisiológicos.

La causa de una enfermedad en plantas es diversa, en su forma más simple incluye interacciones entre el agente, la planta y el ambiente biótico y abiótico mediadas por los atributos de ambos. En las enfermedades de origen biótico, son atributos dominantes la virulencia, densidad de inóculo del patógeno

(agente causal biótico), y la susceptibilidad de la planta; cuya interacción es modulada por la duración y condiciones favorables del ambiente biótico y abiótico. La resistencia es el atributo genéticamente regulado de la planta, que le permite restringir el crecimiento y/o la reproducción del patógeno y el desarrollo de la enfermedad que éste le puede ocasionar (Jiménez-Díaz, 1992).

El crisantemo, al igual que todo cultivo agrícola es afectado por plagas y enfermedades, que de no atenderse de manera adecuada y oportuna causan daños que impactan de manera negativa en la economía local o nacional.

Las enfermedades bacterianas más comunes en crisantemo son el tizón bacteriano ocasionado por *Erwinia chrysanthemi* Hellmers, agalla de la corona causada por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) y mancha bacteriana de la hoja cuyo agente causal es *Pseudomonas cichorii* (Arbos-Lavila, 1992; Aranda, 2002).

Las enfermedades virales también son frecuentes en el crisantemo; entre éstas se presentan el virus de la marchitez manchada del tomate (tomato spotted wilt virus o TSWV), virus del achaparramiento del crisantemo, virus de la aspermia del crisantemo (*Chrysanthemum aspermy cucumovirus* o CAV) y virus del mosaico del crisantemo (*chrysanthemum mosaic-B* (Q) carlavirus o CVB) (Albouy, 2000).

Las ocasionadas por hongos son: el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers), pudrición de las língulas o tizón cuyo agente causal es *Ascochyta chrysanthemi* Stevens, pudrición de la raíz ocasionada por *Phythium* sp., pudrición del tallo por el agente causal *Rhizoctonia solani* Kuhn, ahogamiento por *Verticillium alboatrum* Reinke & Berth., la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht., mancha foliar (*Alternaria* sp.), roya café ocasionada por *Puccinia tenaceti* DC., tizón foliar por *Septoria chrysanthemella* y roya blanca cuyo agente causal es *Puccinia horiana* Henn, ésta última enfermedad tiene mayor impacto ya que los

daños que causa en el follaje reducen la producción y calidad comercial (Horst y Nelson, 1997; Tlapal y Mendoza, 2002)

El hongo *Puccinia horiana* es un parásito obligado, no presenta huésped alternativo y de disemina especialmente en material vegetal vivo (biotrófo). También es conocido como roya blanca, afecta de manera importante la producción del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzveler.) para maceta y flor de corte, debido a que México no cuenta con suficientes variedades resistentes a esta enfermedad. El establecimiento y desarrollo del patógeno es favorecido por temperaturas entre 17 y 24 °C y humedad relativa superior a 96 %; en estas condiciones la germinación de esporas y penetración en los tejidos del hospedante ocurre en 4 o 5 h, y la manifestación de los primeros síntomas se puede observar a los 7 días en cultivares susceptibles (Firman y Martin, 1968).

Según Whipps (1993), a este hongo se le conocen dos tipos de esporas: 1) teliosporas, estructuras típicamente bicelulares que pueden soportar condiciones más secas y de menor temperatura que las basidiosporas y permanecer viables por un periodo de tiempo hasta de ocho semanas en condiciones adversas y 2) Basidiosporas o esporidias, estructuras muy sensibles a la desecación, necesitan humedades relativas de más del 90 % y una película de agua en la superficie de la hoja para poder germinar.

El ciclo biológico del hongo, *P. horiana* (Figura 1) difiere del resto de royas en que es microcíclica autoica; ello significa que durante su reproducción sexual no lleva a cabo la plasmogamia (unión entre micelio + y -) y sólo ocurre cariogamia (fusión nuclear) en las teliosporas, seguida inmediatamente por la meiosis que da origen a cuatro núcleos haploides que se distribuyen en dos basidiosporas; por tanto, cada basidiospora tiene dos núcleos y al germinar origina un micelio dicariótico que contiene dos núcleos hermanos (Hirasuka y Sato, 1982; Alexopoulos y Mims, 1985). Dado que *P. horiana* es una roya que se autofertiliza todas sus basidiosporas son genéticamente uniformes, a menos

que ocurra una mutación o un intercambio de núcleos de micelios genéticamente diferentes, mediante anastomosis (fusión de hifas) (Redemaker y De Jong, 1987; García-Velasco *et al.*, 2007); a través de estos mecanismos se pueden generar nuevas razas en este tipo de royas (Anikster y Wahl, 1979; Krebs, 1985).

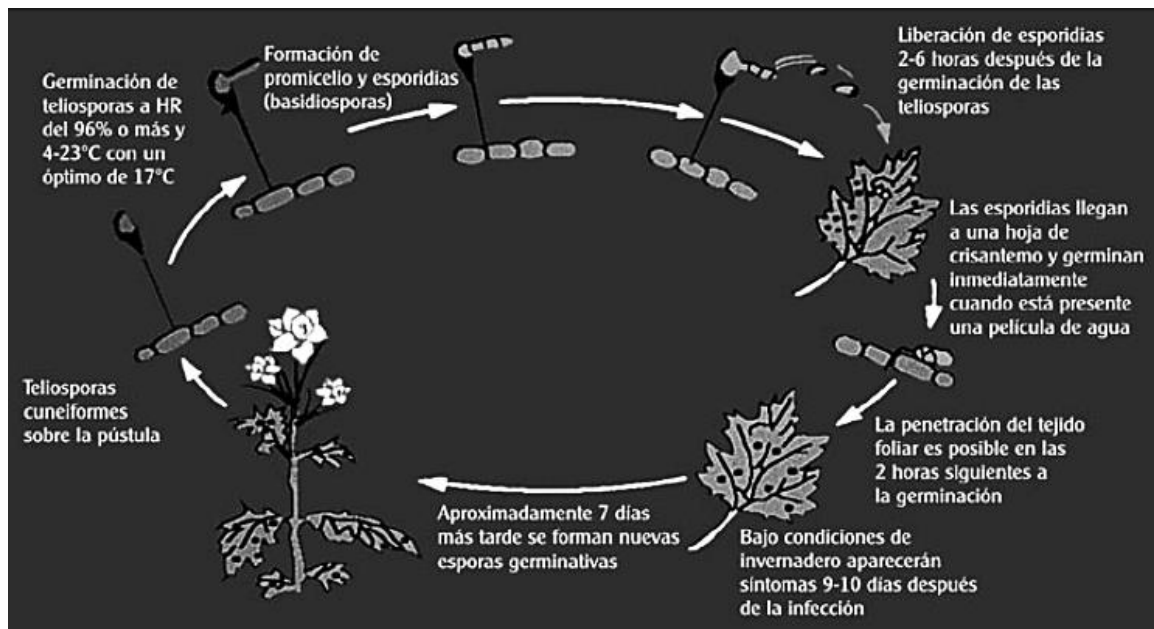


Figura 1. Ciclo de vida de la roya blanca del crisantemo: *Puccinia horiana* P. Henn. Tomado de Rojas-Vega (2005).

Los síntomas de infección se observan por encima de la hoja (haz) como manchas de color verde amarillento, de forma circular, con bordes bien definidos y presentan hundimiento. Por debajo de la hoja (envés) sobresalen pústulas que dan la apariencia de un grano y son de color blanco-amarillento cremoso, cuando liberan las esporidias se tornan de color café claro (Rojas-Vega, 2005).

2.2. Estrés en plantas

2.2.1. Concepto de estrés

En biología el estrés sería un factor externo que afecta negativamente un organismo. El término estrés en el marco de la fisiología vegetal refleja la magnitud de presión ambiental que fuerza al cambio en la fisiología de una planta (Nielsen y Orcutt, 1996). Levitt (1980) definió el estrés como: cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos.

2.2.2. Tipos de estrés

Existen factores ambientales de estrés que causan daño a los cultivos y disminuyen su rendimiento considerablemente. En general, estos pueden ser clasificados en físicos, químicos y bióticos, siendo los dos primeros agrupados bajo el término de “estreses abióticos”. Entre los factores físicos se encuentra el estrés por déficit o exceso de agua, temperaturas altas-bajas y radiación UV. Entre los factores químicos la contaminación atmosférica con metales pesados, toxinas, salinidad etc. (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Finalmente, entre los factores bióticos están animales, otras plantas (por competencia, alelopatía, etc.), microorganismos (bacterias, hongos), y otros agentes fitopatógenos como los virus y viroides (Nielsen y Orcutt, 1996).

2.2.3. Importancia del estudio del estrés en plantas.

Existen numerosas razones para estudiar la fisiología de las plantas bajo condiciones de estrés, según Tambussi (2004) son: 1) el conocimiento de los factores de estrés en los vegetales, crucial para la elaboración de modelos mecanísticos de naturaleza predictiva (por ejemplo, el estudio de los posibles efectos del cambio climático); 2) desde una perspectiva ecofisiológica, el análisis de la interacción de las plantas con factores ambientales es fundamental para comprender la distribución de las especies en los diferentes ecosistemas; y 3) el rendimiento de los cultivos está fuertemente limitado por el impacto de los diferentes estreses ambientales (Nielsen y Orcutt, 1996).

Por otra parte, es crucial comprender los procesos fisiológicos subyacentes en la tolerancia de los cultivos al estrés para establecer programas de mejora genética, tradicionales y biotecnológicos (Ali Dib *et al.*, 1990).

2.2.4. Mecanismos de respuesta de las plantas al estrés

Los ciclos estrés/respuesta son situaciones que se dan de forma rutinaria a lo largo de la vida de las plantas. El concepto de estrés en sí mismo es relativo, ya que una determinada situación medioambiental puede ser estresante para una especie y no para otras (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En una escala temporal, la respuesta de las plantas al estrés puede dividirse en tres fases (Lambers *et al.*, 1998):

- 1) Alarma: es el efecto inmediato ocurre de segundos a días. Cuando se presenta el estrés, las plantas reaccionan reduciendo o deteniendo sus funciones fisiológicas básicas. Esta reacción está relacionada con la activación de los mecanismos de los que dispone para hacer frente al estrés. Las plantas que no poseen mecanismos adecuados de defensa o de respuesta frente al estrés experimentan daños irreversibles y mueren.
- 2) Aclimatación: es el ajuste morfológico y fisiológico realizado por la planta para compensar el mal funcionamiento de la misma después de la exposición al estrés. Ocurre en una escala de días a semanas. La activación de los mecanismos defensivos o de respuesta conduce al ajuste del metabolismo celular a las nuevas condiciones, así como la activación de los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y a la expresión de las adaptaciones morfológicas.
- 3) Adaptación: es la respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones que conduce a una compensación morfológica y fisiológica. Ocurre tras muchas generaciones.

Las manifestaciones de las respuestas de las plantas frente a condiciones ambientales adversas implica una secuencia compleja de acciones (Azcón-Bieto y Talón, 2008): en primer lugar se produce la percepción del estímulo estresante, seguida del procesamiento de la señal de estrés, que implica tanto su amplificación e integración en la ruta o rutas de transmisión de la información, y finalmente tiene lugar la regulación de la expresión génica.

El estímulo externo de peligro se transforma en una señal interna, de naturaleza física o química. La cual se transmite a través de cascadas o rutas de señalización hasta el núcleo de las células, donde se producen los cambios en la expresión génica necesarios para hacer frente al estrés. La percepción del estrés por la planta continúa siendo el aspecto menos conocido de esta secuencia de acciones (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Las condiciones adversas inducen cambios transitorios en los niveles de determinados iones (calcio) y moléculas (lípidos, especies reactivas de oxígeno, especies antioxidantes, óxido nítrico) que advierten a la célula de que ha sido detectada una señal de estrés. Las hormonas como el ácido abscísico participan de forma activa en la señalización de muchas de las respuestas al estrés abiótico (Toumi *et al.*, 2010). Otras hormonas, como el etileno, el ácido salicílico y el ácido jasmónico, están implicados en la transmisión de la señal de infección por patógenos (Dong, 1998; Dempsey *et al.*, 1999; Jameson y Clarke, 2002; Vlot *et al.*, 2009).

De acuerdo con Azcón-Bieto y Talón (2008), algunas respuestas al estrés son:

- 1) Los cambios en la actividad hormonal. Además de participar en la percepción de la señal, la modificación de los niveles hormonales puede incrementar la resistencia al estrés.

- 2) Las alteraciones en el desarrollo de las plantas. Normalmente se aprecia un menor desarrollo vegetativo, así como una reducción del número de estructuras reproductivas que aceleran su desarrollo para asegurar la siguiente generación.
- 3) La muerte celular y la abscisión de los tejidos dañados que elimina el foco de infección en estrés biótico, disminuye la superficie de transpiración y permite reciclar nutrientes.
- 4) La síntesis de nuevas proteínas, como la ubiquitina y las proteasas implicadas en la degradación de las dañadas, y las proteínas de choque térmico, inducidas no sólo frente a temperaturas extremas, que actúan como chaperonas, plegando proteínas desnaturalizadas por el estrés y previniendo la formación de agregados proteicos irreversibles.
- 5) El aumento o la disminución en la actividad de rutas alternativas de disipación y obtención de energía, como la fermentativa.
- 6) La síntesis y acumulación de compuestos osmoprotectores que actúan restaurando el potencial hídrico o bien como protectores de la estructura de membranas y macromoléculas.
- 7) La síntesis de metabolitos secundarios protectores, como fenilpropanoides.

2.3. Estrés abiótico en plantas

Las condiciones ambientales son percibidas por los distintos órganos de la planta, y esta información se transmite internamente mediante la modulación de señales que activan respuestas de desarrollo y crecimiento vegetativo (Talón *et al.*, 1991). Las respuestas de la planta dependen del genotipo y del estado de desarrollo de la misma al momento del estrés, así como de la duración y la severidad de los factores ambientales que lo provoquen. Una vez activadas estas respuestas, el crecimiento propiamente dicho, se verá limitado por el aporte de nutrientes, elementos minerales y carbohidratos (Gillapsy *et al.*, 1993).

Hay diversas condiciones ambientales adversas que pueden provocar estrés en la planta (Mano, 2002): la sequía, la salinización del suelo y/o del agua de riego, las temperaturas extremas, el viento fuerte, el encharcamiento del suelo, etc.

2.3.1. Estrés hídrico por sequía

La déficit hídrico por sequía ha sido objeto de preocupación en los principales lugares del mundo, por su influencia en la producción de alimentos así como la degradación de recursos edáficos (Blum, 1988). Científicos han llegado a la conclusión que las temperaturas están en constante aumento y esto impactará sin duda en la agricultura.

Año tras año, gran parte de los cultivos de la mayoría de los agricultores del mundo se ven afectados por la sequía; en algunos casos las pérdidas son enormes, incluso la falta de agua en poca medida puede reducir el rendimiento y afectar la posibilidad de los agricultores de recuperar las inversiones hechas en los cultivos. Por este motivo, los agricultores siembran aquellos cultivos que mejor se adapten a la cantidad de agua disponible (FAOSTAT, 2014).

En México, la sequía es el principal factor que limita la productividad de los cultivos anuales. El daño que pueda ocasionar la falta de agua depende particularmente de la etapa de desarrollo de la planta en la que ocurra; las etapas más críticas son la vegetativa y las cercanas a la floración (Nilsen y Orcutt, 1996).

Cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés hídrico pierden agua y su rendimiento disminuye. Esto ocurre de forma simultánea a una disminución del potencial de turgencia y del potencial osmótico (Blum, 2009). Sin embargo, las plantas que poseen ajuste osmótico no pierden su turgencia debido a que son capaces de acumular de forma activa sustancias orgánicas que permiten disminuir el potencial de solutos, y en consecuencia evitan el desarrollo anormal en la fisiología (Parry *et al.*, 2005). El déficit hídrico es sin

duda la condición ambiental transitoria y extrema a la que más frecuente se ven sometidas las plantas, es por esto que a lo largo de su historia evolutiva, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa contra la desecación (Taíz y Zeiger, 2006).

Adicionalmente, la sequía incide directamente sobre la fotosíntesis así como sobre los niveles de proteínas y expresión de la enzima Rubisco; y puede aumentar o disminuir según el tipo de estrés y genotipo de la planta (Nilsen y Orcutt, 1996). Proteínas solubles en plantas como: las proteínas de shock térmico (HSPs), proteasas, enzimas de biosíntesis de lípidos y enzimas de degradación de almidón son capaces de regular la respuesta tanto al estrés biótico como al abiótico (Turner, 1986).

2.4. Estrés biótico en plantas

2.4.1. El reconocimiento planta-patógeno

Las plantas pueden ser atacadas por patógenos con diferentes estilos de vida. Los patógenos biotrofos son aquellos especializados en alimentarse y crecer en el interior de tejidos vivos (Whenham *et al.*, 1986). De acuerdo con McDowell y Dangl (2000), el ácido salicílico (SA, de Salicylic Acid) es la principal hormona implicada en las respuestas defensivas frente a patógenos biotrofos, por su importancia en esta tesis, se dedicará un apartado posterior a dicha hormona. Los patógenos necrótrofos provocan la muerte de la célula hospedadora, mediante la producción de toxinas a partir del tejido muerto. Estas diferencias provocan que los biotrofos establezcan una relación mucho más íntima con sus hospedadores. De hecho, muchos de ellos han desarrollado la capacidad de vivir en el espacio intercelular del mesófilo, un ambiente muy rico en nutrientes. En patógenos obligados, esta relación es tan extrema que no pueden ser cultivados en un medio de cultivo artificial. Los necrótrofos, al contrario que los biotrofos, si pueden vivir como saprófitos fuera de sus hospedadores, alimentándose de materia orgánica muerta (Agrios, 2005; De Wit, 2007).

Todas las células vegetales parecen tener una habilidad innata para reconocer a los patógenos y activar una respuesta defensiva adecuada (Kim *et al.* 2008). Los mecanismos de defensa constitutivos actúan deteniendo la entrada de los patógenos en los tejidos de la planta. Funcionan de forma constante, utilizando estrategias químicas o estructurales. Las primeras consisten en la producción de sustancias tóxicas diversas contra los organismos patógenos, como los alcaloides, fenoles y polifenoles, aceites esenciales y terpenos en general. Las barreras estructurales consisten en la producción de una cubierta protectora (cutícula) en la superficie de todos los tejidos (Mörschbacher *et al.*, 1990; Carver *et al.*, 1994; Mauch-Mani y Slusarenko, 1996).

Si a pesar de estas barreras el patógeno entra en la planta, ésta activa mecanismos de defensa con el fin de detener la infección, estos se denominan mecanismos de defensa inducida por patógenos. Es una reacción más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más suave a nivel sistémico, en los tejidos no infectados, lo cual permite potenciar las barreras, tanto químicas como estructurales, que los tejidos vegetales tienen de forma constitutiva (Heath, 2000).

Si los patógenos son capaces de superar barreras constitutivas como la cutícula y la pared celular, la planta activará una serie de mecanismos inducibles a nivel local y sistémico (Shah, 2009). En la respuesta inmune inducida, es posible diferenciar dos niveles (Figura 2).

La primera respuesta activa de la planta se produce gracias a un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, de Pattern Recognition Receptors) situados en la superficie de la célula vegetal. Estos receptores pueden detectar la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, de Pathogen Associated Molecular Pattern). Como consecuencia de esto se induce la denominada inmunidad activada por PAMPs (PTI, de PAMP Triggered Immunity) (Jones y Dangl, 2006). Sin embargo, los microorganismos

han desarrollado estrategias para superar esta respuesta defensiva, tanto mediante interferencias en el reconocimiento de los PAMPs como, a través de la secreción de proteínas efectoras en el interior del citoplasma de la célula vegetal. Esta respuesta de los patógenos recibe el nombre de susceptibilidad activada por efectores (ETS, de Effector Triggered Susceptibility) (Jones y Dangl, 2006).

Como segunda respuesta activa, las plantas han desarrollado mecanismos más especializados como la denominada inmunidad activada por efectores (ETI, de Effector Triggered Immunity). Por este mecanismo, la planta es capaz de reconocer de forma directa o indirecta muchos de estos efectores gracias a las proteínas codificadas por genes R (de Resistance), principalmente a las tipo NB-LRR (de Nucleotide Binding–Leucine Rich Repeat), (Jones y Dangl 2006). Cabe destacar que esta respuesta mediada por las NB-LRR es efectiva frente a patógenos biotrofos o hemibiotrofos, pero no frente a necrótrofos (Glazebrook, 2005).

Evidentemente, con la ETI las plantas no han conseguido una resistencia plena. La selección natural dirige a los patógenos hacia nuevas vías que les permitan suprimir la ETI, modificando o eliminando los efectores desencadenantes o generando otros nuevos (De Wit, 2007). Al mismo tiempo, esto dirigirá a las plantas a reconocer estos nuevos efectores. De esta forma, el “tira y afloja” entre patógeno y hospedador se mantendrá mientras ambas especies co-evolucionen.

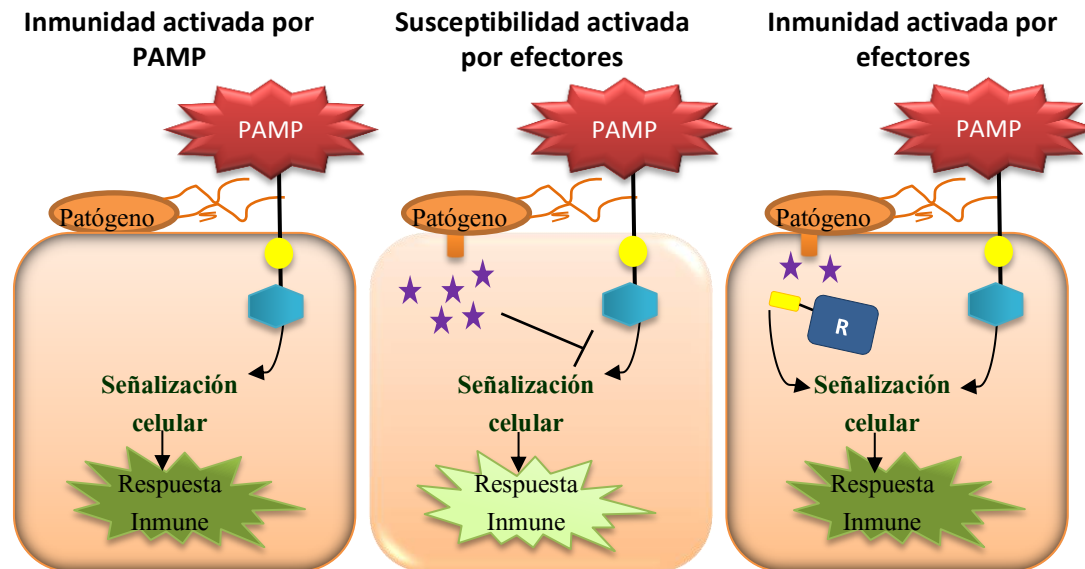


Figura 2. Modelo del despliegue de la resistencia bacteriana en plantas.

2.4.2. Respuestas específicas al patógeno

La activación de las proteínas NB-LRR provoca una red de respuestas al patógeno que se interrelacionan y que es desplegada, al menos en parte, para diferenciar el ataque del patógeno biotrófo de aquel necrótrofo (Jones y Dangl 2006).

La percepción del patógeno activa una serie de respuestas de defensa que incluyen flujo de iones Ca^{2+} , alcalinización del espacio extracelular, estallido oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de NO y expresión de genes asociados a defensa (Nurnberger y Scheel, 2001). Las funciones de estos genes incluyen la biosíntesis de ácido salicílico (SA), la biosíntesis de etileno, reforzamiento de la pared celular, lignificación, producción de agentes antimicrobianos y un tipo de muerte celular denominada respuesta hipersensible (HR) en el lugar de entrada del patógeno (Dangl y Jones, 2001).

Entre la expresión de genes relacionados con defensa cabe destacar la de algunas familias génicas que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Dempsey & Klessig 1994). Las primeras PRs se detectaron

en experimentos de susceptibilidad (con producción de HR) con plantas de tabaco y el virus TMV (Van Loon y Van Kammen 1970). Aunque la generación de HR es un mecanismo que comparten la mayoría de genes R, es posible la activación de defensas sin la mediación de dicha respuesta, sobre todo en la defensa frente a otros patógenos distintos de los microorganismos (Bent y Mackey 2007). También es posible encontrar una respuesta parecida a la HR tras el reconocimiento de MAMPs por parte de la planta (Vleeshouwers *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha observado que la inoculación con un patógeno activa también la muerte celular en hojas distales no inoculadas. Este efecto se conoce como micro HR (Álvarez *et al.*, 1998).

La expresión de genes de defensa que precede a la percepción del patógeno también incluye la producción de compuestos fenólicos, con características antimicrobianas como las fitoalexinas (Thomma *et al.*, 1999).

2.4.3. Resistencia frente a patógenos biotrofos

2.4.3.1. Respuestas basadas en ácido salicílico

El SA es un derivado fenólico sintetizado por las plantas cuando son atacadas por patógenos biotrofos. Su actividad como hormona se ve reflejada en la germinación de las semillas, establecimiento de la plántula, crecimiento celular, respiración, cierre estomatal, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico, termotolerancia basal, nodulación en legumbres y productividad de frutos (Vlot *et al.*, 2009). El SA es, además, una señal clave en la regulación de la termogénesis y la resistencia de plantas frente a patógenos, generalmente biotrofos.

El SA puede ser generado vía dos rutas enzimáticas distintas que requieren el metabolito primario corismato (Wildermuth *et al.*, 2001). En la primera, el derivado L-fenilalanina del corismato es transformado en ácido cinámico a través de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas inicialmente por la fenilalanina amonio liasa (PAL) y que posteriormente será transformado en SA

vía intermediarios del benzoato o del ácido coumárico. En la segunda, el corismato también puede ser convertido en SA vía isocorismato en un proceso compuesto de dos pasos catalizados por las enzimas isocorismato sintasa (ICS) y la isocorismato piruvato liasa (IPL). La mayoría del SA inducido por el patógeno es sintetizado de esta última manera en *Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana* y tomate (Wildermuth *et al.*, 2001).

Para poder desentrañar la ruta de defensa en la que interviene el SA como señal principal, se han realizado rastreos en busca de mutantes susceptibles o resistentes a patógenos biotrofos, para los cuales la resistencia basada en SA parece clave.

Uno de los elementos más importantes en la regulación de SA obtenido en mutantes afectados en la señalización por SA es el gen NPR1/NIM1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1/NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1) (Dong, 2001). Las plantas *npr1* son más susceptibles a oomicetos y patógenos biotrófos como *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 4326 (Cao *et al.*, 1994).

NPR1 es un gen que codifica para una proteína de 65 kD que contiene repeticiones de la estructura ankyrin (Cao *et al.*, 1997). Regula la unión de factores de transcripción TGA para el motivo AS-1 de la PR-1, gen relacionado con la patogénesis, que conduce a la regulación transcripcional de genes de defensa, además controla la aparición de resistencia sistémica adquirida (Ndamukong *et al.*, 2007).

La función de NPR1 es requerida para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR). Cabe señalar que SAR es un tipo de resistencia inducida que tiene lugar tras el ataque de un patógeno necrotizante y cuyo efecto se produce en tejido sistémico de la planta, protegiéndola temporalmente frente a posteriores infecciones microbianas (Pieterse y Van Loon, 2004). Este

efecto de resistencia a distancia coincide con el aumento de SA y la expresión de genes de defensa, como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), en dicho tejido sistémico.

La activación de la ruta dependiente de SA provoca la monomerización de NPR1, que se encuentra en forma oligomérica en el citosol, y su translocación al núcleo (Kinkema *et al.*, 2000). Una vez en el núcleo, NPR1 promueve la unión de los factores de transcripción TGAs a los promotores de los genes de respuesta a SA (Fan y Dong, 2002).

Se ha comprobado que la sobreexpresión de NPR1 no tiene ningún efecto *per se* en la inducción de PRs o en resistencia (Cao *et al.*, 1997) y que para ello es necesario un cambio redox que activa la función de NPR1 (Mou *et al.*, 2003). Este cambio redox es producido por la presencia de SA, inducida por el ataque de un patógeno o por la aplicación directa de SA o uno de sus análogos.

Van Loon *et al.* (2006) han reportado como genes marcadores de la activación de SA a los genes relacionados con la patogénesis PR1, PR2 y PR5, que son indicio de la respuesta de defensa mediada por SA.

Es importante mencionar que la producción de las PR en las partes no infectadas puede prevenir la infección de nuevos ataques, estas se clasifican en 17 familias de acuerdo a sus propiedades y función (Cuadro 1), que incluye β -1-3-glucanasas, quitinasa, peroxidasas, defensinas, tioninas, etc. (Van Loon y Van Strein, 1999).

Cuadro 1. Clasificación de algunas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Van Loon y Van Strein, 1999)

Familia	Miembro tipo	Propiedades
PR1	Tabaco PR1-a	Desconocida, Antifúngica
PR2	Tabaco PR-2	β -1-3-glucanasa
PR3	Tabaco P, Q	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR4	Tabaco R	Quitinasa tipo I, II
PR5	Tabaco S	Parecida a Thaumatina
PR6	Jitomate Inhibidor I	Inhibidor de proteinasa
PR7	Jitomate P69	Endoproteinasa
PR8	Pepino quitinasa	Quitinasa tipo III
PR9	Tabaco “peroxidasa, formación de lignina”	Peroxidasa
PR10	Perejil “PR1”	Parecido a Ribonucleasa
PR11	Tabaco “clase V” quitinasa	Quitinasa tipo I
PR12	Rábano Rs-AFP3	Defensina
PR13	Arabidopsis TH12.1	Tionina
PR14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos
PR15	Cebada OxOa	Oxalato oxidasa
PR16	Cebada OxOLP	Parecida a Oxalato oxidasa
PR17	Tabaco PRp27	Desconocida

2.4.4. Resistencia frente a patógenos necrótrofos

2.4.4.1. Respuestas basadas en ácido jasmónico y etileno

Las rutas de señalización de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) tienen una función preponderante en la interacción planta-patógeno. Estas hormonas generalmente actúan juntas en la defensa contra patógenos necrótrofos (Glazebrook, 2005). Los genes asociados con la ruta JA y ET son usados como

marcadores para determinar el papel de estas rutas en la interacción planta-patógeno, incluyendo a genes como PDF1.2 (PR12), PR3, PR4 y PR13 (THI2.1) (Derksen *et al.*, 2013).

En particular, los jasmonatos son oxilipinas que actúan como moléculas señalizadoras con un papel clave en la regulación de procesos metabólicos, reproducción y defensa frente a patógenos y herbívoros (Devoto & Turner, 2003). El JA se sintetiza a partir del ácido α -linoleico y a través de una ruta enzimática que comienza en el cloroplasto y que incluye reacciones de oxigenación, ciclación, reducción y por último de β -oxidación (que tiene lugar en el peroxisoma), dando lugar al ácido jasmónico (Browse, 2009). Al igual que en el caso de la regulación por SA, en el caso de la hormona JA también existe un gen requerido para muchas de las respuestas dependientes de JA en diversas especies de plantas, denominado COI1 (CORONATINE INSENSITIVITY 1) (Li *et al.*, 2004). El descubrimiento de este gen tuvo lugar en un rastreo para mutantes insensibles a la virulencia de la toxina coronatina.

Las proteínas JAZ actúan como represores de genes de respuesta a JA con funciones probablemente redundantes entre los miembros de la familia (Browse, 2009). Además de COI1, casi todas las proteínas de esta familia también son capaces de interaccionar con MYC2 (codificado por el gen JIN1; JASMONATE INSENSITIVE 1). Esta proteína es su único efector conocido y quien reprime su capacidad de activación de genes regulados por JA, particularmente aquellos que son inducidos en respuesta a herida o al ataque de insectos (Lorenzo *et al.*, 2004). Sin embargo, MYC2 reprime varios genes que son inducidos en respuesta a patógenos por la acción del factor de transcripción ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1) (Browse, 2009), que reprime genes de respuesta a herida.

Los genes ERF fueron caracterizados en primer lugar por su inducción por etileno (Lorenzo *et al.*, 2003). Además de su papel en defensa, el etileno es una

hormona que media multitud de mecanismos en el desarrollo y crecimiento de las plantas, procesos tales como la germinación, senescencia, elongación celular y maduración del fruto (Kieber, 1997). Las señalizaciones por etileno y JA son necesarias para la expresión de ERF1, confirmando la conexión entre la señalización de ambas hormonas. La expresión constitutiva de ERF1 induce la expresión de genes de defensa en mutantes alterados en la señalización por JA o etileno (ET) (*coi1* y *ein2* (ETHYLENE INSENSITIVE 2) respectivamente) (Lorenzo *et al.*, 2003).

Otra conexión entre JA y etileno en procesos de defensa surge del descubrimiento de que una enzima JAR1 recombinante sintetiza el JA conjugado con ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato, precursor activo del etileno), síntesis que podría ser relevante en la interacción entre la señalización de JA y etileno en la defensa de plantas frente a patógenos necrótrofos (Staswick y Tiryaki, 2004). Ambos inducen la acumulación de marcadores antimicrobianos como la proteína PDF1.2 (Xu *et al.*, 1994). Sin embargo, dentro de la defensa frente a patógenos necrótrofos existen algunas divergencias con respecto a la función de JA y ET. Por ejemplo la resistencia frente al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* requiere de la función de COI1 y EIN2, mientras que la resistencia a *Alternaria brassicicola* parece independiente de la función de EIN2 (Glazebrook, 2005). La señalización de defensa modulada por ET incluye receptores de etileno que son capaces de activar una cascada de quinasas MAPK, cuya señal es transmitida a EIN2 y que permite la acumulación del factor de transcripción EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3) (disminuyendo su degradación vía ubiquitinación dependiente de proteosoma mediada por SCFEBF1/2) y promoviendo a ERF1 que en último extremo da lugar a la regulación de la expresión génica (Kepinski y Leyser, 2003).

La detección temprana de MAMPs, DAMPs o efectores extracelulares por parte de receptores de la planta puede generar una reacción de inmunidad tipo PTI que la protege frente al ataque patogénico. En caso de que el microbio introduzca sus efectores en la célula, el sistema de defensa de la planta deberá actuar en función del tipo de patógeno, activando la respuesta mediada por SA en caso de biotrofos o las dependientes de JA y ET en caso de necrótrofos (Figura 3). Como se puede observar, las rutas de SA y JA poseen efectos inhibitorios recíprocos, aunque es posible que sea necesaria la modulación de varias respuestas hormonales para una resistencia adecuada a un patógeno determinado. Algunos azúcares como la sacarosa y la trehalosa, se han relacionado con la resistencia a patógenos en plantas, encontrándose esta última en mayor cantidad en plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. Sin embargo, en las plantas, su papel preciso en muchos organismos es poco claro.

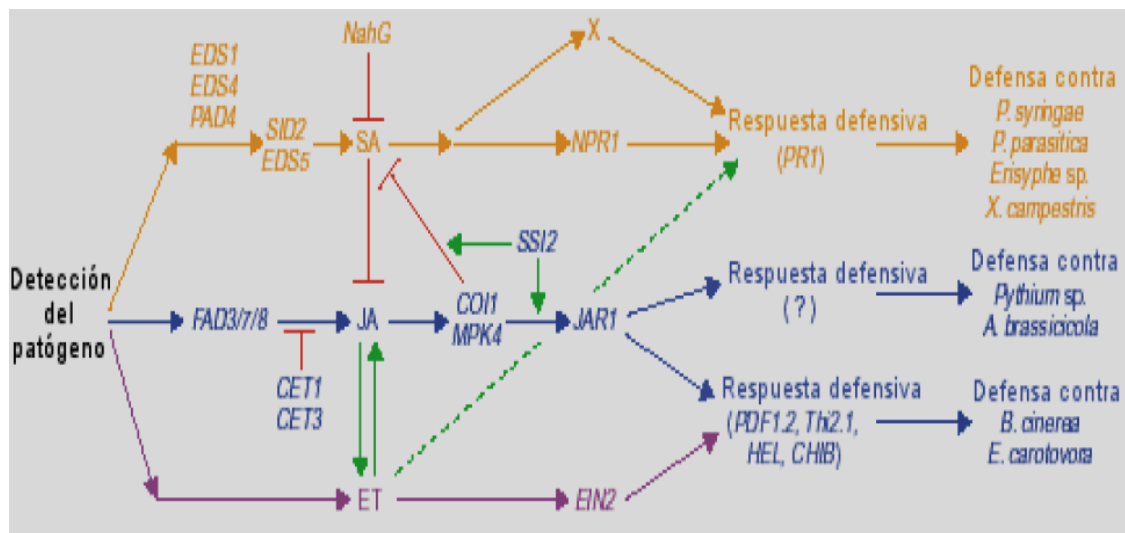


Figura 3. Principales rutas de resistencia de las plantas y sus interacciones. Adaptada de Kunkel y Brooks (2002).

2.5. Trehalosa

2.5.1. Estructura y distribución de la trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranososa) (Figura 4), es un carbohidrato no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas mediante un enlace glucosídico α -(1,1) (Matthew *et al.*, 2008), dicho enlace

conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa anulando su poder reductor (Paiva y Panek, 1996). Aunque hay tres posibles anómeros de trehalosa, que son α,β -1,1-; β,β -1,1- y α,α -1,1-, sólo la α,α -trehalosa ha sido aislada y biosintetizada en organismos vivos.

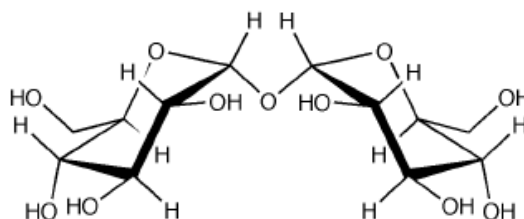


Figura 4. Estructura del isómero de trehalosa encontrado de forma natural (α,α -1,1-trehalosa).

Este disacárido está ampliamente distribuido en distintos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y en menor cantidad plantas superiores, donde puede servir como fuente de energía y carbono (Singer & Lindquist, 1998). En levaduras y plantas puede servir como molécula de señalización para dirigir o controlar ciertas rutas metabólicas, sin embargo, puede afectar el crecimiento (Elbein *et al.*, 2003). En adición se ha demostrado que la trehalosa puede proteger estructuras celulares como membranas y proteínas presentes en el citosol de la inactivación o desnaturalización causada por condiciones de estrés, incluyendo desecación, deshidratación, calor, frío y oxidación (Gélinas *et al.*, 1989).

Un ejemplo que sugiere el papel de la trehalosa como fuente de carbono y/o energía ocurre en esporas y *macrocistos* (esporas con pared celular resistente) de *Dyctyostelium mucoroides* (con aproximadamente 7 % de trehalosa con base en peso seco) así como en las ascoesporas de *Neurospora tetrasperma* (con un 10 % de trehalosa), debido a que cuando estas esporas germinan, la trehalosa rápidamente desaparece (Elbein *et al.*, 2003).

Además, la trehalosa protege estructuras celulares como membranas y proteínas presentes en el citosol cuando la célula no se encuentra en condiciones óptimas de cultivo (Singer & Lindquist, 1998). También hay evidencia de la trehalosa como sustancia de reserva celular (Elbein *et al.*, 2003). El disacárido trehalosa está involucrado en la respuesta al estrés en muchos organismos. Sin embargo, en las plantas, su papel preciso permanece poco claro (Fernández *et al.*, 2010).

La sacarosa es uno de los mayores disacáridos no reductores en plantas, podría ser un análogo de la trehalosa en términos de algunas de sus funciones (Fernández *et al.*, 2010). Muchas plantas producen homólogos de sacarosa tal como rafinosa ($\text{Gal}\alpha 1\text{-6Sacarosa}$) y estaquiosa ($\text{Gal}\alpha 1\text{-6Gal}\alpha 1\text{-6Sacarosa}$); que estabilizan y protegen células contra estrés (Elbein *et al.*, 2003). Se cree que la trehalosa y sus oligosacáridos podrían tener funciones similares.

2.5.2. Biosíntesis de la trehalosa

Aunque existen cinco rutas diferentes de síntesis de la trehalosa en bacterias, hongos, levaduras y algas, la biosíntesis de la trehalosa en plantas superiores solo ocurre a través de una vía en la que intervienen dos enzimas: la trehalosa-P-sintasa (TPS) y la trehalosa-P-fosfatasa (TPP), esta vía se denomina TPS/TPP y también se encuentra en bacterias donde se le conoce como vía OtsA-OtsB (Figura 5). El primer paso es catalizado por TPS, involucra la unión de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa para producir trehalosa-6-fosfato (T-6-P), el siguiente paso lo lleva a cabo la TPP, que desfosforila la T-6-P para transformarla en trehalosa y fosfato inorgánico (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

En el reino vegetal, la mayoría de las especies no acumulan cantidades considerables de trehalosa y debido a la falta de reportes en la mayoría de las plantas se llevó al supuesto de que este disacárido era de poca relevancia. Sin embargo, en plantas superiores como *Myrothamnus flabellifolius*, planta de la resurrección *Selaginella lepidophylla* y en algunos pastos nativos de México

como *Sporobulus astrovirens*, se logró detectar la presencia de trehalosa con métodos tan sensibles como el HPLC (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2010)

La primera publicación sobre la posible existencia de la vía de biosíntesis de trehalosa en las plantas ocurrió cuando se aisló el gen AtTPS1 de *Arabidopsis thaliana*, capaz de complementar la actividad catalítica en la doble mutante tps1D/tps2D de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* (Blázquez *et al.*, 1998).

Más tarde se encontró, analizando el genoma de *A. thaliana*, una familia multigénica de genes codificantes de TPSs y TPPs. Un total de 11 genes homólogos de TPS, se dividieron en clase I y II. La clase I posee un dominio catalítico altamente homólogo con OtsA de *E. coli* y con ScTPS1 de *S. cerevisiae*; mientras que en la clase II, la región amino tiene menor homología a la TPS1 de los microorganismos mencionados, pero en cambio contiene un dominio carboxilo con mayor homología a OtsB y ScTPS2 (Leyman *et al.*, 2001). Respecto a los homólogos TPP (OtsB en *E. coli*) se han identificado 10 genes, de los cuales solo se ha demostrado actividad catalítica para AtTPPA y AtTPPB mediante complementación de la mutante tps2D de la levadura (Voguel *et al.*, 1998).

Por otro lado, la vía de degradación de la trehalosa se lleva a cabo por la trehalasa, enzima que rompe la trehalosa para formar dos residuos de glucosa. Este proceso ha sido encontrado en todos los organismos que sintetizan trehalosa, aun cuando en levaduras coexisten distintas formas de trehalasa. Se ha propuesto que las funciones principales de la biosíntesis de trehalosa son proteger contra condiciones ambientales estresantes (Sano *et al.*, 1999) y la regulación del metabolismo (Paul *et al.*, 2008).

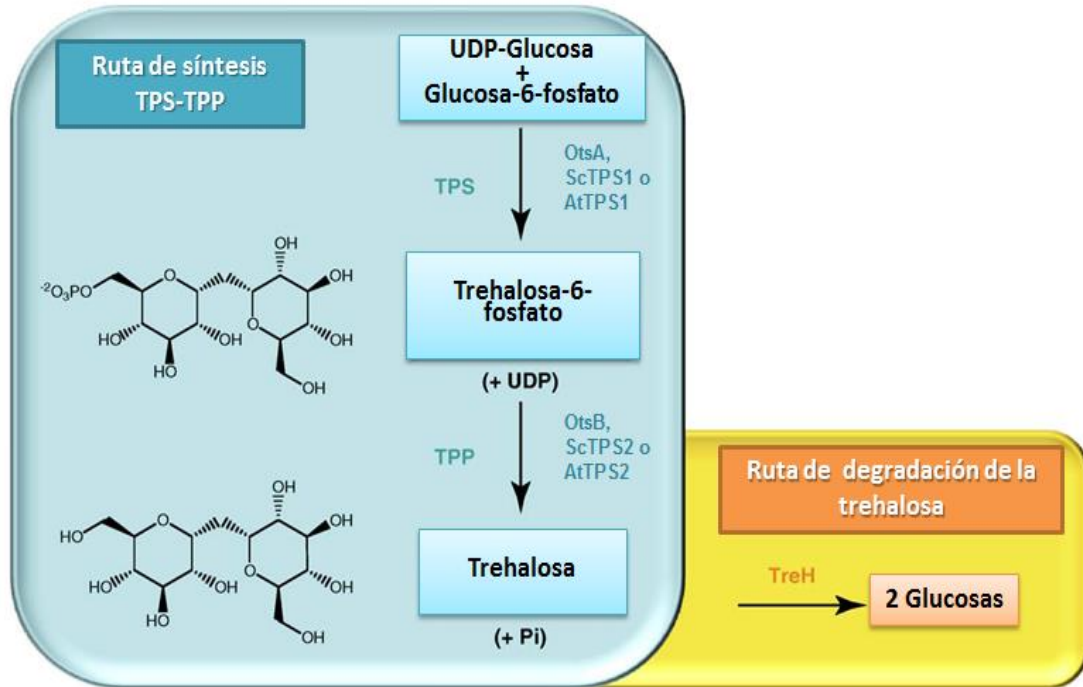


Figura 5. Ruta de biosíntesis de la trehalosa TPS/TPP u OtsA/OtsB y ruta de degradación por la trehalasa, produciendo dos moléculas de glucosa

2.5.3. Mecanismos de protección de la trehalosa

La trehalosa y la sacarosa son ambos disacáridos no-reductores que podrían tener considerables similitudes en síntesis y función (Figura 6). Ambas son almacenadas en el citosol de las células y pueden estar presentes en células en altas concentraciones dependiendo de varias condiciones ambientales (Matthew *et al.*, 2008). Cuando cualquiera de estos oligosacáridos son presentes en altas concentraciones, las células llegan a ser bastante resistentes a una variedad de condiciones de estreses, incluyendo calor, deshidratación, estrés por oxígeno, etc. En plantas, oligosacáridos de la serie rafinosa pueden ser acumulados en células hasta en un 15 % de su peso seco y estas plantas pueden ser consideradas resistentes a estrés (Crowe *et al.*, 1997).

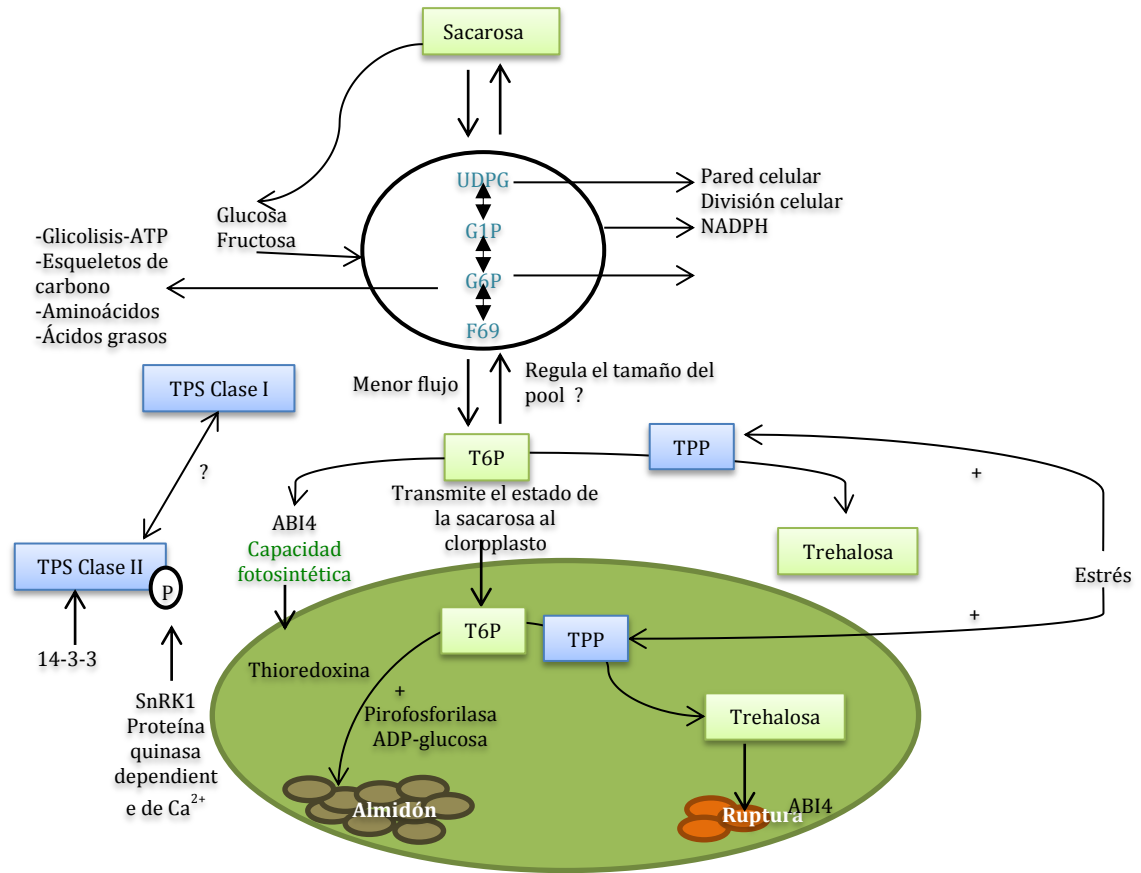


Figura 6. Generalidades del papel de la trehalosa en las rutas biosintéticas de las plantas. La trehalosa 6-fosfato (T6P) es un metabolito señal con una cercana proximidad al tamaño del pool de hexosa fosfato y uridina difosfoglucosa (UDPG). Tomado de Matthew et al. (2008).

Muchos organismos como tardígrados (*Echiniscus blumi*, *Artemia salina*), semillas, bacterias, levaduras y plantas (*Selaginella lepidophylla*, *Myrothamum flabellifolius*, *Sporobulus atrovirens*) (Iturriaga et al., 2000) pueden sobrevivir en estado inerte, deshidratados por periodos prolongados de tiempo, con una pérdida de agua de alrededor del 99 %, conocido como anhidrobiosis (Crowe et al., 1987). Estos organismos tienen en común la capacidad de sintetizar grandes cantidades de trehalosa, la cual puede alcanzar hasta un 20 % del peso seco, por lo que son capaces de soportar condiciones extremas de altas temperaturas, salinidad y radiación, recuperando sus funciones vitales cuando son expuestas a condiciones ambientales favorables. (Crowe et al., 1992).

Se ha demostrado que la trehalosa es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas, así como la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radicación (Crowe y Champman, 1984). De acuerdo con Schiraldi *et al.* (2002), dicha estabilidad bajo condiciones extremas se debe a la energía del enlace glicosídico con valor de $4.184 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, en comparación con la sacarosa, donde este enlace tiene una energía de $114 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Los dos tipos de procesos propuestos para desestabilizar la bicapa lipídica de membranas durante la deshidratación son: la fusión y la fase de transición, que no son otra cosa más que el cambio del estado fluido y el rompimiento de las membranas, respectivamente. Estudios por dispersión de luz láser y otras técnicas demuestran que la trehalosa y otros azúcares inhiben la fusión entre organelos durante la sequía, pero dicho fenómeno por sí solo no es suficiente para mantenerlos secos. La trehalosa es también necesaria para prevenir la fase de transición (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2010).

Se sugiere que a temperaturas altas, el efecto protector de la trehalosa se correlaciona con un aumento significativo en el número de puentes de hidrógeno trehalosa-bicapa, incrementándose la cantidad de moléculas de trehalosa cada tres o más moléculas de lípidos (Lins *et al.*, 2004) (Figura 7). De esta forma disminuye la fase de transición en relación con la temperatura de lípidos secos, manteniéndolos en fase líquida-cristalina en ausencia de agua.

Un sin número de evidencias indica que el efecto de estabilización de la trehalosa se debe tanto a su estructura como a su estereoquímica. Estudios de difracción de rayos X muestran que la trehalosa encaja bien entre los grupos polares de las cabezas de lípidos, con múltiples sitios de interacción y sugiere que los fuertes efectos de estabilización de la trehalosa se relacionan a su

estereoquímica, lo cual provee el más favorable ajuste con los grupos polares de la cabeza (Rudolph *et al.*, 1990).

La trehalosa también mantiene la estructura de las proteínas durante la sequía. Por ejemplo, la fosfofructoquinasa es un tetrámero que se disocia irreversiblemente para inactivar dímeros durante el proceso de sequía. Aunque muchos compuestos que estabilizan proteínas pueden prevenir la disociación cuando el exceso de agua está presente, solo los oligosacáridos estabilizan a las proteínas durante sequía extrema (Carpenter y Crowe, 1989).

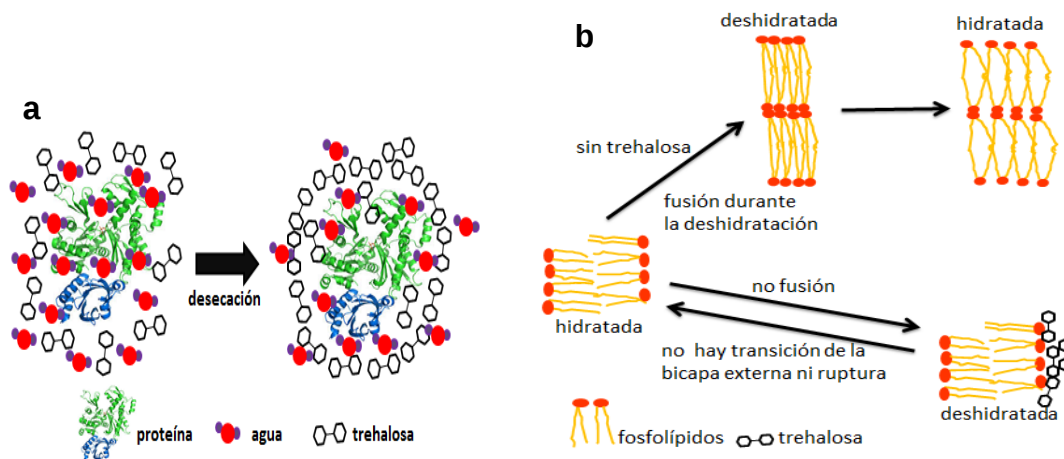


Figura 7. a) Protección de las proteínas por acción de la trehalosa; b) protección de membranas biológicas durante estrés por deshidratación (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005)

Según Elbein *et al* (2003) la capacidad de la trehalosa para mantener la actividad de las proteínas se debe a que ésta reemplaza el agua formando una especie de burbuja alrededor de la proteína deshidratada protegiendo así su estructura terciaria y su funcionalidad (Figura 7). La interacción por puentes de hidrógeno entre ambas moléculas es debida a los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del azúcar. El hecho de que la trehalosa sea un azúcar no reductor, a diferencia de la sacarosa, previene la reacción de Maillard en la cual los grupos aldehído de los azúcares reducen a los grupos amino de las proteínas, produciendo así el típico color café asociado a la degradación de las

proteínas, reacción que se acelera a mayores temperaturas (Carpenter y Crowe, 1989).

2.5.3.1. Papel de la trehalosa en resistencia a factores abióticos

De acuerdo con Fernández *et al.* (2010) el papel de la trehalosa en la tolerancia a estrés abiótico (Cuadro 2) fue primero demostrado en plantas de resurrección como *Myrothamnus flabellifolius* y *Selaginella lepidophylla*. Estas plantas pueden soportar casi la deshidratación completa y reponerse al rehidratarse, recuperando completamente su viabilidad. Interesantemente en estas especies, la trehalosa es principalmente un azúcar soluble, con niveles reportados de 3 mg·g⁻¹ FW (fresh weight por sus siglas en inglés, indica el peso fresco) en *M. flabellifolius* y 12 mg·g⁻¹ FW en *S. lepidophylla*. Durante la deshidratación, la concentración de trehalosa solo incrementa ligeramente y esta actúa como un protector de ambas, proteínas y membranas (Goddijn y van Dun, 1999).

Cabe mencionar que la acumulación de trehalosa bajo estrés abiótico no se restringe a plantas de la resurrección. En *A. thaliana*, el nivel de trehalosa se duplica bajo estrés por calor (40 °C) durante 4 h y se incrementa ocho veces más después de 4 días de exposición al frío (4 °C). Dependiendo del órgano examinado, la acumulación de trehalosa durante el estrés está relacionada con la activación transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis de la trehalosa (Paul *et al.*, 2008).

Por ejemplo, la expresión de el gen TPS1 es inducible en hojas y raíces de algodón (*Gossypium hirsutum*) en condiciones de sequía. En maíz (*Zea mays*), este gen es sobre-expresado en las inflorescencias femeninas bajo condiciones de sequía, mientras que el gen TPP es reprimido en las espigas (inflorescencias masculinas). En arroz, dos genes TPP (OsTPP1 y OsTPP2) han sido encontrados de forma transitoria, inducidos en estrés por frío (4 °C), sequía y ácido abscísico exógeno (aplicaciones de 50 µM). Como era de esperarse, la actividad de la TPP y el contenido de trehalosa en raíces incrementan después

de estrés por frío. El estrés por salinidad, causado por un tratamiento en brotes con 50 mM de NaCl, resultó en la expresión de OsTPP1 pero no de OsTTP2 (Garg *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2010).

Bajo condiciones de estrés, los niveles de trehalosa en órganos de las plantas podrían ser regulados por su degradación. Por ejemplo, en estrés salino, la trehalosa se acumula en nódulos de *Medicago truncatula* y el gen de la trehalasa (MtTRE1) es reprimido, sugiriendo que el incremento en los niveles de trehalosa ocurre al menos en una parte de la planta por represión transcripcional de MtTRE1. Además, análisis de microarreglos han revelado que muchos de los genes de *A. thaliana* involucrados en el metabolismo de la trehalosa responden a un amplio rango de estreses abióticos, tales como frío, sal y radiación UV (Iordachescu e Imai, 2008). Este descubrimiento indica que la trehalosa y/o T6P están involucradas en la respuesta a fluctuaciones ambientales.

Resulta de importancia mencionar, que a pesar de que diferentes grupos de investigadores han tratado de crear plantas tolerantes a diferentes tipos de estreses abióticos por introducción de los genes de biosíntesis de la trehalosa, la relación entre el metabolismo primario del carbono, indispensable para el normal desarrollo de las plantas y la trehalosa relacionada con el metabolismo del estrés, han provocado anomalías en el crecimiento de este tipo de plantas transgénicas. Tal es el caso de *A. thaliana*, donde la acumulación de T6P provoca inhibición de su crecimiento (Avonce *et al.*, 2004).

2.5.3.2. Papel de la trehalosa en resistencia a factores bióticos

Debido a que existen mecanismos en común entre los estreses abióticos y bióticos, se podría esperar que la trehalosa juegue un papel en las interacciones bióticas (Cuadro 2). Sin embargo, existe poca información disponible (Vogel *et al.*, 2001).

A pesar de que, las interacciones simbióticas planta-microorganismo benefician al hospedero, las plantas activan respuestas de defensa que se superan más tarde por el simbiote. Interesantemente, la trehalosa está involucrada en estas interacciones (Goddijn y van Dun, 1999; Iturriaga *et al.*, 2009). La presencia de trehalosa fue reportada en los años 80's en nódulos de soya (*Glycine max*) y fue determinada en varias leguminosas en concentraciones entre 0.1 mg·g⁻¹ de peso seco (PS) y 14 mg·g⁻¹ PS. Aunque la síntesis de trehalosa ocurre en bacterias, mucha trehalosa es localizada en el citoplasma de las células de la planta hospedera (Fernández *et al.*, 2010).

La trehalosa podría estar involucrada de dos formas en este tipo de interacciones: en nódulos podría mejorar la tolerancia del huésped al estrés como se reveló por el incremento en la síntesis de la trehalosa en los nódulos durante estrés por sequía y en la acumulación de trehalosa en el simbiote podría ayudar a resistir las respuestas de defensa del huésped inducidas en el inicio de la asociación (Paul *et al.*, 2008).

La trehalosa también actúa como un elicitor de los mecanismos de defensa en plantas. Análisis transcriptómicos realizados en *A. thaliana* crecida en medio con 30 mM de trehalosa, reveló la inducción en la expresión de genes que participan en la defensa de plantas. Por ejemplo, los genes WRKY6 y 1,3-glucanasa, los cuales codifican factores de transcripción relacionados con la defensa y proteínas PR, respectivamente (Vogel *et al.*, 1998).

Cuadro 2. Efectos del estrés en el metabolismo de la trehalosa. Adaptado de Fernández *et al.*, 2010.

	Estrés	Planta-patógeno	Fluctuaciones del metabolismo de la trehalosa	Órgano
Abiótico	Sequía	<i>Myrothamius flabellifolius</i> Maíz (<i>Zea mays</i>)	Acumulación de trehalosa Inducción en la expresión del gen TPS1 Represión en la expresión del gel TPP	Hojas Inflorescencias masculinas/femeninas Inflorescencias masculinas
	Calor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acumulación de trehalosa	Brotes
	Frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acumulación de trehalosa	Brotes
	Salinidad	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Acumulación de trehalosa	Brotes/raíces
		Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Inducción de OsTPP1 y OsTPP2	Brotes/raíces
Biótico	Simbiosis	Soya (<i>Glycine Max</i>) $\times$ <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Acumulación de trehalosa	Nódulos
	Patógeno	<i>Arabidopsis thaliana</i> $\times$ <i>Plasmidiophora brassicae</i>	Acumulación de trehalosa	Raíces/infectadas /hipocótilos/ápices /hojas
		Pine (<i>Pinus sylvestris</i>) $\times$ <i>Armillaria ostoyae</i>	Inducción en la expresión del gen AtTRE e incremento en la actividad trehalasa	Raíces/infectadas /hipocótilos
			Acumulación de trehalosa	Raíces infectadas

De acuerdo con Reignault *et al.* (2001) tratamientos de trehalosa en plantas de trigo inducen protección parcial contra el hongo necrotrófico *Blumeria graminis*. Plantas inoculadas con el hongo fueron asperjadas con trehalosa (15 g/L y 0.01 g/L), reduciendo la infección en las hojas de trigo de 50 % a 95 %, resultando más efectiva la dosis baja de trehalosa. Este grupo encontró que, no se inhibía la germinación conidial del hongo pero si incrementaba la deposición de la papila en células epidermales, la cual es una estructura de resistencia que se

produce por modificaciones de las células de la epidermis, se compone principalmente de calosa y su función es evitar la penetración de los hongos.

Además se han realizado estudios tanto del hospedero como del patógeno en genes del metabolismo de la trehalosa, particularmente en el pato-sistema *A. thaliana-Plasmodiophora brassicae*, encontrando que la trehalosa es producida como un elemento de una serie de herramientas de virulencia (Broodmann *et al.*, 2002). De hecho, se ha demostrado que un gen relacionado con la síntesis de trehalosa en el patógeno, PbTPS, está regulada positivamente en el inicio de la infección, lo que resulta en la acumulación de trehalosa. Mientras tanto, AtTRE está regulada positivamente antes de la acumulación de trehalosa en el tejido infectado, lo que sugiere que la trehalasa podría ser parte de un sistema de defensa de la planta para contrarrestar la acumulación de trehalosa. En este ejemplo, la sobreacumulación de trehalosa en el tejido vegetal es una amenaza para la supervivencia de las plantas, lo que sugiere que la trehalosa podría tener un impacto (Broodmann *et al.*, 2002).

2.5.4. Biotecnología de la trehalosa

Las propiedades de la trehalosa la han convertido en un importante producto biotecnológico, con diversas aplicaciones, algunas de las cuales se han llevado hasta nivel comercial (Paiva y Panek, 1996; Schiraldi *et al.*, 2002). Su uso a gran escala como preservador, aditivo, estabilizador y/o sustituto de sacarosa se ha incrementado con el desarrollo de un procedimiento de producción enzimática que se basa en el uso de almidón como sustrato, usando las enzimas malto-oligosil trehalosa sintasa (MTS) y la malto-oligosil trehalosa hidrolasa provenientes de la bacteria del suelo *Arthobacter ramosus*. El otro proceso de producción de éste disacárido se hace en levadura, con las enzimas de la vía TPS/TPP aunque su rendimiento es menor (Richards *et al.*, 2002).

Algunos de los usos más comunes del azúcar trehalosa son: 1) protector de la actividad enzimática, 2) estabilizador y protector de moléculas complejas

(Colaco *et al.*, 1992), 3) aditivo de diversos alimentos, 4) sustituto de azúcar, 5) preservador de células, tejidos y órganos (Iwaya-Inoue y Takata, 2001), 6) osmoprotector de plantas ornamentales y 7) osmoprotector de plantas transgénicas, permitiendo incrementar la tolerancia de las mismas a la sequía, la salinidad y el frío (Avonce *et al.*, 2004)

Aunque la transformación genética con los genes involucrados en la síntesis de trehalosa, ha permitido mejorar la tolerancia a estrés abiótico en diferentes especies de plantas, el efecto en el estrés biótico se ha estudiado muy poco. El principal estrés en la que se han enfocado la mayoría de los cultivos transgénicos ha sido la sequía, siendo el frío uno de los que menos se ha estudiado.

Un aumento de la resistencia bajo condiciones de sequía ha sido conferido en varias plantas diferentes y en células animales por incremento de sus niveles intracelulares de trehalosa. Por ejemplo, plantas transgénicas de tabaco fueron modificadas por ingeniería genética para producir cantidades substanciales de trehalosa por introducción de los genes de biosíntesis de trehalosa OtsA y OtsB de *E. coli* (Fernández *et al.*, 2010).

Es de importancia mencionar que las primeras plantas transgénicas de tabaco que sobre-expresaban el gen ScTPS1 presentaron tolerancia al estrés osmótico, cualidad que se relacionó con el contenido de trehalosa. Sin embargo, se observaron efectos pleiotrópicos como plantas de baja estatura, hojas en forma de lanceta, color verde más oscuro que las plantas no transgénicas y esterilidad en las semillas (Goddijn *et al.*, 1997; Avonce *et al.*, 2005). Se propuso que este efecto se producía por la acumulación del intermediario T-6-P, más que la trehalosa misma (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005). La sobreexpresión de TPS1 en *A. thaliana* utilizando el promotor 35S da lugar al aumento en los niveles de trehalosa y T-6-P, a pesar de esto, las

plantas transgénicas muestran el fenotipo de tolerancia a la deshidratación sin alteraciones morfológicas visibles a excepción de retraso de la floración.

Con el propósito de generar plantas productoras de mayor contenido de trehalosa endógena, sin causar efectos pleiotrópicos se hicieron varios experimentos para la expresión de un gen que codifica para Trehalosa-6-P fosfatasa (TPP). Posteriormente se logró obtener plantas transgénicas capaces de producir una mayor cantidad de trehalosa mediante el gen bifuncional compuesto de la unión de los genes que codifican para Trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y Trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP), por lo tanto, estas plantas no mostrarán inhibición en el crecimiento o alteraciones fenotípicas visibles a pesar de los altos niveles de trehalosa producida. Además presentaron tolerancia a sequía, estrés salino y frío (In-Cheol *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2004).

Miranda *et al.* (2007) mencionan que durante su investigación se obtuvieron plantas transgénicas de *A. thaliana*, que contenían una construcción génica bifuncional de ScTPS1-TPS2, las cuales presentaron mayores concentraciones de trehalosa bajo un promotor constitutivo 35SCaMV (35S del virus del mosaico de la coliflor) y uno inducible por estrés Rd29A. Estas líneas generadas mejoraron su resistencia a diversas condiciones de estrés abiótico tales como congelamiento, calor, sequía y salinidad, además estas plantas presentaron pocos o nulos efectos pleiotrópicos indeseables en el fenotipo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diagrama General de Trabajo

En la Figura 8, se muestra el diagrama general de trabajo mediante el cual se realizó este trabajo de investigación. El desarrollo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada, así como en los invernaderos del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Las líneas con promotor constitutivo (pBIN**35S**::*ScTPS1TPS2*::*NOS*) fueron obtenidas por Valle-Sandoval (2008) y por su contenido de trehalosa se decidió fueran empleadas para evaluar la tolerancia a patógenos mediante la identificación de genes de resistencia a estos y por otro lado las líneas con promotor inducible (pBIN**Rd29A**::*ScTPS1TPS2*::*NOS*) fueran usadas para evaluar la tolerancia a estrés hídrico (por sequía) así como vida post-cosecha de las flores. Lo anterior porque aunque la expresión constitutiva de los genes de biosíntesis de trehalosa permiten evidenciar con claridad el fenotipo de tolerancia a estrés abiótico, las plantas muestran efectos pleiotrópicos indeseables, como una reducción en la vida post-cosecha (Valle-Sandoval, 2008). Se piensa que gran parte de los efectos pleiotrópicos indeseables podrían atenuarse utilizando un promotor inducible como Rd29A, razón por la cual las líneas transgénicas var. Harman fueron evaluadas en cuanto a su tolerancia a estrés hídrico, pérdida de agua en hojas (deshidratación) y vida post-cosecha de las flores, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos por Valle-Sandoval (2008) quien empleo para estos análisis plantas transgénicas de crisantemo var. Indianápolis que acumula trehalosa.

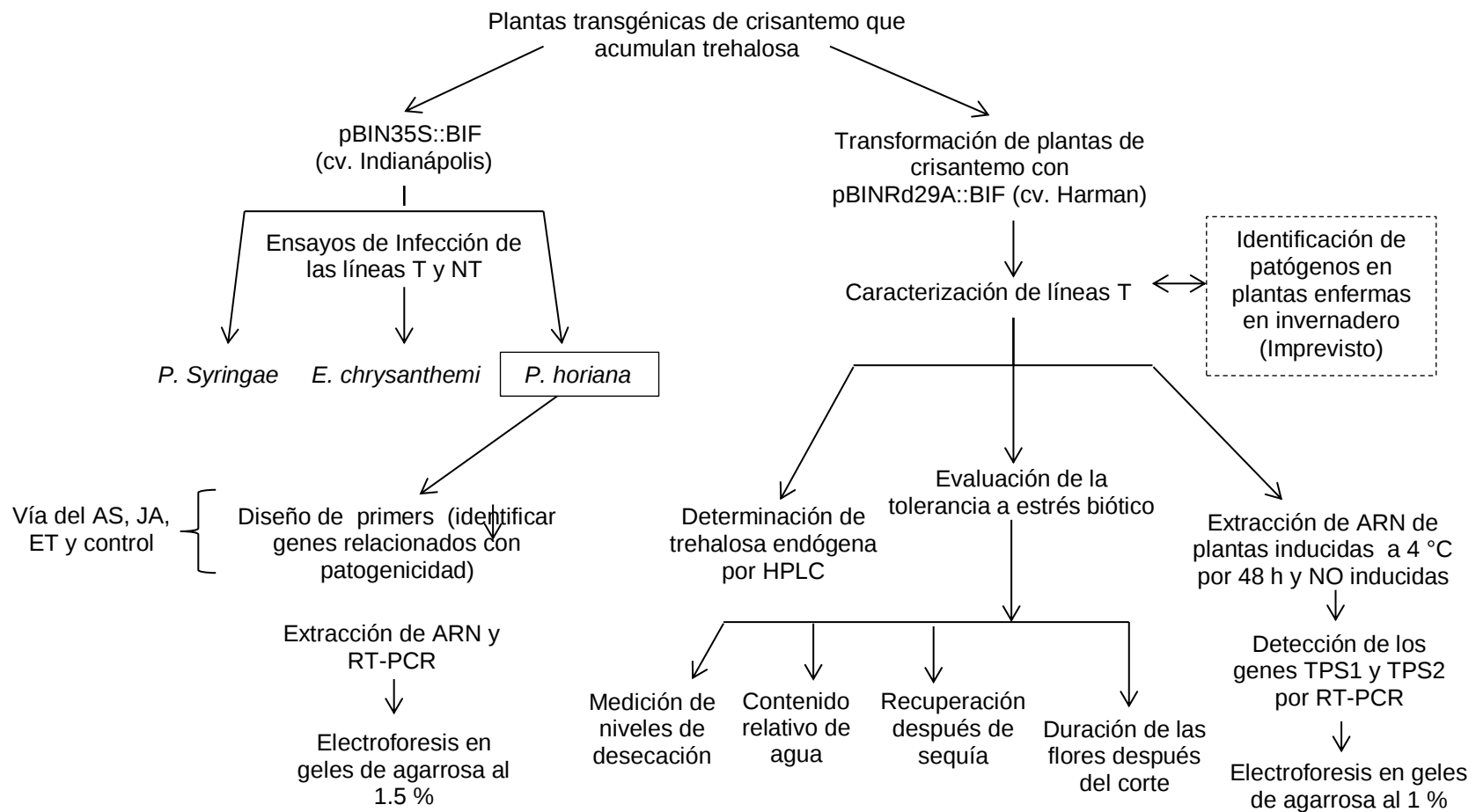


Figura 8. Diagrama General de Trabajo. Donde la evaluación de la tolerancia a estrés por sequía y vida post-cosecha se llevó a cabo en las líneas del promotor inducible (Rd29A) y la tolerancia a patógenos con las líneas del promotor constitutivo (35S), por ser estas las que más acumulan trehalosa. La detección de genes relacionados con patogenicidad se estudió sólo con plantas infectadas con *P. horiana*, mientras que la identificación de patógenos como se indica en el rectángulo con líneas punteadas fue llevado a cabo como un complemento que pudiera aportar información extra.

3.2. Material Biológico

3.2.1. Plantas de Crisantemo

Las plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) empleadas fueron de dos cultivares (cv) distintos cv. Indianápolis y cv. Harman, con promotor constitutivo e inducible, respectivamente. La construcción empleada fue una fusión traduccional de los genes involucrados en la biosíntesis de trehalosa, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Miranda *et al.*, 2007). Para la obtención de plantas transgénicas cv. Harman con sobreproducción y acumulación del azúcar trehalosa, se siguió el protocolo desarrollado por Valle-Sandoval (2008), quién transformó plantas de crisantemo var. Indianápolis, para lo cual empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con el plásmido pBIN35S::ScTPS1TPS2::NOS (ver apartado de protocolo de transformación estable). En este trabajo se llevó a cabo la transformación de tallos var. Harman con la cepa LBA4404 (pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS), después de lo cual se recuperaron por organogénesis directa, brotes resistentes a kanamicina en los cuales se indujo la formación de raíces en el mismo medio selectivo.

Las líneas transgénicas (LT) y no transgénicas (NT) de cada una de las variedades de crisantemo utilizadas en este trabajo de investigación, se pueden observar en la Figura 10. Estas plantas se cultivaron y mantuvieron en medio de crecimiento mínimo, que consistía en sales MS (Murashige y Skoog) comerciales de SIGMA 4.4 g/L, sorbitol 20 g/L, agar 7 g/L, el pH se ajustó a 5.7.

Posteriormente, se cortaron segmentos de tallo de aproximadamente 2-3 mm en cada una de las líneas y se sembraron en medio MS adicionado 3 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 1 mg/L de ácido indol-3-acético (AIA), hasta la formación de callos y brotes adventicios, los brotes obtenidos se pasaron a medio MS sin hormonas, donde se dejaron hasta que formaron raíces y posteriormente fueron pasados a sustrato (petmoss y agrolita en proporción 2:1), se aclimataron y luego fueron llevadas a invernadero, manteniéndose en

estado vegetativo bajo las siguientes condiciones: temperatura de 24±1°C con 18 horas de luz (intensidad lumínica de 65 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provista por focos fluorescentes blancos). Estas plantas fueron empleadas después en los ensayos de infección con patógenos así como en las pruebas de tolerancia a estrés hídrico, lo cual se describe a detalle en el apartado correspondiente.

De acuerdo con Valle-Sandoval (2008), el contenido endogeno de trehalosa medido por HPLC para las lineas trasngénicas pBIN35S::BIF usadas fue de:

Cuadro 3. Contenido endogeno de trehalosa

Línea	Trehalosa ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco)
NT	20
35S-19	105
35S-8	45

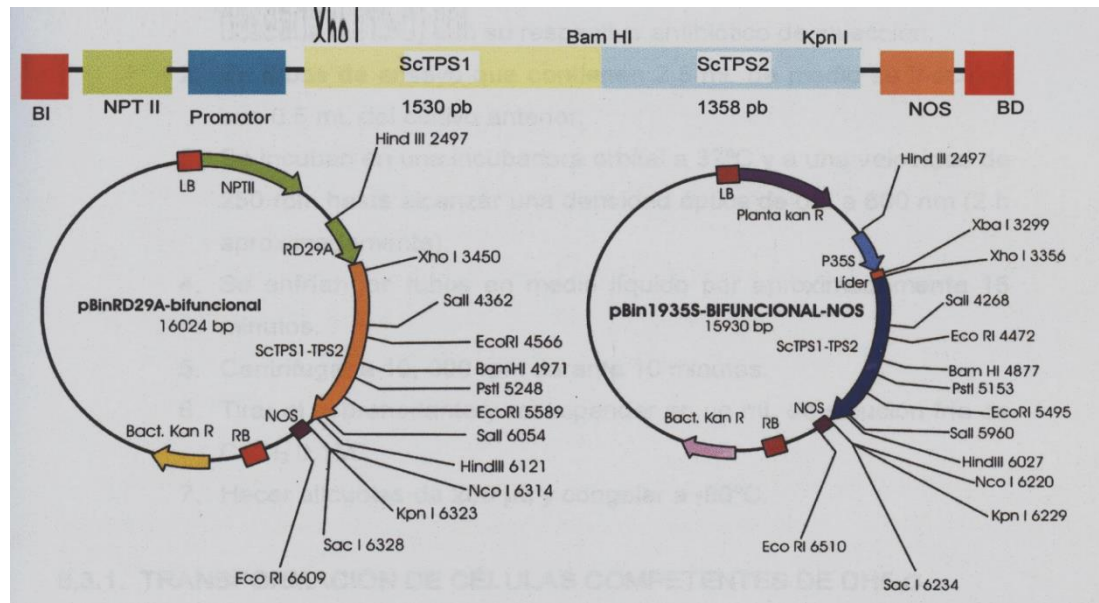


Figura 9. Mapas de las construcciones usadas. A) pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS, donde RD29 es el promotor inducible; B) pBIN35S::ScTPS1TPS2::NOS, donde 35S es el promotor constitutivo.

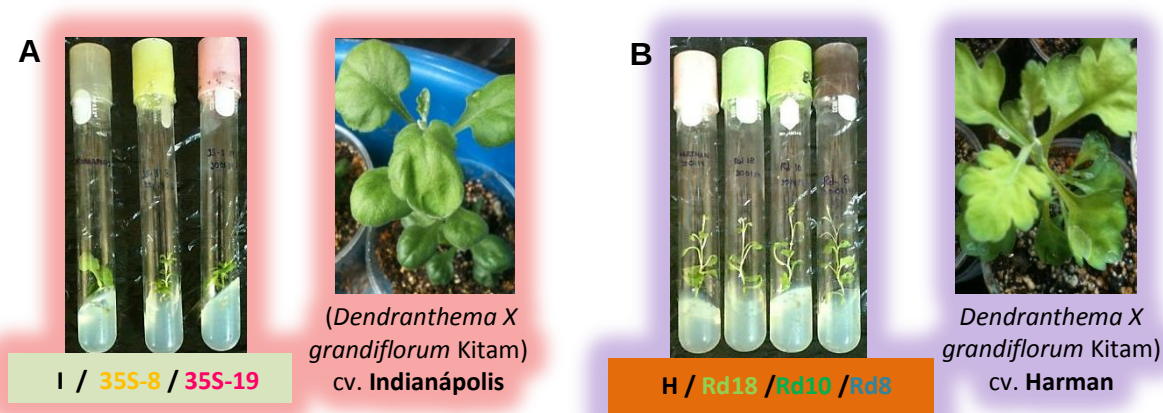


Figura 10. Líneas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa. A) Plantas de crisantemo cv. Indianápolis donde I, es el control sin transformar (NT); 35S-8 y 35S-19 son las dos líneas transformadas (LT) con la construcción pBIN35S::TPS1TPS2::NOS, que contiene el gen *NPTII* como gen de selección de resistencia a kanamicina, el promotor constitutivo 35S, el gen quimérico *ScTPS1TPS2* y el terminador *NOS*, este T-DNA está definido por un borde izquierdo y un borde derecho. B) Plantas de crisantemo cv. Harman, donde H, es el control sin transformar (NT) y Rd 18, Rd 10 y Rd 8 son las tres líneas transformadas con la construcción pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS, que difiere con la ya descrita en el promotor Rd29A, el cual es inducible.

La metodología para la determinación de la cantidad de trehalosa de las LT cv. Harman (Rd18, Rd10 y Rd8) también nombradas pBINRd29A::BIF así como los datos obtenidos se presentan en los apartados correspondientes.

Cabe mencionar que con estas plantas se llevaron a cabo ensayos de desecación, tolerancia a sequía y vida post-cosecha de las flores (duración después del corte), mientras que las LT cv. Indianapolis (35S-19 y 35S-8), denominadas pBIN35S::BIF fueron empleadas para evaluar la tolerancia a patógenos.

3.2.2. Patógenos

Las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Erwinia chrysanthemi* fueron donadas amablemente por el Dr. Sergio Aranda Ocampo, Profesor e Investigador del Departamento de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, mientras que el hongo *Puccinia horiana* mejor conocida como roya blanca se obtuvo a partir de

plantas de crisantemo cv. Harman enfermas, mismas que se adquirieron en el Estado de México región occidente, Boyeros: altitud 2250 m, ubicación geográfica 19°29' LN y 98° 53' LO, temperatura 15.2 °C y precipitación 636.5 mm.



Figura 11. Patógenos empleados en la infección de plantas de crisantemo. A) *P. syringae* crecida en medio KB (peptona hidrolizada 20 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L, glicerol 15.0 ml/L, agar 15 g/L); B) *E. chrysanthemi* crecida en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L, pH 7.5); C) pústulas semimaduras de *P. horiana*.

3.3. Plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa (pBIN35S::BIF)

3.3.1. Ensayos de infección con bacterias

Las bacterias *P. syringae* y *E. chrysanthemi* fueron crecidas en medio líquido KB (peptona hidrolizada 20 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L, glicerol 15.0 ml/L) y LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.5), respectivamente. Los medios inoculados se mantuvieron en agitación continua por 24 horas a 27°C, pasado el tiempo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nanómetros y se ajustó a una concentración de 1, de aquí se prepararon las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .

A fin de determinar el número de cada unidad formadora de colonia (UFC), se colocaron en placas petri (con el medio correspondiente para cada tipo de bacterias) 100 μ L de las últimas tres diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) bacterianas y con perlas de vidrio se dispersó la muestra por todo el medio. Tras la

incubación por 24 horas a 27 ° C se observaron las colonias bacterianas sobre la superficie del agar. Cada colonia representó a una UFC.

A partir de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se llevó a cabo la infección de las plantas de crisantemo tanto con *P. syringae* como con *E. chrysanthemi*. Un total de 18 plantas sanas de crisantemo (LT: 35S-19 y 35S-8; NT: Indianápolis) fueron infectadas, nueve con *P. syringae* y nueve más con *E. chrysanthemi* (tres plantas por cada línea). Se hicieron heridas en el envés de 4 hojas por planta (dos de la parte superior y dos de la inferior) con una aguja para insulina estéril y con una pipeta se aplicaron 100 μ L, repartidos en las heridas realizadas en las hojas. Finalmente, las plantas infectadas, fueron colocadas en un contenedor de plástico con tapa a fin de mantener la humedad y por ende facilitar el desarrollo de los síntomas que provocan estos patógenos.

3.3.2. Infección con *Puccinia horiana*

De plantas cv. “Harman”, infectadas con roya blanca, se obtuvieron pústulas de color miel a café (semimaduras) y mediante raspado se desprendieron y se suspendieron en 200 mL de agua destilada estéril, se agregaron 2 gotas de Tween 20® y se licuó para dispersar las teliosporas. Se cuantificó el número de teliosporas con un hemacitómetro y se preparó una suspensión de 10^6 teliosporas por mililitro. Tanto las dos líneas transformantes como la NT se inocularon en un grupo de 9 plantas, 3 de cada línea, mediante asperjado de hojas por el haz y envés hasta punto de goteo.

Las plantas inoculadas se incubaron durante 20 días en una cámara con 95 % de humedad relativa (HR) y temperatura que fluctuó entre 17 y 19°C. Se dejaron bajo condiciones de oscuridad por un periodo de 24 horas después de la inoculación para promover la esporulación e infección por basidiosporas (Leyva *et al.*, 2001). Una vez concluido el periodo de 24 horas de oscuridad, se sometieron a un fotoperiodo de 16 horas luz y 2, 000 lux de intensidad lumínica

en forma permanente. Luego se transfirieron a un invernadero cuya temperatura varió entre 19 y 28°C, con una HR de 80 % (Vences y Vázquez, 2008).

Se registró el número de pústulas incipientes por planta y el periodo de incubación, esto es el número de días posteriores (dpi) a la inoculación en que aparecieron los primeros síntomas. También se anotó el número de plantas con síntomas (incidencia).

3.3.2.1. Extracción de ARN vegetal

La extracción de ARN se realizó con el kit Trizol® Reagent de Invitrogen, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver Anexo I) y tomando 100 mg de tejido por muestra, usando hojas de las respectivas plantas de crisantemo. El análisis de la calidad de extracción del ARN se hizo en geles no desnaturalizantes de agarosa al 1 % (Rio *et al.*, 2010). Los buffers y reactivos fueron preparados con agua destilada y estéril, usando en todo momento guantes de látex para su manipulación. Como buffer de carga se usó 0.2 % azul de bromofenol (p/v), 0.2 % xileno cianol (p/v), 25 % glicerol (v/v), 5 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl (pH 8) y el de corrida fue TBE 1X [1.08 % (p/v) de Trizma base, 0.55 % (p/v) de ácido bórico y 0,093 % (p/v) de EDTA] estéril. La electroforesis se realizó a 90 voltios por 45 minutos. Se documentó el patrón electroforético logrado mediante radiación UV y empleando una unidad fotográfica Kodak.

Cabe mencionar, que la extracción del ARN para las plantas transformadas con la construcción pBIN35S::BIF se llevó a cabo justo cuando las plantas infectadas con roya presentaron síntomas. Así mismo, este protocolo fue usado para la extracción del ARN de las LT pBINRd29A::BIF, la diferencia consistió en colocar las plantas de crisantemo con promotor inducible (Rd 18, Rd 10 y Rd 8) y la NT en refrigeración a 4 °C por 48 horas (plantas inducidas; I) e inmediatamente se realizó la extracción, también se extrajo ARN de estas plantas sólo que sin inducir (NI). Lo anterior, con la finalidad de comprobar la funcionalidad del promotor Rd29A, el cual se induce por frío y por ende permite

la síntesis de genes de biosíntesis de la trehalosa (ScTPS1 y ScTPS2), por lo cual se llevó a cabo una PCR, misma que se describe a detalle en el apartado 3.4.1.2.

3.3.2.2. Cuantificación y calidad del ARN total

La calidad y cantidad del ARN total fue evaluado mediante Nanodrop®, la absorbancia a 260 nm, en el que un valor de A_{260} de 1 corresponde, aproximadamente, a $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ARN. La contaminación por proteínas fue determinada mediante el cociente A_{260}/A_{280} , y el de carbohidratos y fenólicos mediante cociente A_{260}/A_{230} . El valor para dichas relaciones debe estar comprendido entre 1.8 y 2 (Sambrook *et al.*, 1989). En algunas muestras, la cantidad total de ARN extraído permitió determinar dicha calidad mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se utilizaron geles al 1.8 % de agarosa (Sigma) en tampón TBE 1X estéril (Rio *et al.*, 2010). La agarosa se disolvió en tampón TBE 1X con ayuda de un horno de microondas. El gel se dejó polimerizar, durante 30 min aproximadamente, antes de aplicar las muestras. Éstas tenían una concentración de $1 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ARN total en todos los casos, se mezclaron $3 \text{ } \mu\text{L}$ de cada ARN extraído por línea transformante y control (NT) con $2 \text{ } \mu\text{L}$ de buffer de carga 5X [25 % (v/v) de glicerol, EDTA 1 mM, pH 8 y 0.2 % (p/v) de azul de bromofenol] en un trozo de papel parafilm, se evitó mezclar las diferentes muestras de ARN. Tras la aplicación de las muestras, la electroforesis se llevó a cabo en buffer TBE 1X, a 80 V hasta que el azul de bromofenol sobrepasó la mitad del gel, terminada la corrida, el gel fue teñido con bromuro de etidio ($0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en TBE 1X) (Sigma). Para evitar la contaminación por RNAasas, todo el material necesario para la electroforesis (peine, cama y cubeta) se trató previamente con SDS 0.5 M y, posteriormente, se lavó con abundante agua destilada y estéril.

3.3.2.3. Síntesis de ADNc

La reacción de retrotranscripción (transcripción reversa o RT, por sus siglas en inglés) se realizó con $2 \text{ } \mu\text{g}$ de ARN total por cada muestra e inmediatamente

después de la extracción para evitar posibles degradaciones. La RT se llevó a cabo mediante la retrotranscriptasa M-MuLV (alta sensibilidad, a partir de 1 pg-5 µg de ARN total) usándose una mezcla optimizada del cebador oligo-(dT)₁₈ (100 pmol), tampón de reacción RT 5X, una mezcla de oligonucleótidos (dNTP Mix, 10 mM), inhibidor de RNasas (RiboLock, 20u) y agua libre de nucleasas, todos ellos incluidos en el kit Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). El protocolo seguido fue: fase 1, se adicionaron dentro de un tubo eppendorf estéril y previamente colocado en hielo los siguientes componentes en el orden mencionado:

ARN total (1µg/mL).....2µL
 Oligo-(dT)₁₈.....1µL
 H₂O libre de nucleasas....8.5 µL

Dichos componentes se mezclaron generosamente, se centrifugaron ligeramente e incubaron a 65 °C por cinco minutos, fue necesario enfriar el tubo en hielo, se centrifugó ligeramente una vez más y se colocó en hielo. La fase 2 consistió en incorporar los siguientes componentes en el orden indicado:

Buffer de reacción RT 5X...4 µL
 Inhibidor de RNasas.....0.5 µL
 dNTP Mix.....2µL
 Transcriptasa M-MuLV.....2 µL

Para finalizar, la mezcla de reacción se incubó por 1 hora a 37 °C, pasado el tiempo, se inactivó la reacción por calentamiento a 70 °C por 10 minutos. El producto de la RT fue almacenado a -20 °C hasta su uso. El procedimiento de la síntesis de ADNc se llevó a cabo duplicando la cantidad de cada uno de los componentes (es decir, un total de 40 µL por reacción) y usando el ARN total correspondiente a cada una de las líneas transgénicas pBIN35S::BIF y NT de la

Figura 10. Con los ADNc se realizó una PCR empleando primers diseñados para detectar la expresión de genes relacionados con patogenicidad.

3.3.2.4. Genes utilizados en el estudio de expresión génica

Se seleccionaron tres grupos de genes de interés, atendiendo a los siguientes criterios: 1) tener una presunta función defensiva al estar implicados en la vía del AS, JA y ET; 2) codificar a proteínas cuya expresión se hubiera revelado como afectada de manera diferencial por la infección de patógenos ya sea en crisantemo o en especies de la familia Asteraceae en los estudios de proteómica; y 3) ser expresados de forma constitutiva para su uso como genes de control interno o de referencia.

En cuanto a los genes seleccionados de la ruta AS, estos fueron los correspondientes a una NPR1 (non-expresser of PR genes; Unigene23699_All), un MYB (family transcription factor; Unigene6575_All) y a PGA (Polygalacturonasa-inhibiting protein; CL11209). Estos genes han sido caracterizados por el grupo de Li *et al.* (2014) a partir de librerías génicas de hojas de crisantemo infectadas con *Alternaria tenuissima*.

Dentro de la segunda clase de genes, se incluyeron los correspondientes a la vía de JA: JAZ (jasmonate ZIM domain; Unigene11800_All), MYC2 (factor de transcripción; Unigene3689_All), y PAL (phenylalanineammonia-lyase; UN51328). Los dos primeros genes fueron caracterizados por el grupo de Li *et al.* (2014), mientras que el tercero fue obtenido con base en alineamientos de genes relacionados pertenecientes a la familia Asteraceae.

En la tercera clase de genes se encuentran los activados por la vía del ET, estos son: una CHS (chalcone synthase; UN03919), ACCO (acc Oxidase; AJ001619.1), PO (Polyphenol oxidase; Unigene9160_All) y ERTF (ethylene-responsive transcript factor; Unigene29332_All). Se tomó la secuencia de los

genes CHS, ACCO y PO del trabajo reportado por Li *et al.* (2014) y ERTF de alineamientos realizados mediante BLAST.

Finalmente, dentro de los genes de referencia, se seleccionaron los correspondientes a un EF1 α (mRNA for elongation factor 1-alpha; AB679278.1) gen relacionado con la floración y una actina (AB205087.1) ya que todos ellos han sido reportados precedentemente en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a *Alternaria brassicicola* como genes de expresión constitutiva cuya expresión no se altera estén o no infectadas las plantas (Peer *et al.*, 2000).

3.3.2.5. Diseño de cebadores y PCR

Una parte de los cebadores utilizados fueron diseñados a partir de las secuencias disponibles para estos genes de crisantemo en el "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), mediante el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000), mientras que las secuencias de otra parte de estos, se tomaron del trabajo realizado por Li *et al.* (2014), donde se identificaron transcritos en hojas de crisantemo después de ser inoculadas con *Alternaria tenuissima*. Asimismo, se estudiaron las posibles estructuras secundarias de los ADNc utilizados mediante el programa ADN mfold (Zuker, 2003), y se analizaron finalmente las posibles coincidencias con genes de otros organismos mediante los motores de búsqueda de homología de secuencias-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) en la página del NCBI. Todas las parejas de cebadores, con sus secuencias y productos de amplificación se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Parejas de cebadores usados en la RT-PCR

Vía	Gen a identificar	Secuencia 5' → 3'	Rango y tamaño del producto (pb)
CONTROL	Actina	GCGTTTGGATCTTGCTGGTC ATCTGAAACGCTCAGCACCA	242
	EF1 α	ATTGGTACTGTGCCAGTGGG ACCCTTAGCTGGGTCATCCT	234
AS	NPR1	CAAAGCATTGGATTGTGACG TCTAAGATTGACATCCGCCC	90
	PGA	GCCGTATAATCGCTCTCACC CCGGTGAGGTTTGTGAGTTT	110
	MYB	CGGAATCAAGAAAGGTGCAT ATTCATCCATCGTAGCCTGC	300
JA	JAZ	AAATGTTTTCGGTTTTCGACG GATCTTTGTTAGGTGCCGGA	195
	PAL	GCACATTGCAAACAAATTCAAAC CGAGTGTGTTGAGGGTTGGA	310
	MYC2	CATTGATGTAACAAACGGCG AACCAACGCTTCTACACGCT	110
ET	CHS	ACACAATTAGCCGGAGTTGC CACCGATATTAACACCGATGGC	100
	ACCO	CGATGCTTGTGAAAACGGGG ACCGCTTCTAACCCCTTTGCT	156
	ERTF	CAATTTATTACCGAGGCGT TGCCTAGCCATCTTCGAGTT	150
	PO	TGAACACAACCAAGATGGGA CCTCCACCTTGTCCACTGTT	302

Para cada pareja de cebadores se optimizó la reacción de PCR a diferentes ciclos, la temperatura de hibridación (entre 57 y 62 °C) y la concentración de Mg²⁺ (entre 1-4 mM). La PCR se realizó a partir del ADNc obtenido de cada una de las LT y NT volúmenes de 20 µL con los componentes referidos en el cuadro 5.

Cuadro 5. Mezcla de reacción RT-PCR para obtención de los patrones de genes relacionados con la patogenicidad.

Componente	Concentración final	Volumen de componentes por 20 µL de la mezcla de reacción
Agua destilada estéril	-----	9.8 µL
Amortiguador de PCR 5X	1X	2 µL
*MgCl ₂ 10X	1- 4 mM	en el volumen del amortiguador de PCR
dNTPs 2 mM	0.2 mM	2 µL
Primer forward (F) 10 µM	0.1 µM	2 µL
Primer reverse (R) 10 µM	0.1 µM	2 µL
Taq ADN Polymerase	0.5u/20µL	0.2 µL
ADNc	100 ng	2 µL

*Al amortiguador (buffer) que no contenía MgCl₂ (25 mM), se le adiciona éste, a una concentración final de 1-4 mM, a fin de optimizar la cantidad.

Los tubos eppendorf con la mezcla de reacción, se incubaron en un termociclador (PCR Sprint ThermoHybaid) y las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de polimerización se indican en el cuadro 6.

Cuadro 6. Programa de termociclaje de la RT-PCR.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	95	1 min	
Alineación	57-62	1 min	35-40 ciclos
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1 ciclo

3.4. Plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa (pBINRd29A::BIF)

3.4.1. Protocolo de transformación estable para la variedad Harman

Se siguió el protocolo establecido por Valle-Sandoval (2008) para transformar crisantemo cv. Harman como se describe a continuación:

- 1) Se utilizaron segmentos internodales de tallo de *Dendrathera grandiflora* Tzvelev de la cv. Harman cultivados *ex vitro* (esquejes sin enraizar, propagados en invernaderos de Boyeros, Texcoco, Edo. de México), se cortaron segmentos de unos 3 mm de longitud a los que se les quitaron las hojas. Una vez eliminadas las hojas, los tallos fueron colocados en solución jabonosa al 3 % durante tres minutos, etanol al 70 % durante un minuto, solución PPM® al 2 % durante cinco minutos y finalmente hipoclorito de sodio al 15 % (con Tween® 20) por 10 minutos y se enjuagaron tres veces con agua estéril.
- 2) Se preparó medio de cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 (*pBINRd29A::ScTPS1TPS2::NOS*), el cual consistió en medio LB (Luria-Bertani) con 50 mg·L⁻¹ de kanamicina y 100 mg·L⁻¹ de rifampicina, se incubaron por 24 horas a 27 °C. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 4000 rpm y la pastilla se resuspendió en una solución de glucosa 10 mM adicionada con acetosiringona 100 mM a una densidad óptica de OD₆₀₀= 0.5.
- 3) Los explantes fueron infectados con 20 µL de la suspensión bacteriana, aplicando en el corte que quedaría expuesto, es decir el que no estaría en contacto con el medio.
- 4) Los explantes inoculados se cocultivaron en medio MS sin hormonas, suplementado con 2 % de glucosa y 0.6 % de agar por tres días en las siguientes condiciones: temperatura de 24±1 °C bajo un fotoperiodo de 16/8 horas (día/noche) con una intensidad lumínica de 40 µmol·m⁻²·s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes blancas.
- 5) Después, los explantes se lavaron para eliminar el exceso de bacteria con una solución de tetraciclina 250 mg·L⁻¹ y se colocaron en cajas Petri con medio selectivo (MS, 1 mg·L⁻¹ BAP, 1 mg·L⁻¹ AIA, 2 % glucosa, 250 mg·L⁻¹ de cefotáxima y 15 mg·L⁻¹ de kanamicina). En este medio se incubaron por una semana.

- 6) Posteriormente los explantes se transfirieron a cajas Petri con medio MS con los mismos componentes indicados antes, pero reduciendo la cefotaxima a $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En este medio se mantuvieron hasta que se formó un callo verde (aprox. 2 semanas) en la parte superior que no está en contacto con el medio.
- 7) Seguida a esta etapa se pasaron los explantes a medio MS sin auxina, con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, con las mismas concentraciones de los demás componentes, solo que sustituyendo la glucosa por la sacarosa en una concentración del 3 %, hasta la formación de brotes diferenciados.
- 8) Los brotes diferenciados se transfirieron a medio MS con los mismos componentes, sin hormonas y sacarosa al 3 % como fuentes de carbono. Esta etapa fue para permitir que los brotes tengan un tamaño adecuado para ser transferidos a medio para producción de raíces, esta etapa duro cerca de dos semanas. Una vez que los brotes alcanzaron un tamaño de 3 cm, éstos se pasaron al medio para desarrollar raíces, el cual consistió en 50 % de sales MS al, con 15 % de sacarosa, sin hormonas y con las mismas concentraciones de cefotáxima y kanamicina. Esta fase duro un lapso de dos semanas.

3.4.1.1. Detección de trehalosa por HPLC de líneas transformantes

Para la cuantificación de trehalosa se utilizó una columna para análisis de carbohidratos Agilent Zorbax ®, con flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{minuto}^{-1}$ a una temperatura de 30°C , utilizando como fase móvil una mezcla previamente filtrada y sonificada con acetonitrilo: agua (grado HPLC) en proporciones de 63:65. El cromatógrafo empleado fue un modelo KS801 de la marca de Waters®, (Milipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), equipado con un sistema de distribución de disolventes (bomba 600E) y un detector de UV con rearreglo de diodos Waters 410®, integrado a un equipo de cómputo. El procesamiento y manejo de los datos cromatográficos se hizo a través del programa Millenium 2000 (Waters). Para la cuantificación de trehalosa de las muestras se compararon con los siguientes estándares: $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$, $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$, 15

µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL. La extracción y cuantificación de trehalosa, se realizó a partir de las LT de cada construcción más el control NT, tanto inducidas a 4 °C por 48 horas como sin inducir (26 °C). Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM (Cuernavaca) con la colaboración de los doctores Ramón Suárez Rodríguez y José Augusto Ramírez Trujillo.

3.4.1.2. Detección mediante RT-PCR de los genes de biosíntesis de la trehalosa

La extracción y cuantificación de ARN así como la síntesis de ADNc se realizó conforme a lo descrito en los apartados 3.3.2.1., 3.3.2.2. y 3.3.2.3. A partir de cada uno de los ADNc (obtenidos de plantas inducidas 48 horas a 4 °C y sin inducir) se llevó a cabo una PCR en volúmenes de 20 µL con los componentes referidos en el cuadro 7.

Cuadro 7. Mezcla de reacción RT-PCR para obtención de los patrones TPS.

Componente	Concentración final	Volumen de componentes por 20 µL de la mezcla de reacción
Agua destilada estéril	-----	9.8 µL
Amortiguador de PCR 10X con MgCl ₂ (4 mM)	1X	2 µL
dNTPs 2 mM	0.2 mM	2 µL
Primer forward (F) 10 µM	0.1 µM	2 µL
Primer reverse (R) 10 µM	0.1 µM	2 µL
Taq ADN Polymerase	0.5u/20µL	0.2 µL
ADNc	100 ng	2 µL

Los pares de iniciadores utilizados fueron: **ScTPS1-5** 5'-CTT CGA AGG GTT GAA GAA GA-3' y **ScTPS1-3** 3'-TGG AAC CCG ACT AAA TCA CA-5; **ScTPS2-5** 5'-ATC AAC ATG GCA AAC CAC AG-3' y **ScTPS2-3** 3'-ACC AGC ACT TTG

GAA GAG AGA-5', todos con una $T_m = 56^\circ\text{C}$. El tamaño esperado para los fragmentos amplificados es de 498 pb para TPS1 y de 320 pb para TPS2.

Los tubos eppendorf se incubaron en un termociclador (PCR Sprint ThermoHybaid) y las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la PCR se indican a continuación (Cuadro 8):

Cuadro 8. Programa de termociclaje de la RT-PCR.

Paso	Temperatura $^\circ\text{C}$	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	1 min	
Alineación	53	1 min	35 ciclos
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1 ciclo

El perfil electroforético obtenido fue analizado con el Software my Image Analysis v. 1.1. (Thermo Scientific Fisher Inc. 2012).

3.4.1.3. Medición de niveles de desecación

Se escindieron hojas de plantas completas desarrolladas *in vitro*, que se dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar para estimar la pérdida de agua en función del tiempo. Fueron tomadas lecturas del peso fresco de las hojas cada 10 minutos, durante un período de 90 minutos y después cada 20 minutos hasta completar 130 minutos.

3.4.1.4. Contenido relativo de agua (CRA)

En tres plantas de cada línea (es decir, la Rd18, Rd10, Rd8 y la NT), se cortó una hoja de la base, en la misma posición para cada planta muestreada. Se registró el peso fresco (PF) y luego el material vegetal se sumergió en agua destilada por 24 horas, al cabo de la cual se secó y se obtuvo el peso húmedo (PH). Luego se secó a 65°C por 24 horas, al cabo de la cual se secó y se

obtuvo el peso húmedo (PH). Luego se secó a 65 °C por 24 horas para obtener el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se obtuvo con la fórmula; $CRA = (PF-PS)/(PH-PS)$ y se registró pasadas 48 horas de haber regado las plantas a capacidad de campo así como después de 29 días en ausencia de agua.

3.4.1.5. Ensayo de recuperación después de la sequía

Plantas de ocho semanas de edad crecidas bajo condiciones de invernadero (fotoperiodo de 16 horas luz y 2, 000 lux de intensidad lumínica en forma permanente) fueron privadas de agua durante 29 días. Posterior a esos días se regaron hasta saturación y se registró su recuperación a las 48 horas. Se tomaron fotos a las plantas tanto a los 29 días como a los 31 días a fin de comparar su apariencia.

3.4.1.6. Vida post-cosecha de las flores

Un total de 20 plantas, cinco por línea fueron llevadas hasta floración. Las flores fueron cortadas (con aproximadamente 30 cm de tallo con hojas) cuando un centímetro de los pétalos del centro no habían abierto por completo, luego fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían agua con cloranfenicol 50 μ M para evitar la contaminación bacteriana y con ello la obstrucción de los conductos vasculares. Posteriormente, estas se colocaron a 4 °C por 48 horas, pasado el tiempo se colocaron en un estante anexo al laboratorio, bajo unos 25 °C y con iluminación artificial y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Se evaluó el tiempo que las flores duraron en la solución antes de marchitarse (perder la turgencia), para lo cual se utilizó una escala de senescencia con 6 estadios definidos en la variedad no transformada (0-5; Figura 17).

Además se tomaron los siguientes datos al momento del corte de las flores: altura, número de entrenudos, días a la inducción floral, floración completa (d) y diámetro de la flor.

3.4.1.7. Etiología de la marchitez de plantas de crisantemo cv. Harman

En lo referente a este apartado, se decidió analizar el o los agentes causales de la marchitez debido a que se observó que los síntomas solo se presentaban en las plantas NT mientras que en las LT no se apreciaba. Por lo tanto, se colectaron plantas de crisantemo que mostraban flacidez en las hojas y necrosis en la base del tallo que avanzaba hasta la mitad del mismo ocasionando la muerte. Las plantas con síntomas se colocaron en bolsas de polietileno y se trasladaron al laboratorio donde se hicieron cortes transversales del tallo en el sitio de avance de la necrosis. El tejido se desinfectó por inmersión en hipoclorito de sodio al 3 % durante cinco minutos, después de lavaron dos veces con agua destilada estéril por cinco minutos y finalmente se colocaron sobre un papel absorbente estéril para su secado y posterior colocación en cajas de Petri, conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa agar (Booth, 1988). Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y luz natural para obtener colonias puras mediante cultivos monospóricos. Una vez separadas las colonias de hongos, se procedió a su identificación de acuerdo a sus características morfológicas con las claves de Snyder y Hansen (1940). Cabe señalar que no se pudieron llevar a cabo ensayos de infección con los hongos identificados a fin de establecer con mayor precisión la tolerancia de las plantas transgénicas, la infección de las plantas aquí analizadas se dio de forma natural.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Plantas transgénicas pBIN35S::BIF

4.1.1. Ensayos de infección con bacterias: *E. chrysanthemi* y *P. syringae*

Las plantas infectadas con *E. chrysanthemi* y *P. syringae* fueron observadas cada 24 horas a fin de detectar la aparición de síntomas. Al paso de 72 horas posteriores a la inoculación se apreciaron los primeros síntomas en las NT, para el caso de la primera bacteria se observó la presencia de zonas de pudrición de forma irregular en las hojas infectadas y para el segundo tipo sólo se detectó ligera flacidez en las hojas (imágenes no mostradas). Las líneas 35S-19 y 35S-8 también mostraron síntomas luego de 120 horas, siendo más claro el daño producido por *E. chrysanthemi* en la línea que acumula más trehalosa, es decir la 35S-19 (Figura 12). Cabe señalar que este apartado sólo fue llevado a cabo para tener un panorama descriptivo del daño que ciertos patógenos tienen sobre plantas de crisantemo, sin embargo, no se realizaron repeticiones ni análisis estadísticos que respalden estos resultados a excepción de las fotos donde se muestra el daño provocado por las bacterias.



Figura 12. Plantas infectadas con *E. chrysanthemi*. En esta imagen sólo se muestra una de las tres plantas usadas por cada línea para los ensayos de infección debido a que estas fueron las más representativas.

Aranda (2002) menciona que *Erwinia chrysanthemi* es una bacteria de gran importancia en crisantemo cuyos síntomas consisten en áreas de apariencia acuosa en la lámina foliar que posteriormente se pudren, alteraciones similares

a las observadas en el presente trabajo. Otra bacteria reportada en crisantemo es *Pseudomonas cichorii*, la cual ocasiona lesiones de color café oscuro de forma circular elíptica en hojas, que con el tiempo pueden aumentar de tamaño. Esta bacteria es fluorescente en medio B de King y si bien los síntomas que produce pueden ser similares a los observados en crisantemo “Harman”, la bacteria usada en este trabajo para la infección fue *Pseudomonas syringae* y se creció en medio B de King. Por lo anterior, se hace pensar que esta bacteria no tuvo la misma capacidad infectiva que la especie de *Pseudomonas* reportada para crisantemo.

En cuanto a los resultados de la infección con las bacterias ya citadas no resulto de mucha relevancia debido a que a diferencia de la infección con el hongo, en este caso no fue posible la obtención de ARN de buena calidad para llevar a cabo la RT-PCR y con ello detectar por cuales vías se activan los genes relacionados con la patogenicidad. Sin embargo, se rescata el hecho de que el tiempo posterior a la inoculación necesario para la aparición de síntomas fue mayor para las líneas transgénicas con respecto a la NT, siendo menos susceptible la línea 35S-8 cuya producción endógena de trehalosa es menor.

Lo anterior se relaciona con lo reportado con Reignault *et al.* (2001), quienes asperjaron trehalosa en concentraciones de 15 g/L y 0.01 g/L sobre plantas de trigo, después de ser inoculadas con el hongo *Blumeria graminis*, reduciendo la infección en las hojas de trigo de un 50 % a 95 %, siendo más efectiva la dosis baja de trehalosa. Encontrando que este azúcar no inhibía la germinación conidial del hongo pero si incrementaba la deposición de la papila en células epidermales, la cual es una estructura de resistencia que se produce por modificaciones de las células de la epidermis, se compone principalmente de calosa y evitan la penetración de los hongos. Ellos concluyeron el posible papel de la trehalosa como posible elicitor que promueve la respuesta de defensa ante el ataque de patógenos.

4.1.2. Tolerancia al hongo: *P. horiana*

El hongo *Puccinia horiana* conocido como roya blanca es un parásito obligado, no presenta huésped alternativo y se disemina especialmente en material vegetal vivo (biotrófo), razón por la cual se buscaron plantas enfermas en invernaderos de Boyeros, Texcoco, Edo. de México para infectar las líneas transgénicas. De acuerdo con García-Velasco *et al.* (2007) aislamientos de esta localidad resultaron ser los más agresivos y virulentos, con un 100 % de incidencia en plantas de la variedad Indianápolis y Harman infectadas. Los primeros síntomas de infección (pústulas incipientes, que consistieron en una mancha circular de color blanco amarillento con una depresión o hundimiento) se apreciaron a los 19 días y a partir de un inóculo inicial de cero teliosporas por mililitro.

Dicha información contrasta con lo aquí obtenido (Cuadro 9), ya que las primeras pústulas incipientes aparecieron a los 25 días posteriores a la inoculación, esto en la var. Harman NT, sin embargo, en las líneas 35S-19 y 35S-8 fue de 47 y 49 días, respectivamente. Se contabilizaron las pústulas incipientes, cuyo número fue mayor para la línea NT, a pesar de que hubo presencia de estas manchas cloróticas en las líneas transformantes (Figura 13), estas no llegaron a la etapa de madurez y por consiguiente no formaron las esporas infectivas (teliosporas), que sí se presentó el control.

Estos resultados permiten deducir que la sobre-expresión endógena de trehalosa favorece la tolerancia a la infección por roya blanca, evitando que los síntomas de la enfermedad avancen a la velocidad que ocurre en plantas de crisantemo que no sobre-expresan este azúcar. De acuerdo con los resultados reportados por Reignault *et al.* (2000), se sugiere que la trehalosa confiere protección mediante la inducción de resistencia. Estos investigadores, detectaron actividad enzimática de: 1) fenilalanina amonio-liasa (PAL), 2) peroxidasa (PO) y cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), enzimas que contribuyen a la respuesta contra la invasión de hongos en cereales. Sin embargo, es evidente que una mayor cantidad de trehalosa no incrementa la

tolerancia a patógenos ya que de las líneas transformantes, la que produce menos trehalosa (35S-8) es la que desarrollo menor número de pústulas incipientes. A pesar de que los resultados obtenidos en planta completa mostraron diferencias de daño entre cada línea, no se pudo realizar un análisis estadístico, debido a que se contaba con poco material (plantas de crisantemo), esto porque el crecimiento *in vitro* de las plantas fue muy lento.

Cuadro 9. Comportamiento patogénico de *P. horiana* en líneas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa.

Línea transgénica var. Indianápolis	Inoculo inicial (teliosporas/mL)‡	Periodo de incubación (días)§	Número de pústulas incipientes §	Días a la máxima incidencia£	Incidencia final (%)¥
NT	6653	25	25	27	100
35S-19	6653	47	12	48	66.6
35S-8	6653	49	3	50	66.6

‡Teliosporas por mL obtenidas a partir de una pústula. §Número de días posteriores a la inoculación (dpi) en que aparecieron las primeras pústulas incipientes. §Número de pústulas incipientes (manchas cloróticas) como primer síntoma de infección. £Número de dpi en alcanzar la máxima incidencia por grupo de 3 plantas por línea (gpl). ¥Incidencia máxima alcanzada por gpl.



Figura 13. Plantas de crisantemo infectadas con roya blanca en la etapa de aparición de las primeras pústulas incipientes. En el rectángulo se muestran pústulas maduras color café que sólo se desarrollaron en la NT.

El establecimiento y desarrollo del patógeno es favorecido por temperaturas entre 17 y 24 °C y humedad relativa superior a 96 %; en estas condiciones la germinación de esporas y penetración en los tejidos del hospedante ocurre en 4 o 5 h, y la manifestación de los primeros síntomas se puede observar a los 7

días en cultivares susceptibles (Firman y Martin, 1968). En las plantas inoculadas y cubiertas con una bolsa de plástico, se registró una temperatura de 30°C y una humedad relativa del 61 %. Las enfermedades foliares pueden actuar de diferente manera al reducir la cantidad de radiación interceptada y, por tanto, una disminución en la tasa fotosintética. Carretero *et al.* (2006) encontraron efectos significativos, originados principalmente por patógenos biotróficos (roya blanca), sobre la fotosíntesis del tejido foliar verde remanente de hojas enfermas de trigo.

4.1.2.1. Calidad del ARN extraído de plantas infectadas con *P. horina*

El ARN total extraído de plantas de la misma edad infectadas con bacterias, resultó de menor cantidad (60-90 ng/mL) y calidad ($A_{260}/A_{280}= 1.8-1.9$; $A_{260}/A_{230}= 0.9-1.3$), que el extraído de las plantas infectadas con roya blanca, razón por la cual no fue posible la identificación de genes relacionados por la patogenicidad mediante RT-PCR. Por otro lado, la cantidad y calidad del ARN total extraído de plantas de crisantemo infectadas con roya fue de gran calidad ($A_{260}/A_{280}= 2.10-2.19$; $A_{260}/A_{230}= 2.10-2.15$) y con buen rendimiento (700-900 ng/ μ L). Aunque para el primer caso, la contaminación por proteínas estuvo entre los límites recomendados, la contaminación por otros compuestos, como carbohidratos y fenólicos, si pudo ser superior y condicionar los resultados cualitativos y cuantitativos de la extracción. Por ello, se trató de mejorar el procedimiento con diversos procedimientos como: 1) extracción con nitrógeno líquido y mortero en la fase de disrupción del tejido; 2) esterilización de todo el material por duplicado y uso de SDS al 0.5 M, 3) aplicación del protocolo de limpieza indicado en el protocolo con Trizol y 4) refrigeración a -20 °C por no más de 48 horas hasta su empleo.

La integridad del ARN total extraído y la ausencia de contaminación por ADN, se verificó mediante análisis electroforético. En todos los casos (muestras control e inoculadas con *P. horiana*) se apreciaron dos bandas (Figura 14), dos de ellas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S y una tercera, de

peso molecular algo mayor, que se interpretó como de posible ARN ribosómico mitocondrial (ARNr). No se observó ninguna banda de menor movilidad, que pudiera asignarse a ADN, en los geles.

Al observar los resultados la estimación se hace por la intensidad de la banda presente en el gel (Sharma *et al.*, 1988). La extracción de ARN es complicada cuando se utiliza tejido vegetal por ser estos ricos en polifenoles y polisacáridos (Almarza *et al.*, 2006). En este caso (Figura 14) se logró una buena extracción de ARN total usando el protocolo de Trizol® Reagent siguiendo las condiciones de uso del fabricante Invitrogen®, indicando que es un excelente procedimiento para la extracción de ARN en crisantemo.

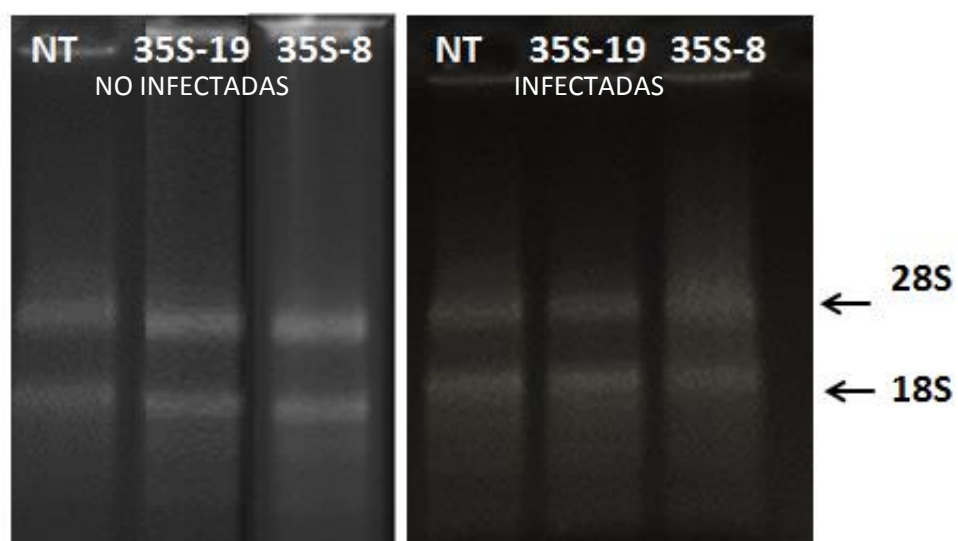


Figura 14. Análisis electroforético de ARN total de hojas de crisantemo, extraído con el método de Trizol®. Las muestras de ARN se obtuvieron a partir de plantas no infectadas e infectadas con *P. horiana* a los 50 dpi.

La cantidad de ARN colocada por pocillo fue de 3 µg, las bandas nombradas 28S y 18S corresponden al peso de acuerdo a su coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa de ARNr, el cual es el de mayor abundancia (90 %), mientras que el ARN mensajero (ARNm) sólo ocupa el 2 %, siendo este último el de importancia para éste trabajo en cuanto a la síntesis de los cDNA's, mismos que sirvieron para detectar la expresión de genes activados por la vía

del ET, JA y AS, igual que para detectar los genes relacionados con el metabolismo de la trehalosa TPS y TPP.

4.1.2.2. Diseño de cebadores para la detección de genes relacionados con patogenicidad

El diseño de los primers o cebadores, se basó en el trabajo realizado por Peer *et al.* (2000), donde se identificó la expresión de genes en plantas de *A. thaliana* inoculadas con el hongo *Alternaria brassicicola*, una vez elegidos los tres genes que más se expresaban por la vía del ET, JA y AS así como controles de expresión constitutiva, se procedió a la búsqueda en la plataforma NBRP Chrysanthemum (<http://www.shigen.nig.ac.jp/chrysanthemum/>) de los genes a fin de conocer si en las secuencias de crisantemo ahí reportadas se podrían detectar los mismos genes y así diseñar los cebadores que pudieran detectarlos. Sin embargo, no se tuvo éxito con los primers diseñados por esta vía (datos no mostrados), razón por la cual se optó por seguir la estrategia descrita en materiales y métodos.

Los primers obtenidos mediante el uso de herramientas bioinformáticas como primer 3, ADN mfold y BLAST, entre otros, así como el trabajo realizado por Li *et al* (2014), permitieron obtener un total de 12 pares de primers, tres para la vía del AS (NPR1, PGA y MYB), tres para la vía del JA (JAZ, PAL y MYC2), cuatro para la vía del ET (CHS, ACCO, ERTF y PO) y finalmente dos controles (Actina y EF1 α). Todos ellos detectados mediante RT-PCR.

4.1.2.3. Optimización de las condiciones de la RT-PCR

Debido a que las primeras RT-PCR's no amplificaron bandas con todos los pares de primers, se optimizaron las condiciones, obteniendo el mayor número de bandas cuando se usó MgCl₂ 0.3 mM, una T_m= 55 °C y 40 ciclos.

La PCR es una técnica enzimática altamente sensible que se fundamenta en la amplificación *in vitro* de segmentos de ADN determinados, usando secuencias

específicas o primers. Una de las modificaciones de esta técnica es el uso de la transcriptasa reversa, que es una enzima capaz de sintetizar ADNc partiendo de un molde de ARN (Sharman *et al.*, 2002), seguida de una PCR sencilla. De esta manera es posible evidenciar la presencia de un ARN mensajero específico en la mezcla de ARN total. Se implementó la técnica de RT-PCR sobre material NT de crisantemo, para lo cual se utilizó el gen endógeno actina. Este gen es de expresión constitutiva, puesto que es transcripcional y traducionalmente activo en todas las células vegetales, independientemente del tejido, órgano, edad u otra condición de la planta. El gen actina codifica para una proteína altamente conservada en eucariotas, que juega un papel crucial en el mantenimiento del citoesqueleto (Zhang *et al.*, 2005), y tiene un rol importante en la célula vegetal, que involucra la morfogénesis, mitogénesis y otros procesos celulares (Yu *et al.*, 1998). La naturaleza del gen constitutivo actina permite hacer estandarizaciones de técnicas moleculares PCR y RT-PCR, ya que se va a encontrar por lo menos una copia del gen actina por genoma en cada célula vegetal.

Una vez estandarizado el método para la detección del gen actina, este se usa como control interno o endógeno para dicha técnica a fin de garantizar que la detección en las plantas transgénicas de un gen foráneo particular y de interés, corresponde en efecto a la expresión de genes relacionados con la patogenicidad, después de infectar las plantas con *P. horiana* y no a un artefacto de las reacciones moleculares, producto de la calidad y cantidad del ADN extraído (López *et al.*, 2006). En este caso, lo que se busca es probar que la producción endógena de trehalosa activa a los genes de patogenicidad y el gen de actina tiene la función de mostrar que la reacción fue equiparable en plantas NT y plantas transformadas.

Por tanto, la importancia de la presencia de controles internos o endógenos en los procesos de caracterización molecular de plantas transgénicas es importante, sobre todo cuando la transformación genética se ha logrado

mediante *Agrobacterium tumefaciens*, caso en el que se ha reportado inserción de 1 a 5 copias de los genes de interés en los genomas transformados (Gelvin, 2003).

4.1.2.4. Detección de genes relacionados con patogenicidad

A pesar de que la calidad del ARN de las líneas transgénicas usadas para los ensayos de infección con roya fue buena, al parecer no se sintetizó el ADNc para todas estas, por lo que al momento de la RT-PCR, sólo fue posible la amplificación de genes relacionados con patogenicidad para la línea 35S-8 y la Indianápolis NT, tanto infectadas como sanas. Los perfiles electroforéticos obtenidos se muestran en la Figura 15.

Como se aprecia en todos los geles (A, B, C y D), en el carril dos no se observa ningún amplicón, este corresponde a la amplificación con uno de los controles que es EF1 α , el cual es de expresión constitutiva y se relaciona con el proceso de la floración, sin embargo, se tuvo la amplificación en todos los caso del control correspondiente a actina.

Ahora bien, si comparamos los geles A y B, podemos observar algunas discrepancias en cuanto a los tamaños de las bandas esperadas, los fragmentos amplificados con los genes relacionados con la patogenicidad correspondieron en casi todos los casos con el peso molecular, a excepción de PAL, ACCO y PGA que dieron un fragmento de aproximadamente 100 pb, 295 pb y 50 pb, respectivamente. PAL aparece solo en la planta transgénica, infectada y no infectada, pero no aparece en la NT infectada o no infectada, este dato parece ser el único dato consistente. Por otro lado, el gen de actina si se amplifica en todos los casos.

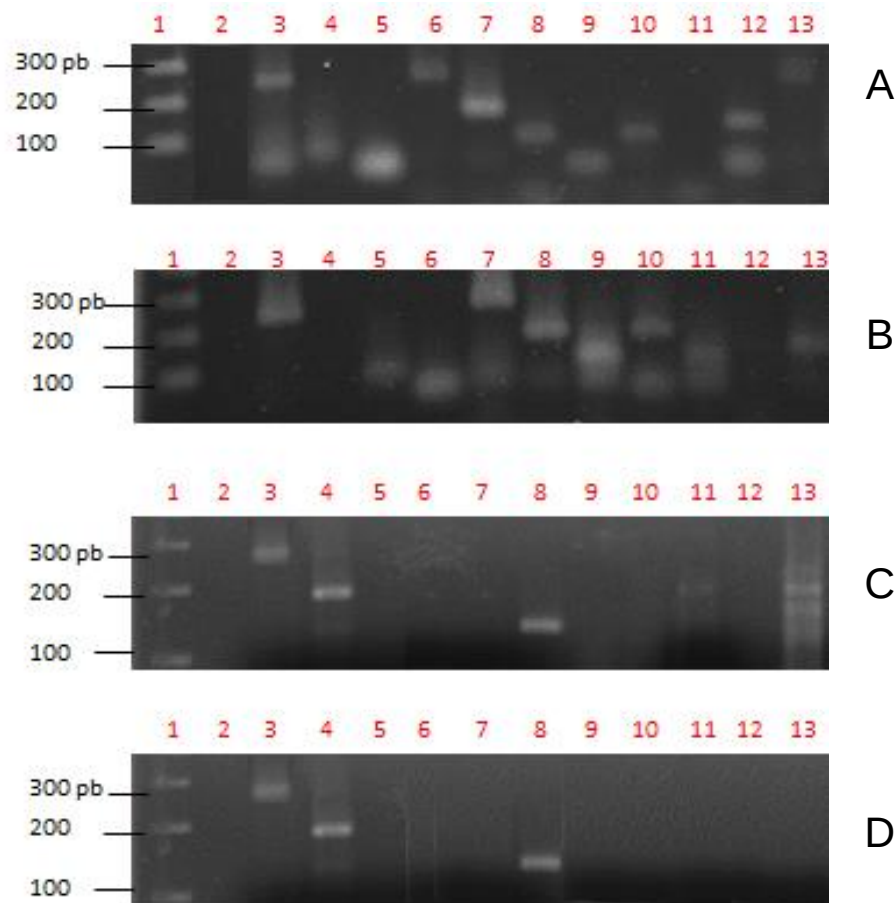


Figura 15. Perfil electroforético de las amplificaciones obtenidas mediante RT-PCR. A) Línea 35S-8 infectada con roya blanca a los 50 dpi; B) Línea 35S-8 sana; C) Línea NT infectada con roya blanca; D) Línea NT sana. Para todos los casos se usaron los siguientes cebadores para la detección de los genes relacionados con la patogenicidad, carriles: 1) marcador 100 pb, 2) EF1 α 3) Actina, 4) PAL, 5) CHS, 6) ACCO, 7) JAZ, 8) MYC2, 9) NPR1, 10) ERTF, 11) PGA, 12) PO, 13) MYB.

Con estos resultados se aprecia que la mayoría de los iniciadores no funcionaron como se esperaba, por lo que el aventurarnos al diseño de primers relacionados con la patogenicidad a partir de secuencias reportadas para *Chrysanthemum morifolium* y alineamientos de especies de la misma familia (Asteraceae) no resulto favorable y no se elucidó la vía activada por trehalosa.

4.2. Plantas transgénicas pBINRd29A::BIF

Siguiendo el protocolo de transformación por *Agrobacterium* propuesto por Valle-Sandoval (2008), se obtuvieron 16 líneas transgénicas que acumularon trehalosa entre 26.25 y 70.62 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, después de inducir las plantas por 48 h a 4 °C. Se seleccionaron las tres líneas transgénicas con el contenido endógeno de trehalosa más alto (Cuadro 10), estas líneas se llevaron hasta floración para evaluar la vida post-cosecha de las flores y también se determinó su tolerancia a estrés hídrico.

Las plantas transgénicas crecidas *in vitro* mostraron algunas diferencias morfológicas en comparación con la control (NT), como un más lento crecimiento en medio MS, entrenudos más cortos, hojas lanceoladas y un color verde ligeramente más intenso. Sin embargo, cuando las plantas se adaptaron a crecer *ex vitro* y a excepción de la forma de la flor, el aspecto vegetativo de las plantas transgénicas se fue tornando similar a la NT. El color verde más intenso en las transformantes pudiera deberse a una mayor actividad fotosintética, sin embargo, no se determinó el contenido de clorofila que de acuerdo con Valle-Sandoval (2008), tiene una relación positiva con respecto a la acumulación de trehalosa. Garg *et al.* (2002) menciona que plantas transgénicas de arroz que sobre-expresan la construcción bifuncional OtsA-OtsB y acumulan más trehalosa, muestran además una mayor capacidad fotosintética por unidad de área foliar. Lo anterior, se atribuye más a la acumulación de trehalosa que al intermediario trehalosa-6-P (Schluepmann *et al.*, 2003). Las líneas seleccionadas se analizaron por RT-PCR para comprobar la expresión de los genes TPS y TPP bajo inducción (4 °C por 48 horas) y sin inducción (26°C). En la Figura 16 se aprecian los resultados de la detección de estos genes, siendo de mayor grosor la banda en plantas inducidas (I).

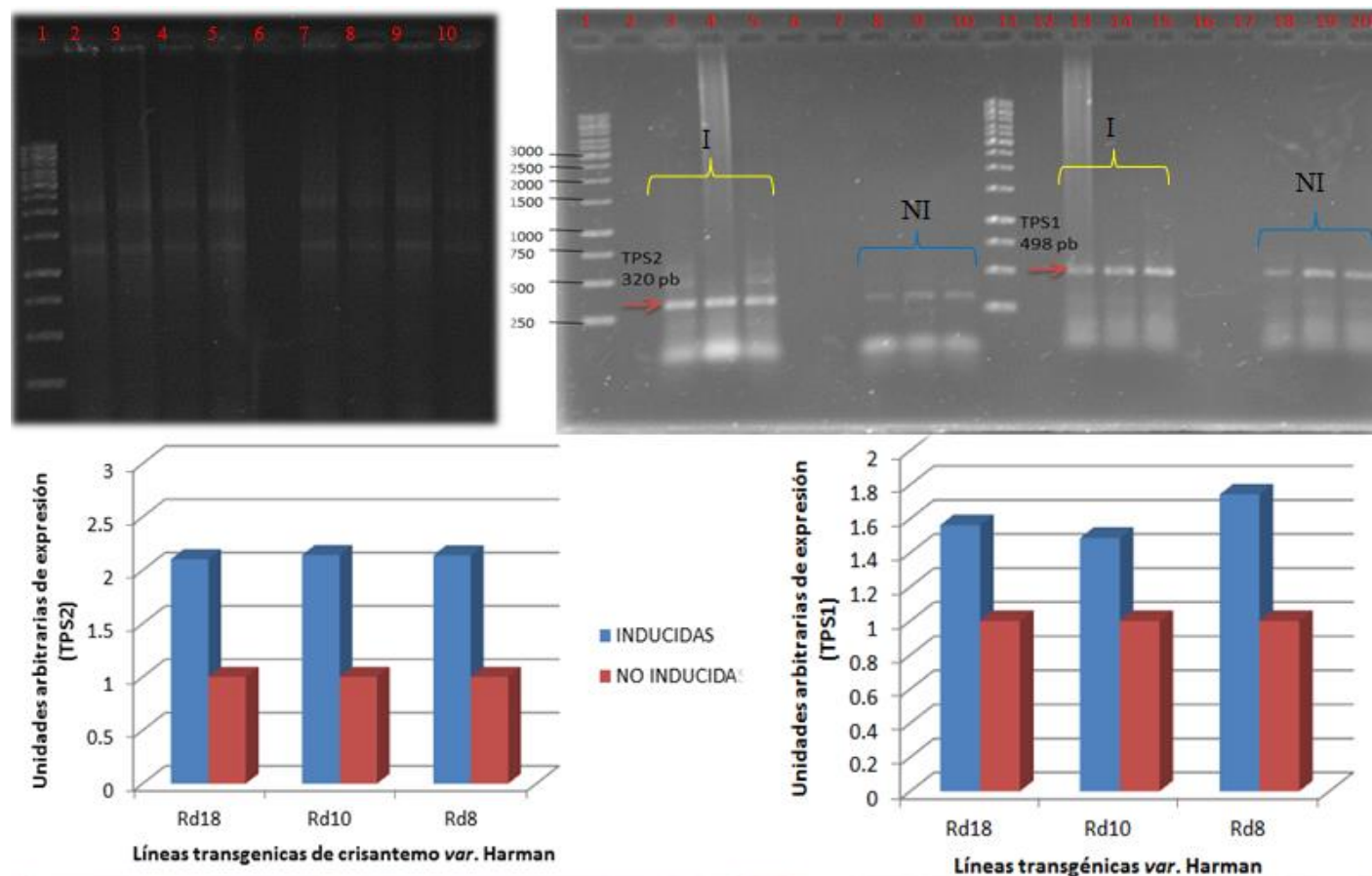


Figura 16. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa inversa (RT-PCR), donde se observa tanto el gel de agarosa al 1 % donde se corrió el ARN total extraído (3µg/ pocillo) de la NT y las 3 líneas transgénicas, siendo las de los carriles 2-5 inducidas (I) y de los carriles 7-10 no inducidas (NI). Los productos de la RT-PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % y la intensidad de las bandas se representa en las gráficas, obtenidas al analizar las bandas con el software my Image Analysis v. 1.1. (Thermo Scientific Fisher Inc. 2012).

Cuadro 10. Contenido endógeno de trehalosa en las tres líneas transgénicas seleccionadas.

Línea	Trehalosa ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco)	
	Sin inducir	Inducida
NT	0	27.5
Rd 18	45	76.25
Rd 10	6.25	62.5
Rd 8	0	52.5

4.2.1. Las flores de plantas transformadas senescen más lento

La razón por la cual se generaron estas nuevas líneas que sobre-expresan trehalosa fue a que de acuerdo con Valle-Sandoval (2008), la vida post-cosecha de las flores de crisantemo transformadas con el gen 35S::ScTPS1ScTPS2 (con promotor constitutivo) fue menor. La explicación a esto según Paul *et al.* (2008), es que la acumulación del intermediario trehalosa 6-fosfato, incrementa el contenido de clorofila y probablemente la tasa fotosintética provocando una senescencia más acelerada.

Por tal motivo, se buscó controlar este efecto al generar líneas transgénicas de la variedad Harman con el gen *Rd29A::ScTPS1TPS2*, con un promotor inducible por frío y sequía. En este caso sí se pudo observar claramente que las flores que acumularon trehalosa de manera inducible, exhibieron una mayor duración después del corte con respecto a la NT (Figura 17). De forma adicional se tomaron algunos datos morfológicos de las plantas llevadas a floración a fin de comparar con el control, la información se representa en el Cuadro 11.

Con el fin de comparar la senescencia de las flores de plantas que acumulan trehalosa, es decir las líneas transformantes con la NT, se tomaron fotografías de las plantas a los 0, 10 y 20 días, que para el caso de las plantas NT fue el tiempo en que más senescencia mostraron en los pétalos de las flores y a partir

de estas se estableció también una escala de senescencia que fue de 0-5 para las NT y de 0-2 para las líneas transgénicas a los 20 días del corte, al cumplir 30 días en florero alcanzaron la apariencia de estadio 5.

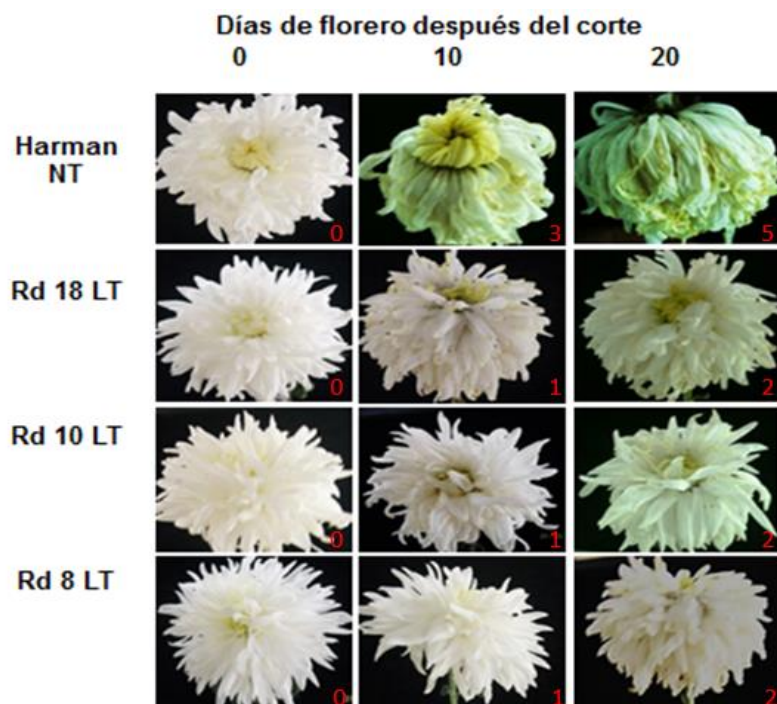


Figura 17. Comportamiento en la senescencia de las líneas transgénicas que sobre-producen trehalosa, en comparación con la no transgénica (NT). El ensayo se hizo con 5 flores cortadas de cada línea, obteniéndose resultados similares a los mostrados en esta imagen.

En trabajos previos se ha reportado que la aplicación exógena de trehalosa mejora la capacidad de retención de agua de las plantas y con ello se alarga su vida en el florero (Iwaya-Inoue y Takata, 2001). También se ha reportado que la acumulación endógena de trehalosa y del intermediario trehalosa-6P, incrementa la tasa fotosintética y altera el contenido de carbohidratos, incrementando ligeramente el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa, en comparación con plantas no transformadas (Garg *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el contenido endógeno de trehalosa-6P y de trehalosa, afecta el metabolismo de carbohidratos. Es posible que tanto la fotosíntesis como la

glicolisis se vean afectadas en las plantas transformadas con niveles alterados de estos compuestos (Schluepmann *et al.*, 2003).

En las plantas la senescencia está regulada más que nada por el contenido endógeno de citocininas y etileno. Mientras que las citocininas retrasan este proceso, el etileno lo acelera (Rout *et al.*, 2006). Pareciera que al incrementar el metabolismo de la trehalosa, se inhibe el efecto de las citocininas y se refuerza el efecto del etileno.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman una de nuestras hipótesis iniciales, que los efectos pleiotrópicos indeseables podrían atenuarse mediante el uso de un promotor inducible.

Cuadro 11. Datos morfológicos de las líneas transformantes de crisantemo var. Harman y el control NT. Análisis mediante comparación de Medias de Tukey's.

	NT	Rd18	Rd10	Rd8	DMS
Altura (cm)	68.2±6.3a	63.8±3.4b	67.3±8.0a	64.6±4.2b	2.6953
No. De entrenudos	30.1±1.4b	29.7±1.8b	30.9±1.9ab	33.5±2.7a	2.8824
Inducción floral (d)	60.2±1.3a	59.7±2.4a	61.1±1.8 ^a	63.4±2.2a	5.0137
Floración completa (d)	78.1±0.9a	77.4±1.2a	78.6±1.1 ^a	78.4±1.0a	4.9554
Diámetro flor (cm)	11.4±0.8a	11.1±0.9ab	9.7±0.6bc	9.3±0.5c	1.6096

* DMS= Diferencia Mínima Significativa. Dónde la misma letra en cada fila indica que el valor no cambio en relación con las líneas transgénicas y la NT.

4.2.2. Tolerancia de las líneas transgénicas a estrés hídrico

Primero se efectuó un experimento de desecación de hojas de las tres líneas transgénicas antes mencionadas, en comparación con la variedad NT. Como se aprecia en la Figura 18, todas las transformantes retienen más agua que la NT, incluyendo la línea Rd8 que es la que acumula menos trehalosa. La apariencia de las hojas de LT al final del tiempo de muestreo (130 min) fue más turgente.

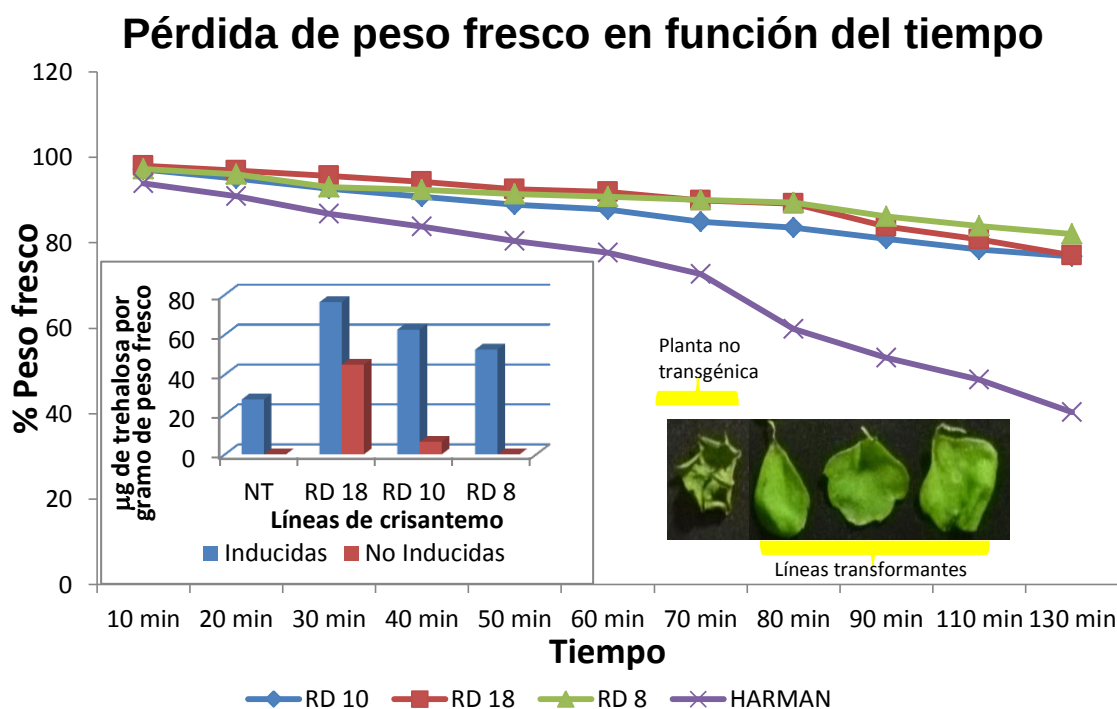


Figura 18. Efecto del contenido de trehalosa en la pérdida del peso fresco.

Posteriormente, se desarrollaron plantas en el invernadero hasta las 8 semanas, al iniciar con el experimento de tolerancia a sequía, las plantas se regaron hasta capacidad de campo y luego se dejaron sin regar por 29 días. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de tejido para determinar el CRA y los resultados se muestran en la Figura 19. Las plantas transgénicas poseen un mejor estatus hídrico, demostrado al medir el CRA en hojas de las plantas sometidas a sequía. Se ha demostrado que la trehalosa es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas, así como la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Crowe y Champman, 1984).

En la Figura 20 se muestra a las líneas Rd18, Rd10 y Rd8 después de 29 días de sequía (Parte A), mientras que después de irrigar dichas plantas a capacidad

de campo, se tomó una foto (Parte B), en la cual se muestra que las LT tuvieron mayor tolerancia que la NT. Esto se atribuye a la acumulación endógena de trehalosa, pero no parece ser que a mayor trehalosa, mayor tolerancia a sequía, pues las la línea Rd18 presentan mayor contenido de trehalosa con respecto a la Rd10 y esta con relación a la Rd8, sin embargo, en apariencia lució más turgente la Rd10 además de que su CRA fue más alto después del periodo de sequía. Garg *et al.* (2002), lograron fusionar traduccionalmente OtsA y OtsB de *E. coli* para obtener una nueva enzima bifuncional capaz de producir trehalosa en arroz, sin acumular significativamente trehalosa-6-fosfato, las plantas obtenidas por este grupo de trabajo mostraron una mayor tolerancia a sequía.

Además del posible efecto osmoprotector de la trehalosa, se ha demostrado que la sobre-expresión de ScTPS1-TPS2, e incluso de sólo TPS1, produce un fenotipo tolerante a sequía presumiblemente por la activación de genes que en la planta contribuyen a su adaptación al estrés abiótico; posiblemente este efecto esté dado más por el intermediario trehalosa-6-P que por la trehalosa misma (Miranda *et al.*, 2007; Avonce *et al.*, 2004; Garg *et al.*, 2002).

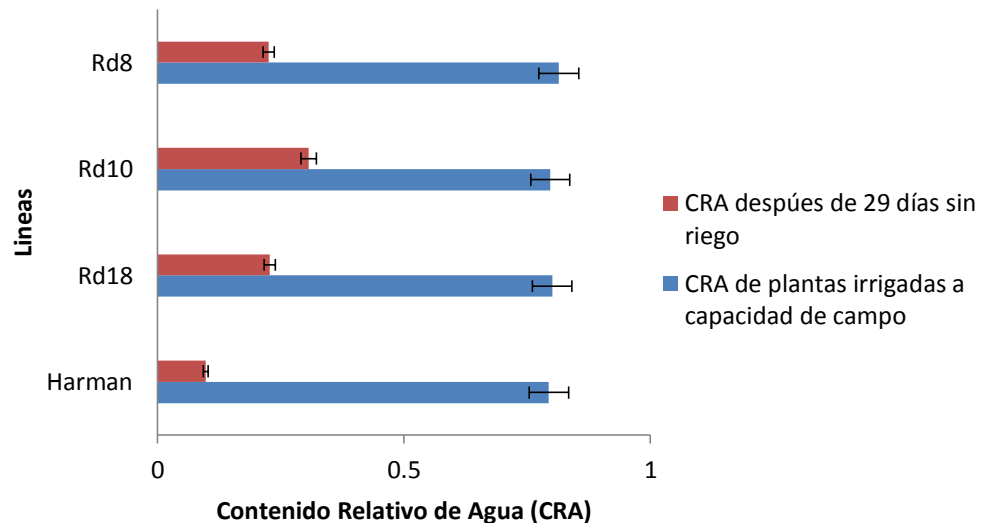


Figura 19. Contenido relativo de agua (CRA) de líneas transgénicas y NT de 8 semanas de edad, después de 29 días sin riego. El CRA se expresa en gramos

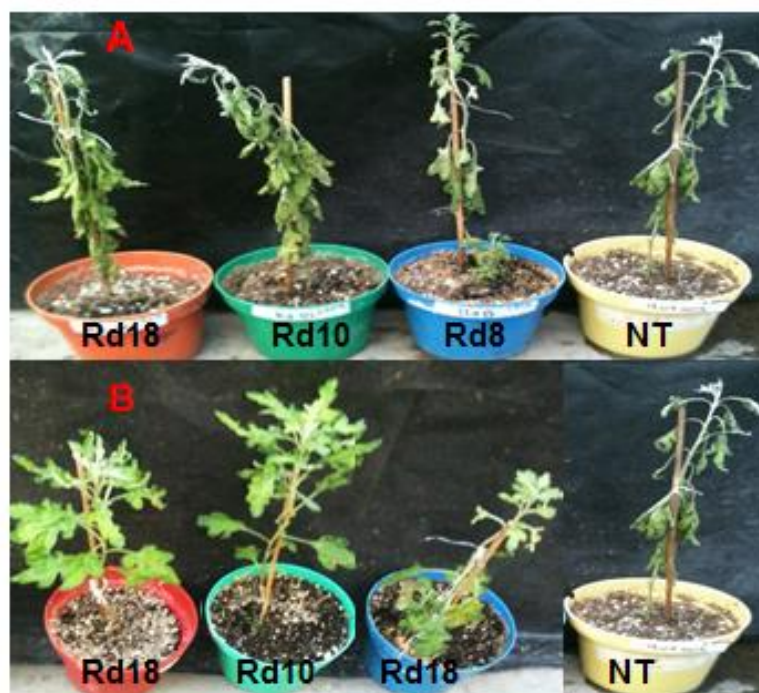


Figura 20. Experimentos de tolerancia a sequía. Las líneas transgénicas toleran más la sequía en comparación con la NT. A) Plantas después de 29 días en ausencia de agua; B) Plantas irrigadas.

4.2.3. Etiología de la marchitez causada por patógenos

De algunas plantas de crisantemo “Harman” (NT) con síntomas de marchitez colectadas en invernadero (Figura 21), se aislaron tres hongos, dos de ellos formaron colonias redondas, la primera color blanco cremoso con abundante presencia de microconidios y macroconidios alargados, la segunda de color blanco-amarillento con presencia de pigmentos marrones oscuros de las hifas, ramificaciones del septo central que forman ángulos de 90° y abundante presencia de conidios, finalmente el tercer hongo formó una colonia verdosa-gris de forma irregular con gran cantidad de conidióforos libres (Figura 22).

Booth (1988) indica que las colonias de *Fusarium oxysporum* presentan un color violeta a púrpura con abundantes microconidios y menor cantidad de macroconidios, clamidosporas laterales e intercalares, características que no coinciden con las observadas en la primera colonia del presente estudio. *Smith et al.* (1992) mencionan que *F. oxysporum* es en primer lugar y

predominantemente, un saprófito abundante y activo en el suelo y materia orgánica. Además, algunas cepas tienen una actividad patogénica específica, las cuales constituyen sólo una porción pequeña de la población total del suelo a pesar de lo cual causan enfermedades importantes en los cultivos. Ciertas cepas están poco especializadas y causan muerte de plántulas, necrosis o podredumbres; sin embargo, las especies causantes de marchitez son las más importantes.

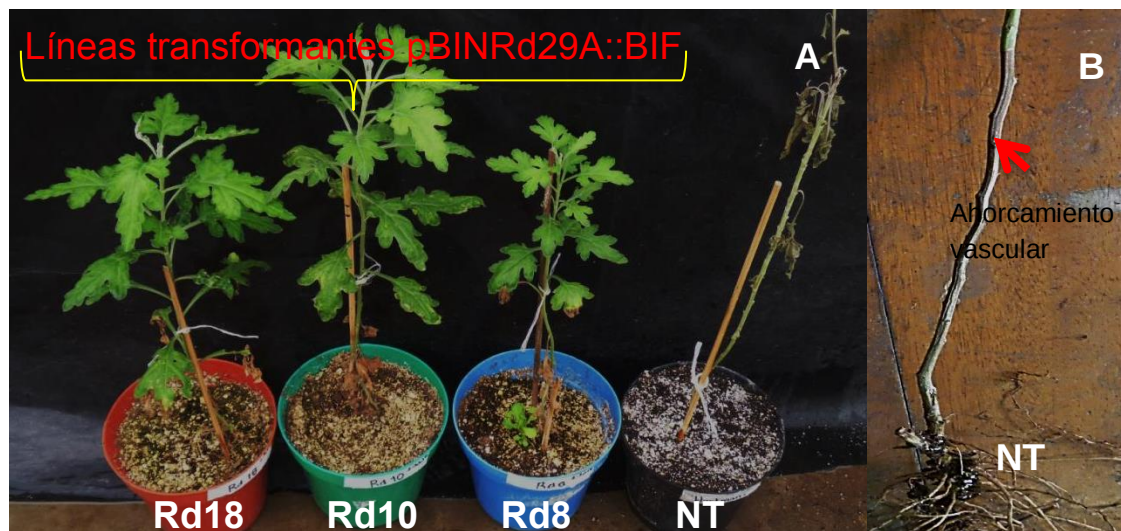


Figura 21. Comparación de plantas no susceptibles a marchitez y la NT con síntomas de la enfermedad.

Por otro lado, la colonia color blanco cremoso corresponde al género *Fusarium* de acuerdo a las claves de Snyder y Hansen (1940), misma que durante su crecimiento en PDA no formó clamidosporas. Horst y Nelson (1997) señalan que los síntomas causados por *Fusarium oxysporum* consisten en un severo achaparramiento, seguido por la muerte de la planta, síntomas que no coinciden con los observados en las plantas de crisantemo “Harman” en invernadero. En este último caso, los síntomas iniciales consistieron en una marchitez de la planta, necrosis alrededor de la base del tallo y raíz, además las hojas permanecieron adheridas al tallo hasta la muerte de la planta. Estas alteraciones son debidas a que el micelio y los conidios invaden los tejidos vasculares, llegando a bloquear físicamente la translocación de agua

produciendo marchitez, aunado a la presencia de toxinas que afectan la permeabilidad de las membranas celulares que a su vez afectan el metabolismo de la planta (Romero, 1996; Herrera y Ulloa, 1998).

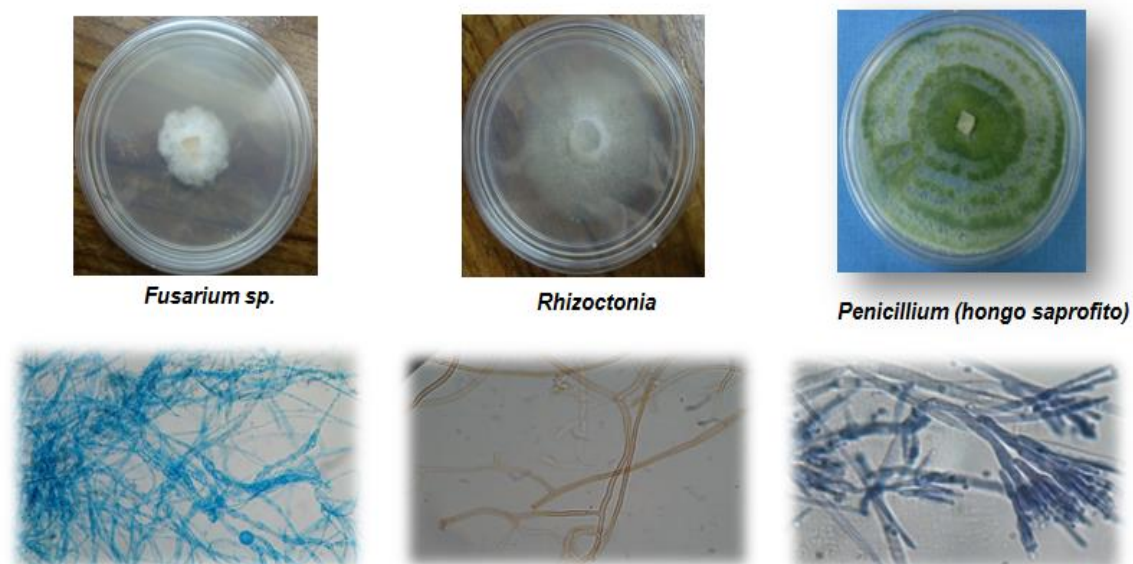


Figura 23. Morfología de las cepas de hongos aislados de plantas con síntomas de marchitez.

La segunda colonia de color blanco-amarillento se clasificó como perteneciente al género *Rhizoctonia*, ya que se caracteriza por la producción de esclerocios en una textura uniforme con redes hifales que unen el micelio con plantas, poseen estrangulamiento de la hifa y formación de septos a una corta distancia del punto donde se originan las ramas hifales (Herrera y Ulloa, 1998).

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los de Burges (1960) ya que el género *Penicillium* se encontró en mayor proporción (77 %), seguido de *Fusarium* (21 %) y otras (2 %).

Las poblaciones de hongos que se encuentran en el suelo pueden ser benéficas o deletéreas afectando el desarrollo de las plantas. *Penicillium sp.* vive como saprófito en el suelo y agua donde contribuyen a la descomposición y reciclado de la materia orgánica (Ulacio *et al.*, 2002). *Fusarium oxysporum* está

reportado como patógeno del suelo causante de marchitez en diversas especies ornamentales (Tlapal y Mendoza, 2002).

Tlapal y Mendoza (2002) mencionan a *Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytum* spp., *Sclerotium*, *Phytophthora drechsleri* y *P. cryptogea* en plantas ornamentales como patógenos causantes de marchitez y pudrición de la raíz. Rodríguez et al. (2000) determinaron que los hongos asociados con la pudrición de raíz y corona de gerbera (*Gerbera jamesonii*) fueron *P. drechsleri*, *F. oxysporum* y *R. solani*. Por su parte, García et al. (2003) reportaron a *Fusarium* sp. y *Mucor* sp. como los hongos asociados con la marchitez del crisantemo “Polaris” en Villa Guerrero, Estado de México, siendo *Fusarium* y *Rhizoctonia* los principales géneros identificados como causantes de la marchitez en esta investigación.

V. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron líneas transgénicas que acumulan trehalosa con el gen quimérico Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS con el siguiente fenotipo:
 - a) Alteraciones en el desarrollo vegetativo, que se atenuaron a medida que las plantas se desarrollaron.
 - b) Los días para la inducción de la floración no se afectaron en las plantas transgénicas, pero si la morfología de la flor que en general fue de menor volumen y menos compacta.
 - c) Recuperación de la turgencia después de 29 días sin irrigar así como menor deshidratación en hojas.
 - d) Senescencia más lenta, atribuible al promotor inducible utilizado.
 - e) Resistencia a los patógenos *Rhizoctonia* y *Fusarium* sp., identificados como los patógenos causantes de la marchitez en este trabajo.
2. Las líneas de crisantemo con el gen quimérico 35S::ScTPS1-TPS2::NOS fueron más tolerantes al hongo *P. horiana* con respecto a la línea NT.

3. El análisis para detectar los genes relacionados con la patogenicidad no arrojó un resultado favorable debido a que los iniciadores no amplificaron los fragmentos esperados, a excepción de la actina (control).

VI. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. San Diego California. The United States of America. 922 p.
- Albouy, J. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Mundi.prensa, México, 479 p.
- Alexopoulos, C. J. y Mims, C. W. 1985. Introducción a la Micología. Ed. Omega, S. A. Barcelona, España. 638 p.
- Ali Dib, T.; Mlnneveux, P. y Araus, J.L. 1990. Breeding durum wheat for drought tolerance. Analytical synthetical approaches, and their connections. En: Symposium on wheat breeding. Prospects and future approaches. Varna, Bulgaria, pp. 1-33.
- Almarza, J.; Morales, S.; Rincón, L. y Brito, F. 2006. Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. Analytical Biochemistry 5(358): 143-145.
- Alvarez, M. E.; Pennell, R. I.; Meijer, P. J.; Ishikawa, A.; Dixon, R. A. y Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92: 773-784.
- Anikster, Y. y Wahl, I. 1979. Coevolution of the rust fungi on gramínea and Liliaceae and their host. Annu. Rev. Phytopathol. 17: 367-403.
- Aranda, O. S. 2002. Enfermedades bacterianas en ornamentales. In: Manejo fitosanitario en ornamentales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 156 p.
- Arbos-Lavila, A. M. 1992. El crisantemo. Cultivo, multiplicación y enfermedades. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 170 p.

- Avonce, N.; Leyman, B.; Mascorro-Gallardo, J.; Van Dijck, P. A.; Thevelin, J. M. e Iturriaga, G. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- Avonce, N.; Leyman, B.; Thevelein, J. e Iturriaga, G. 2005. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochemical Society Transactions* 33(1): 1-4.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2nd ed). Interamericana McGraw-Hill, Madrid, pp. 577-597.
- Ball, G. J. 1991. Ball Red Book. 15th edition. pp. 435-468. In: V. Ball (ed.). *Greenhouse growing*. Ball Publishing. West Chicago, IL, USA.
- Barnett, H. T. y Hunter, B. B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth Edition. APS Press. 218 p.
- Barrera, O. A.; Cabrera, R. J.; García, P. F.; Alcántara J. C.; Sánchez M. E.; Cruz M. J. y Granada C. L. 2007. Producción de Crisantemo (*Dendranthema spp*) en Morelos. SAGARPA, INIFAP, CIRPAS. Campo Experimental "Zacatepec". Folleto Técnico No. 27. Zacatepec, Morelos. 13 p.
- Bent, A. F. y Mackey, D. 2007. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology* 45: 399-436.
- Blázquez, M. A.; Santos, E.; Flores, C. L.; Martínez-Zapater, J. M.; Salinas, J. y Gancedo. 1998. Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant Journal* 13: 685-689.
- Blum, A. 1988. *Plant Breeding for stress environments*. CRC Press, Florida, 223p.
- Booth, C. 1988. *Fusarium. Laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute. Slough, England. 156 p.

- Brodmann, D.; Schuller, A., Ludwing-Müller.; Aeschbacher, R. A.; Wiemken, A.; Boller, T. y Wingler, A. 2002. Induction of trehalasa in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(7): 693-700.
- Browse, J. 2009. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology* 60: 183-205.
- Burges, A. 1860. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 199 p.
- Cao, H.; Bowling, S. A.; Gordon, A. S. Y Dong X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592.
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Clarke, J. D.; Volko, S. y Dong, X. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *Plant Cell* 88: 57-63.
- Carpenter, J. F. y Crowe, J. F. 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28: 3916-3922.
- Carretero, R., Serrago, R. A. y Miralles, D. J. 2006. Relación entre las enfermedades foliares y el crecimiento, intercepción de luz y EUR en trigo. XXVI. Reunión de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal. Chascomús. B. As. Argentina. 101 p.
- Carver, T. L. W.; Zeyen, R. J.; Bushnell, W. R. y Robbins, M. P. 1994. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases cuantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D. C.). *Physiology and Molecular Plant Phatology* 44: 261-272.
- Colaco, C.; Sen, S.; Thangavelu, M.; Pinder, S. y Roser, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalosa: simplified molecular biology. *Bio/Technol.* 10: 1007-1111.

- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F. y Wistrom, A. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and protein by sugars. *Plant Science* 169: 75-82.
- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Prestrelski, S.; Hoekstra, F. A.; Araujo, P. D. y Panek, A. D. 1997. Anhydrobiosis: celular adaptation to extreme dehydration, in: W. H. Dantzler (Ed), *Handbook of Physiology*, Oxford University Press, New York, NY, pp. 1445-1447.
- Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A. y Crowe, L. M. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review Physiology* 54: 579-599.
- Crowe, J. L. y Champman, D. 1984. The role of the trehalose: Preservation of membranes in anhidrotic organism. *Science* 223: 209-217.
- Dangl, J. L. y Jones, J. D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- De Wit, P. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2726-2732.
- Dempsey, D. M. A. y Klessig, D. F. 1994. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol.* 4: 13-18.
- Dempsey, D. A.; Shah, J. y Klessing, D. F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 18: 547-575.
- Devoto A. y Turner J. G. 2003. Regulation of Jasmonate-mediated Plant Responses in Arabidopsis. *Ann Bot.* 92: 329-37.
- Dole, J. M. y Wilkins, H. F. 2005. Floriculture: principles and species. 2nd edition. Pearson Prentice Hall. Upper Sanddle River, New Jersey, The United States of America, 1023 p.
- Dong, X. 1998. SA, JA. Ethylene. And disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316-329.
- Dong, X. 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion Plant Biology* 4: 309-314.
- Elbein A.D.; Pan, Y. T.; Pastuszak, I. y Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiol.* 13(4):17-27.

- Enríquez, J. R.; Velásquez, B.; Vallejo, A. R.; Velasco, V. A. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. Rev. Fitotec. Mex. 28(4):337-383.
- Fan, W. y Dong, X. 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. Plant Cell 14: 1377-1389.
- FAOSTAT. 2014. The State of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en Internet: <http://www.fao.org/corp/statistics/en> Consultada el 5/12/2014.
- Fernández, A.; Casanova, A.; Jiménez, R.; Correa, M. y Méndez, M. 2007. Efecto de tipos de bandejas y sustratos en la propagación de esquejes y la floración del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cultivar "polaris". Temas de Ciencia y Tecnología 11(33):65-69.
- Fernández, O.; Béthencourt, L.; Quero, A.; Sangwan, R. S. y Clément, C. 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. Trends in Plant Science 15 (7): 409-417.
- Firman, I. D. y Martin, P. H. 1968. White rust of chrysanthemums. Ann. Appl. Biol. 62: 429-442.
- García, R. V.; Zavaleta-Mejía, E.; Rojas-Martínez, R. I.; Leyva-Mir, S. G.; Fuentes, D. G. y Simpson, J. 2007. Pathogenic and molecular variability of *Puccinia horiana* Henn. Isolates. Rev. Fitotec. Mex. 30(3): 223-234.
- García-Velasco, R.; Ochoa, M. D. L.; Zavaleta-Mejía, E. y Mora, A. G. 2003. Etiología de la marchitez del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cv. Polaris. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(1): 75-78.
- García-Velasco, R.; Zavaleta-Mejía, E.; Rojas-Martínez, R. I.; Leyva-Mir, S. G.; Fuentes-Dávila, G. y Simpson, J. 2007. Variación patogénica y molecular de aislamientos de *Puccinia horiana*. Rev. Fitotec. Mex. 30(3): 223-234.
- Garg, A. K.; Kim, J. K.; Owens, T. G.; Ranwala, A. P.; Choi, Y. D.; Kochian, L. V. y Wu, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. PNAS USA. 99:15898-15903.

- Gélinas, P.; Fiset, G.; Le Duy, A. y Goulet, J. 1989. Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of bakers' yeast in frozen dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2453-2459.
- Gelvin, S. 2003. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1), 16-37.
- Gillapsy, G.; Ben-David, H. y Gruissen, W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1452.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- Goddijn, M. O.; Verwoerd, T. C.; Voogd, E.; Krutwagen, R.; Graaf, P. y Poels, J. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113: 181-190.
- Goddijn, O. J. M. y van Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 315–319.
- Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. 2da edición. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México. 551 p.
- Horst, K. y Nelson, P. 1997. *Compendium of chrysanthemum diseases*. APS Press. Ohio, US., 62 p.
- IAPT (International Association for Plant Taxonomy). 2014. Catalogue of life: 2014 annual checklist. Indexing the world's known species. (Consultado en noviembre de 2014) http://www.iapt-taxon.org/index_layer.php.
- In-Cheol, J.; Se-Jun, o.; Ju-Seok, S.; Won-Bin, C. S. y Chung, S. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant physiology* 131: 516-524.

- Iordachescu, M. e Imai, R. 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 1223–1229.
- Iturriaga, G.; Gaff, D. F. y Zentella, R. 2000. New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Aust. J. Bot.* 48: 153-158.
- Iturriaga, G.; Suárez, R.; y Nova-Franco, B. 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 5: 1-18.
- Iwaya-Inoue, M. y Takata, M. 2001. Trehalose plus chloramphenicol prolong the base life of tulip flowers. *HortScience* 36: 946-950.
- Jameson, P. E. y Clarke, S. F. 2002. Hormone-virus interactions in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(3): 205-228.
- Jiménez-Díaz, R. M. 1992. Conceptos actuales sobre la resistencia a las enfermedades de las plantas. *Phytoma* 38: 51-55.
- Jones, J. D. y J. L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kepinski, S. y Leyser, O. 2003. SCF-Mediated Proteolysis and Negative Regulation in Ethylene Signaling. *Cell* 115: 647-658.
- Kieber, J. J. 1997. The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 277-296.
- Kim, M. G.; Kim, S. Y.; Kim, W. Y.; Mackey, D. y Lee, Y. L. 2008. Responses of *Arabidopsis thaliana* to Challenge by *Pseudomonas syringae*. *Molecules and Cells* 25: 323-331.
- Kinkema, M.; Fan, W. y Dong, X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12: 2339-2350.
- Kofranek, A. M. 2004. Crisantemos de corte. pp. 3-42. In: R. A. Larson (ed.). *Introducción a la floricultura*. 3a ed. AGT Editores. México, D. F. 540 p.
- Krebs, K. E. 1985. Chrysanthemum white rust can be controlled. *Gartner-börse and Gartenwelt* 3: 69-73.
- Kumar, B.; Kumar, S. y Thakur, M. 2012. In vitro mutation induction and selection of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum* Tzelev) lines

- with improved resistance to *Septoria obesa* Syd. International Journal of Plant Research 2 (4): 103-107.
- Kunkel, B. N. y Brooks, D. M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology 5:325-331.
- Lambers, H.; Stuart-Chapin III, F. y Pons, T. L. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag, New York. 320 p.
- Larson, R. A. 1994. Introducción a la floricultura. AGT Editor S. A. México, D. F., 551 p.
- Levitt, J. 1980. Responses of plant to enviromental stresses. Vol. 1 (2nded.) Academic Press, New York. 250 p.
- Leyman, B.; Van Dijck, P. y Thevelein, J. M. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in Arabidopsis thaliana. Trends Plant Science 6: 510-513.
- Leyva, M. S. G.; Lora, T.I.; Cárdenas, S. E.; Valdovinos, P. G. 2001. Pathogenesis of white rust *Puccinia horiana* Henn. On a Chrysanthemum [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Hennis. Susceptible variety]. Revista Mexicana de Fitopatología 19(2): 191-196.
- Li, H.; Chen, S.; Song, A.; Wang, H.; Fang, W.; Guan, Z.; Jiang, J. y Chen, F. 2014. RNA-seq derived identification of differential transcription in the chrysanthemum leaf following inoculation with *Alternaria tenuissima*. BMC Genomics 15(9): 1-14.
- Li, L.; Zhao, Y.; McCaig, B. C.; Wingerd, B. A.; Wang, J.; Whalon, M. E.; Pichersky, E. y Howe, G. A. 2004. The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. Plant cell 16: 126-143.
- Lins, R. D.; Pereira, C. S. y Hunenberger, P. H. 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. Proteins 55: 177-186.
- López, L.; Picardi, E.; Quagliariello, C. 2006. RNA editing has been lost in the mitochondrial cox3 and rps13 mRNAs in Asparagales. Biochimie 89 (2007): 159-162.

- Lorenzo, O.; Chico, J. M.; Sánchez-Serrano, J. y Solano, R. 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16:1938-50.
- Lorenzo, O.; Piqueras, R.; Sanchez-Serrano, J. J. y Solano R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* 15: 165-78.
- Mano, J. 2002. Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. En: *Oxidative stress in plants*. Ed: Inzé, D.; Van Montagu, M. Taylor & Francias. London. U, pp. 217-246.
- Mascorro-Gallardo, J. O.; Avonce, N. e Iturriaga, G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 11 (2): 193-202.
- Matthew, J. P., Primavesi, L. F., Jhurrea, D. y Zhang, Y. 2008. Trehalose Metabolism and Signaling. 2008. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-441.
- Mauch-Mani, B. y Slusarenko, A. J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 2003-2012.
- McDowell, J.M. y Dangl, J.L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *TIBS* 25: 79-82.
- Miranda, J.; Avonce, N.; Suárez, R.; Van Dijck, P.; e Iturriaga, G. 2007. A bifuncional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic Arabidopsis. *Plant* (226): 1411-1421.
- Mörschbacher, B.; Noll, U.; Gorrichon, L. y Reisener, H. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to wheat stem rust. *Plant Physiology* 93: 465-470.
- Mou, Z.; Fan, W. y Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 113: 935-944.

- Ndamukong, I.; Abdallat, A. A.; Thurow, C.; Fode, B.; Zander, M.; Weigl, R. y Gatz, C. 2007. SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J.* 50(1): 128-139.
- Nielsen, E. T., Orcutt, D. M. 1996. Physiology of plants under stress. En: Abiotic factors. John Wiley & Sons (eds.) IINC, New York. 480 p.
- Nurnberger T. y Scheel D., 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Science* 6: 372-379.
- Otahola, G. V.; Aray, M. y Antoima, Y. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. *Revista UDO Agrícola* 1(1):56-63.
- Paiva, C. L. A. y Panek, A. D. 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 293-314.
- Pandya, H. A., y Saxena, O. P. 2001. Preservation of the *Chrysanthemum sp.* by drying. *Acta Horticulture* 143: 367-370.
- Parry, M. L.; Rosenzweig, C.; Livermore, M. 2005. Climate change, global food supply and risk of hunger. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 2125-2136.
- Paul, M. J.; Primavesi, L. F.; Jhurreea, D. y Zhang, Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-441.
- Peer, M. S.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J. P.; Richmond, T.; Somerville, S. C. y Manners, J. M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS* 97(21): 11655-11660.
- Pieterse, C. M. y Van Loon, L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion Plant Biology* 7: 456-464.
- Reignault, P.; Coga, A.; Muchembled, J.; Lounes-Hadj, A. S.; Durand, R. y Sanchole, M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Physiology* 149: 519-529.
- Redemaker, W. y De Jong, J. 1987. Types of resistance to *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum*, *Acta Hort.* 197: 85-88.

- Richards, A. B.; Krakowka, S.; Dexter, L. B.; Schmid, H.; Wolterbeek, A. P. M.; Waalkens-Berendsen, D.; Shigoyuki, A. y Kumimoto, M. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and tolerance, and results of multiple safety studies. *Food. Chem. Toxicol.* 40: 871-898.
- Rio, D.C.; Ares, M. Jr.; Hannon, G. J. y Nielsen, T. W. 2010. Nondenaturing agarose gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harb Protoc* (this issue). Doi: 10.1101/pdb.prot5445.
- Roberts, D. A. y Boothroyd, C. W. 1984. *Fundamentals of plant pathology*, 2nd edition. W.H. Freeman and Company, New York. 432 p.
- Rodríguez, N. J. A.; Zavaleta, M. E.; Sánchez, G. P. y González, R. H. 2000. Efecto de la vermicomposta en la nutrición, rendimiento y pudrición radical y de la corona en gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus). *Fitopatología* 35(1): 66-77.
- Rojas-Vega, J. P. 2005. Roya blanca del crisantemo: *Puccinia horiana*. Instituto Colombiano Agropecuario, Boletín de Sanidad Vegetal 43: 1-20.
- Romero, M. A. 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. Universidad Autónoma Chapingo. Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Chapingo, México. pp. 75-94.
- Rout, G.R.; Mohapatra, A. y Mojan, S. 2006. Tissue culture pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotech. Adv.* 24: 531-560.
- Rozen, S. y Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (S. Krawetz, S. Misener, eds.). Humana Press, Totowa, NJ, U.S.A., pp. 365-386.
- Rudolph, A. S.; Chandrasekhar, E.; Gaber, B. P. y Nagumo, M. 1990. Molecular modeling of saccharide-lipid interactions. *Chem. Phys. Lipids*, 53: 243-26.
- Salinger, J. P. 1991. *Producción comercial de flores*. Ed, Acribia, S. A. Zaragoza, España, 324 p.
- Sambrook, J. E.; Fritsch, F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Press, CHS, NY. 2224 p.

- Sano, F.; Asakawa, A.; Inoue, Y. y Sakurai, M. 1999. A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cell to water stress. *Cryobiology* 39: 80-87.
- Schiraldi, C.; Di Lernia, I. y De Rosa, M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trend Biotechnol.* 20: 420-425.
- Schluepmann, H.; Pellny, T.; van Dijken, A.; Smeekens, S. y Paul, M. 2003. Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11: 6849-6854.
- Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defense. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 459-464.
- Sharma, V.; Xu, M.; Vail, J.; Campbell, R. 1998. Comparative analysis of multiple techniques for semi-quantitation of RT-PCR amplicons. *Biotechnology Techniques* 12: 521-524.
- Sharman, R.; Singh, M.; Sharma, A. 2002. Polymerase Chain Reaction: An Emerging tool for Research in Pharmacology. *Indian Journal of Pharmacology* 34: 229-239.
- Shinoyama, H. 2005. Development of breeding techniques and production of new breeding materials for Chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflorum* (Ratam.) Kitamura). *Special Bulletin of the Fukui Agricultural Experiment Station*, 14: 1-9.
- SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013. Cierre de la producción agrícola por cultivo. (Consultada en octubre de 2014) http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350.
- Singer, M. A. y Lindquist S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell* 1(5): 639–648.
- Smith, I. M.; Dunez, J.; Lelliot, R. A.; Phillips, D. H. y Archer, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa. España. 675 p.

- Snyder, W. C. y Hanssen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal Botanical. 27: 64-67.
- Staswick, P. E. y Tiryaki, I. 2004. The Oxylipin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 2117-2127.
- Taíz, L. y Zeiger, E. 2006. Plant physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California, USA, 559 p.
- Talón, M.; Tad, F. R. y Zeevart, J. A. D. 1991. Cellular changes induces by exogenous and endogenous gibberellins in the shoot tips of the long-day plant *silene armeria*. Plant 185: 487-493.
- Tambussi, E. A. 2004. Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona.
- Thomma, B. P. H. J.; Nelissen, I.; Eggermont, K. y Broekaert, W. F. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. Plant Journal 19: 163-171.
- Tlapal, B. B. y Mendoza, Z. C. 2002. Enfermedades de origen fungoso en ornamentales. In: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados, México, pp 97-116.
- Toumi, I.; Moschou, P. N.; Paschalidis, K. A.; Bouamama, B.; Ben Salem-Fnayou, A.; Ghorbel, A. W.; Mliki, A. y Roubelakis-Angelakis, K. A. 2010. Absciscic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. Journal of Plant Physiology 167: 519-525.
- Turner, N. C. 1986. Adaptation to water stress deficit. A changing perspective. Journal Plant Physiology 13: 175-190.

- Ulacio, D.; Salas, J.; Querales, P. y Sanabria, M. E. 2002. Micobiota del suelo de zonas productoras de papa del estado de Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14(1): 11-16.
- Valle-Sandoval. M.R. 2008. Obtencion de Plantas Transgénicas de Crisantemo (*Dendrathera X grandiflorum* Kitam) cv. 'Indianapolis' que Acumulan Trehalosa. Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 137 p.
- Van Loon, L. C. y Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.
- Van Loon, L. C. y Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Van Loon, L. C.; Rep, M. y Pietersen, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol* 44: 135-162.
- Vences-Contreras, C. y Vázquez-García, M. 2008. Inoculación in vitro de la roya blanca (*Puccinia horiana* Hennings) en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Agronomía Mesoamericana* 19(1): 81-85.
- Vlot, A. C.; Dempsey, M. A. y Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Vogel, G.; Aeschbacher, R. A.; Müller, J.; Boller, T. y Wiemken, A. 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.* 13: 673–683.
- Vogel, G.; Fiehn, O.; Bressel, L. J. R. D.; Boller, T.; Wiemken, A.; Aeschbacher, R. A. y Wingler, A. 2001. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of

- trehalose-6-phosphate synthase homologues. J. Exp. Bot. 52: 1817-1826.
- Whenham, R. J.; Fraser, R. S. S.; Brown, L. P. y Payne, J. A. 1986. Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. Planta 168: 592-598.
- Whipps, J. M. 1993. A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potencial for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. Ann. Appl. Biol. 122: 173-187.
- Wildermuth, M. C.; Dewdney, J.; Wu, G. y Ausubel, F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature 414: 562-565.
- Xu, Y.; Chang, P. F. L.; Liu, D.; Narasimhan, M. L.; Raghothama, K. G.; Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. 1994. Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. Plant Cell 6: 1077-1085.
- Yamaguchi, T. 1987. Mutation breeding of ornamental plants. Bulletin of the Institute of Radiation Breeding, 7: 49-67.
- Yu, L.; Xi, N.; June, V. y Parthasarathy, M.V. 1998. Molecular cloning and mRNA localization of tomato pollen profiling. Plant Molecular Biology 36, 699-707.
- Zhang, W.M.; Zhang, Y.; Zhang, L.H.; Wang, S.G.; Zhu, T.Y.; Lin, D.; Ma, G.Z. 2005. Nucleotide sequence and mRNA expression analysis of *b*-actin gene in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* Fish. Physiology and Biochemistry 31, 373-383
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acid Research, 31: 3406-3415

VII. ANEXO

Aislamiento de ARN por el método del TRIZOL®.

1. Se molió en un mortero con pistilo 100 mg de hojas de crisantemo, agregando nitrógeno líquido de forma constante hasta que se obtuvo un polvo fino y sin dejar que se enfriará se colocó con una espátula en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Para la homogenización del tejido vegetal, se agregó 1mL de Trizol por 50-100 mg de tejido y se agitó en vortex por 15 seg, luego se dejaron incubar las muestras homogenizadas por 5 min a 15-30 °C, paso que permite la disociación completa del complejo de nucleoproteínas.
3. Se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de reactivo Trizol usado para la homogenización inicial, se agitó vigorosamente de forma manual por 15 seg y después se incubaron las muestras por 3 min a una temperatura de 15-30°C, las muestras se centrifugaron a no más de 14,000 rpm por 10 min a 2-8 °C.
4. Seguido de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior roja (fase fenol-cloroformo), una interfase y una fase superior sin color (fase acuosa). Cabe mencionar, que el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y el volumen de la fase acuosa es cerca del 60 % de volumen del Trizol usado para la homogenización.
5. Para la precipitación del ARN se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 0.5 mL de alcohol isopropílico por mililitro de Trizol utilizado originalmente. Las muestras se incuban por 10 min 15-30 °C y se centrifugó a no más de 14,000 rpm por 10 min a una temperatura de 2-8°C.
6. Finalmente, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente sin que se deshidratara por completo y después se resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

