

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

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

7
2997
C.2

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

Obtención de plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) modificadas en su capacidad de biosíntesis de trehalosa y su resistencia a *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901)

TESIS

QUE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

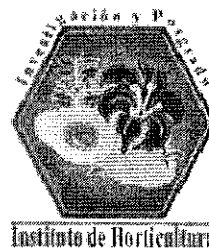
PRESENTA:

MELCHOR LÓPEZ CARLOMAGNO

Chapingo, México, Noviembre de 2007



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



**OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*
L.) MODIFICADAS EN SU CAPACIDAD DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA Y
SU RESISTENCIA A *Pectobacterium carotovorum* (JONES 1901)**

Tesis realizada por el **Ing. Carlomagno Melchor López** bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

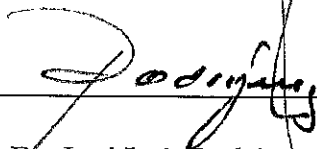
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



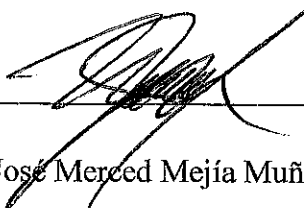
Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



M.C. José Merced Mejía Muñoz

Dedico este trabajo a mis hijos:

Javier Axayacatl

Carlo Alexander

y a mi querida esposa:

Yolidabeth Hernández Mayo

mis motivos y razones diarias de seguir adelante en todo lo que me propongo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que hicieron posible este trabajo; en particular al Dr. José Oscar Mascorro por su valiosa dirección de este trabajo de investigación y por ser en todo momento un apoyo incondicional; de la misma manera agradezco al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su valiosa colaboración y atinados comentarios en la realización de esta tesis. Agradezco especialmente al M.C. José Merced Mejía Muñoz tanto por su apoyo en esta tesis como por haber sido en todo momento más que un profesor un gran amigo. Al M.C. Alejandro Manzo siempre le voy a agradecer su confianza en mi persona, lo que muchas veces me ayudó a seguir adelante.

Una especial mención se merecen mis amigos y compañeros de la Maestría: Jorge Sevilla, Tepale, Jacob, Victor, Marco, Norman; a mis queridas amigas Edith y Nadia; así como a Manuel y Román del Doctorado en Horticultura; a todos ellos les agradezco en haber compartido grandes y muy importantes momentos durante mis estudios de Maestría.

A Javier le agradezco su invaluable apoyo en los últimos y estresantes momentos de realización de este trabajo y a Antelmo le agradezco el haberme permitido apoyarlo en su proceso de titulación y así darme la oportunidad de compartir el presidium con dos de mis grandes profesores.

A Zsolt Maurer y a Hugo de Alba, les agradezco el momento de confianza que tuvieron cuando tomaron la dedición de mi contratación y por ayudarme a ver que mi preparación tuvo resultados muy positivos.

Por último agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento recibido para realizar mis estudios de postgrado.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis es Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia es originario del Estado de Veracruz. Nació el 02 de Abril de 1977. Dentro de sus actividades profesionales se encuentran: Jefe de la Unidad de Biotecnología de Diciembre 1999 a Diciembre de 2003 en el **Centro de Desarrollo Tecnológico “Tezoyuca” BANCO DE MEXICO-FIRA**, ubicado en el municipio de Emiliano Zapata, en el estado de Morelos. Responsable de laboratorio e invernaderos de Enero de 2004 a Octubre de 2004 en **Biogenética Mexicana S.A de C.V.** Empresa de carácter privado, cuya actividad principal es la producción de plantas ornamentales mediante técnicas biotecnológicas, con fines de exportación; ubicada en Parque Florícola Jaripeo, Ciudad Hidalgo Michoacán. Profesor por asignatura Del 9 de Enero al 28 de Abril de 2006, impartiendo la materia de Biotecnología Vegetal, para la carrera de Agrobiotecnología y asumiendo temporalmente el cargo de responsable del Laboratorio de Biotecnología, en la **Universidad Tecnológica Izúcar de Matamoros**, en el estado de Puebla.

Finalmente y gracias a la formación recibida en la Universidad Autónoma Chapingo actualmente se desempeña como Supervisor del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, en el Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola Sabritas (CDAS), perteneciente a la empresa **Pepsico Internacional, Región Sabritas** que abarca México y Centroamérica.

OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) MODIFICADAS EN SU CAPACIDAD DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA Y SU RESISTENCIA A *Pectobacterium carotovorum* (JONES 1901)

GENERATION OF TRANSGENIC TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) MODIFIED IN ITS CAPACITY TO BIOSYNTHESIZE TREHALOSE AND IN ITS RESISTANCE TO *Pectobacterium carotovorum* (JONES 1901)

Carlomagno Melchor López¹ José Oscar Mascorro Gallardo²

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue la de elucidar el papel del metabolismo de la trehalosa en la interacción planta-patógeno con la generación de plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) mediante agroinfección, que sobreexpresaron genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*: a) se generaron plantas con el gen *ScATH1* que codifica para la trehalasa ácida que degrada la trehalosa en dos moléculas de glucosa y b) plantas que acumulan trehalosa con la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* que codifica la biosíntesis de trehalosa. Las plantas transgénicas (líneas) *ScATH1* y *ScTPS1-TPS2* fueron evaluadas morfológicamente y en su capacidad para crecer *in vitro* con trehalosa como fuente de carbono, y principalmente evaluadas frente al ataque de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901) causante de marchitez. La sobreexpresión de la trehalasa (*ScATH1*), no ocasionó cambios morfológicos aunque las plantas fueron más susceptibles a *P. carotovorum*, mientras que la sobreexpresión de la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* redujo la invasión y la severidad del daño causado por la bacteria *P. carotovorum*, adicionalmente estas plantas (líneas) mostraron tolerancia a estrés hídrico así como acentuados cambios en la morfología de planta y una aceleración de la floración. Estos resultados sugieren que el metabolismo de la trehalosa afecta la interacción planta-patógeno.

Palabras clave: Trehalosa, agroinfección, *ScATH1*, *ScTPS1-TPS2*, *Pectobacterium carotovorum*

ABSTRACT

The aim of this work was to elucidate the role of trehalose metabolism in plant-pathogen interaction through the generation of transgenic tobacco plants by agroinfection. The resulting transgenic plants over-expressed two yeast genes: a) *ScATH1*, which codifies trehalase acid and b) *ScTPS1-TPS2*, which codify biosynthesis of trehalose. Both kind of transgenic lines were evaluated in their morphology and their capacity for regeneration *in vitro* on trehalose as carbon source. The transgenic lines were also characterized in their response against the phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901), which causes wilting. The over-expression of *ScATH1* did not cause morphological changes although the plants were more susceptible to the pathogen, while the over expression of *ScTPS1-TPS2* reduced the invasion of the pathogen and the severity of the damage. However, the plants exhibited some changes in their morphology and flowering time decreased. The data also showed that the lines were more tolerant to drought. In conclusion, the data of this work suggests that trehalose metabolism in plants is involved in plant-pathogen interaction.

Key words: Trehalose, agroinfection, *ScATH1*, *ScTPS1-TPS2*, *Pectobacterium carotovorum*

¹ Tesista

² Director

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares.....	3
HIPÓTESIS.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Transformación genética vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
2.2. Azúcares en las plantas.....	7
2.3. Trehalosa.....	10
2.4. Trehalosa como un compuesto de reserva.....	12
2.5. Funciones de trehalosa en levaduras.....	13
2.6. Hidrólisis de la Trehalosa.....	14
2.7. Funciones de trehalosa en plantas.....	16
2.8. Presencia de trehalosa frente al déficit hídrico.....	19
2.9. Presencia de trehalosa y su relación con la floración.....	22
2.10. Presencia de trehalosa en la interacción de <i>A. thaliana</i> con patógenos..	23
2.11. Trehalasa.....	27
2.12. La bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i>	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Ubicación del experimento.....	31
3.2. Plásmidos.....	31
3.3. Construcciones.....	31
3.4. Cepas empleadas.....	33
3.5. Medios de cultivo y agentes selectivos.....	33
3.6. Material vegetal.....	35
3.7. Condiciones de cultivo.....	35
3.8. Transformación genética de tabaco.....	35
3.9. Material para la extracción de ADN.....	37
3.10. Metodología de extracción ADN.....	38
3.11. Materiales para cuantificar ADN extraído.....	39
3.12. Metodología para cuantificar ADN extraído.....	40
3.13. Materiales para la reacción de PCR.....	41
3.14. Metodología para realizar el análisis de PCR.....	41
3.15. Preparación de geles.....	43
3.16. Prueba de tinción con lugol.....	44

3.17. Extracción de trehalosa.....	45
3.18. Cuantificación de trehalosa.....	46
3.19. Prueba de regeneración <i>in vitro</i>	48
3.20. Pruebas de patogenicidad <i>ex vitro</i> en plantas jóvenes de tabaco genéticamente modificadas.....	49
3.21. Pruebas de patogenicidad <i>ex vitro</i> de plantas adultas de tabaco.....	50
3.22. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	51
3.23. Cuantificación de la infección bacteriana.....	52
3.24. Prueba de germinación de semillas <i>in vitro</i>	54
3.25. Prueba de estrés hídrico.....	55
3.26. Cuantificación de la pérdida de humedad.....	55
3.27. Análisis estadístico.....	56
4. RESULTADOS.....	57
4.1 Transformación con pGREEN0029.1::35S::ScATH1::NOS.....	57
4.1.1. Análisis molecular por PCR.....	58
4.1.2. Prueba de tinción con lugol.....	59
4.1.3. Cuantificación de trehalosa.....	62
4.1.4. Caracterización morfológica de los materiales transgénicos con ScATH1 <i>in vitro</i>	63
4.1.4.1. Altura de planta.....	64
4.1.4.2. Número de hojas.....	66
4.1.4.3. Número de raíces.....	67
4.1.5. Prueba de regeneración <i>in vitro</i> de líneas de tabaco transgénicas ScATH1.....	68
4.1.6. Crecimiento de las líneas transgénicas con ScATH1. en plantas aclimatadas.....	70
4.1.7. Pruebas de patogenicidad <i>ex vitro</i> de plantas transgénicas adultas de tabaco portadoras del gen ScATH1.....	71
4.1.8. Cuantificación de la infección bacteriana.....	74
4.1.9. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	75
4.1.10. Cuantificación de la infección bacteriana.....	76
4.2. Transformación con pBIN19::35S::ScTPSI-TPS2::NOS.....	79
4.2.1. Análisis molecular por PCR.....	79
4.2.2. Cuantificación de trehalosa.....	80
4.2.3. Caracterización morfológica de los materiales transgénicos con el gen bifuncional ScTPSI-TPS2.....	83
4.2.3.1. Altura de planta.....	83
4.2.3.2. Número de hojas.....	85
4.2.3.3. Número de raíces.....	86
4.2.4. Floración prematura <i>in vitro</i>	87
4.2.5. Floración prematura en plantas aclimatadas.....	88
4.2.6. Prueba de germinación de semillas de las líneas portadoras del gen	

bifuncional <i>ScTPS1-TPS2</i>	90
4.2.7. Prueba de regeneración <i>in vitro</i> de las líneas de tabaco transgénicas con <i>ScTPS1-TPS2</i>	92
4.2.8. Crecimiento de las líneas transgénicas con <i>TPS1-TPS2</i> en plantas aclimatadas.....	93
4.2.9. Pruebas de patogenicidad <i>ex vitro</i> de plantas jóvenes de tabaco.....	95
4.2.10. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	98
4.2.11. Cuantificación de la infección bacteriana.....	99
4.2.12. Pruebas de tolerancia a estrés hídrico.....	100
4.2.13. Cuantificación de la pérdida de humedad.....	103
5. DISCUSIÓN	105
5.1. Modificaciones fenotípicas de las plantas transgénicas.....	105
5.1.1. Variación en los niveles de trehalosa en las plantas genéticamente modificadas.....	105
5.1.2. Cambios morfológicos de las líneas transgénicas.....	109
5.1.3 Regeneración de las plantas transgénicas sobre sacarosa y trehalosa como fuente de carbono.....	113
5.2 Alteraciones en el interacción planta- patógeno de las plantas transgénicas.....	115
6. CONCLUSIONES	128
7. BIBLIOGRAFÍA	131
8. ANEXOS	144

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Cóctel de reacción en tubos eppendorf de 0.2 ml.....	42
Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la prueba de tinción con lugol.....	45
Cuadro 3. Tratamientos evaluados en la prueba de regeneración de las líneas transgénicas con <i>ScATH1</i> y <i>ScTPS1-TPS2</i>	49
Cuadro 4. Líneas utilizadas para cuantificar los niveles de trehalosa en tejido foliar. Se indican las líneas transformadas (NTre) y el control sin transformar (WT).	62
Cuadro 5. Contenido inicial de trehalosa de las líneas avaluadas en la prueba de patogenicidad de plantas adultas de tabaco transgénicas con 35S:: <i>ScATH1</i>	72
Cuadro 6. Líneas utilizadas para cuantificar los niveles de trehalosa en tejido foliar.....	81
Cuadro 1A. Análisis de varianza para altura de las plantas <i>in vitro</i> , número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas a los 30 días de desarrollo en plantas transgénicas con <i>ScATH1</i> y WT (sin transformar).....	144
Cuadro 2A. Prueba de comparación de medias de Tukey para altura de las plantas <i>in vitro</i> , número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas durante 30 días en plantas transgénicas con <i>ScATH1</i> y WT (sin transformar).....	144
Cuadro 3A. Análisis de varianza para la variable número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos <i>in vitro</i>	145
Cuadro 4A. Prueba de comparación de medias de Tukey para número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos <i>in vitro</i>	145

Cuadro 5A. Análisis de varianza para altura de las plantas <i>in Vitro</i> , número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas a los 30 días de desarrollo en plantas transgénicas con <i>ScTPS1-TPS2</i> y WT (sin transformar).....	146
Cuadro 6A. Prueba de comparación de medias de Tukey para altura de las plantas <i>in vitro</i> , número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas durante 30 días en plantas transgénicas con <i>ScTPS1-TPS2</i> y WT (sin transformar).....	146
Cuadro 7A. Análisis de varianza para la variable número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos <i>in vitro</i>	147
Cuadro 8A. Prueba de comparación de medias de Tukey para número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos <i>in vitro</i>	147
Cuadro 9A. Composición del buffer de extracción.....	148
Cuadro 10A. Composición del buffer TE.....	148
Cuadro 11A. ARNasa.....	148
Cuadro 12A. Composición del amortiguador TAE 50X.....	148
Cuadro 13A. Composición del buffer de carga 6X.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura de la trehalosa.....	11
Figura 2. Mapa de la construcción pBIN19::35S::ScTPS1-TPS2::NOS.....	32
Figura 3. Mapa de la construcción pGreen0029.1::35S::ScATH1::NOS.....	33
Figura 4. Sistema de purificación de trehalosa a partir de tejido vegetal fresco.	46
Figura 5. Curva patrón de trehalosa.....	48
Figura 6. (a) Cultivo bacteriano de <i>Pectobacterium carotovorum</i> . (b) Adición de 10 µl de la solución bacteriana a la herida provocada de la planta adulta de tabaco. (c) Cubierta plástica de la planta inoculada para favorecer la invasión de la bacteria en el tejido vegetal.....	51
Figura 7. Microplántulas de tabaco que presentan susceptibilidad a kanamicina.....	57
Figura 8. Microplántulas de tabaco que presentan resistencia a kanamicina (posible transformante).....	57
Figura 9. Fragmento amplificado (NPTII), donde se muestra la comparación de las líneas seleccionadas con el testigo positivo (T+) de las 16 líneas de tabaco sometidas a agroinfección.....	58
Figura 10. Coloración obtenida por reacción con la solución de lugol de los callos y brotes neoformados a partir de discos de hojas de plantas transgénicas de tabaco con <i>ScATH1</i> y sin transformar; regenerados en cada uno de los tratamientos con las fuentes de carbono (T1=10 mM, T2=50 mM, T3=100 mM, T4=200 mM, T5=300 mM de trehalosa) y dos testigos el primero sin fuente de carbono en el medio de cultivo (T0) y el segundo con sacarosa como fuente de carbono (87.6 mM). Las letras (a, b, c, d, e, f, g) representan a los callos sin transformar, mientras que las letras seguidas por un numero (a1, b1, c1,d1, e1, f1, g1) representan callos formados a partir de una línea transgénica <i>Sc ATH1</i> ...	61
Figura 11. Concentración de trehalosa en nanogramos por miligramo de peso fresco de las líneas de tabaco obtenidas con el gen <i>ScATH1</i>	63
Figura 12. Altura de las plantas transgénicas con <i>ScATH1</i> (NTre) y un testigo	

(WT), desarrolladas <i>in vitro</i> a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.....	64
Figura 13. Número de hojas de las plantas transgénicas con <i>ScATH1</i> (NTre) y un testigo (WT), desarrolladas <i>in vitro</i> a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.....	66
Figura 14. Número de raíces de las plantas transgénicas con <i>ScATH1</i> (NTre) y un testigo (WT), desarrolladas <i>in vitro</i> a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.....	67
Figura 15. Número de brotes neoformados a partir de discos foliares de plantas de tabaco transgénicas con <i>ScATH1</i> (NTre) y un testigo sin transformar (WT), en medio de cultivo con trehalosa y sacarosa como fuentes de carbono.....	69
Figura 16. Altura de las plantas transgénicas <i>ScATH1</i> , y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.....	70
Figura 17. Vista panorámica de las líneas transgénicas de tabaco portadoras del gen <i>ScATH1</i> (NTre) y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.....	71
Figura 18. Plantas empleadas en las prueba de patogenicidad frente a <i>Pectobacterium carotovorum</i> con tres meses de desarrollo posterior a su aclimatación <i>ex vitro</i> . (a) Línea WT (Testigo), (b) Línea 2Tre, (c) Línea 4Tre, (d) Línea 11Tre, (e) Línea 12Tre.....	72
Figura 19. Plantas de tabaco inoculadas con <i>Pectobacterium carotovorum</i> 28 días antes. (a) Línea WT (Testigo), (b) Línea 2Tre, (c) Línea 4Tre, (d) Línea 11Tre, (e) Línea 12Tre.....	73
Figura 20. Número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) en: (a) Línea 2Tre, (b) Línea 4Tre, (c) Línea 11Tre, (d) a las 32 horas de incubación.....	75
Figura 21. Número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a diferentes diluciones (a) Línea 3Tre, (b) Línea 5Tre, (c) Línea 4Tre, (d) Línea 9Tre, (e) Línea WTJ (testigo), (f) Línea WT2A (testigo) a las 32 horas de incubación desarrolladas a partir de tejidos <i>in vitro</i>	77

Figura 22. Número de colonias de bacterias de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en plantas de tabaco <i>in vitro</i> a las 24 horas de infección en una dilución de 10^{-7}	78
Figura 23. Fragmento amplificado (NPTII), se muestra la comparación de las líneas seleccionadas con el testigo positivo (T+) de las 16 líneas de tabaco sometidas a agroinfección con la construcción pBIN19::35S::ScTPS1-TPS2::NOS.....	80
Figura 24. (a) (b). Línea 7BI de tabaco que sobrexpresas la producción de trehalosa con un fenotipo aberrante.....	82
Figura 25. Concentración de trehalosa en nanogramos por miligramo de peso fresco de las líneas obtenidas con la construcción bifuncional <i>ScTPS1-TPS2</i>	82
Figura 26. Líneas transgénicas con <i>ScTPS1-TPS2</i> y un testigo (WT) desarrolladas <i>in vitro</i> sin sacarosa como fuente de carbono en el medio de cultivo a los 56 días de desarrollo.....	84
Figura 27. Altura de las plantas transgénicas con <i>ScTPS1-TPS2</i> (NBI) y un testigo (WT), desarrolladas <i>in vitro</i> a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.....	84
Figura 28. Número de hojas de las plantas transgénicas con <i>ScTPS1-TPS2</i> (NBI) y un testigo (WT), desarrolladas <i>in vitro</i> a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.....	86
Figura 29. Número de raíces de las plantas transgénicas con <i>TPS1-TPS2</i> y un testigo (WT), desarrolladas <i>in vitro</i> a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.....	87
Figura 30. (a) Formación prematura de botones florales en microplántulas de tabaco de la línea 10BI a los 30 días de desarrollo. (b) Estructuras florales completas en botones florales prematuros <i>in vitro</i> a los 30 días de desarrollo.....	88
Figura 31. (a), (b) Desarrollo del ápice reproductivo en la línea 10BI transgénica con <i>TPS1-TPS2</i> a los 30 días de desarrollo como plántula.....	89
Figura 32. (a) Desarrollo floral en la línea 13BI transgénica con <i>TPS1-TPS2</i> a los 30 días de desarrollo como plántula. (b) acercamiento a la flor prematura obtenida después de 30 días de desarrollo. c) estructuras florales completas en flores prematuras de la línea 13BI transgénica con <i>TPS1-TPS2</i>	90

Figura 33. (a) Plántulas germinadas <i>in vitro</i> de la línea transgénica de tabaco 13BI. (b) Plántulas germinadas <i>in vitro</i> de la línea transgénica de tabaco 14BI; ambas portadoras del gen bifuncional <i>ScTPSI-TPS2</i> a los 5 días de incubación.	91
Figura 34. Número de brotes neoformados a partir de discos foliares de plantas de tabaco transgénicas con <i>ScTPSI-TPS2</i> y un testigo sin transformar (WT), en medio de cultivo con trehalosa y sacarosa como fuentes de carbono.....	93
Figura 35. Altura de las plantas transgénicas <i>ScTPSI-TPS2</i> , y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.....	94
Figura 36. Vista panorámica de las líneas transgénicas de tabaco portadoras del gen <i>ScTPSI-TPS2</i> (1BI, 2BI, 10BI, 14BI) y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.....	95
Figura 37. (a) Testigo sin transformar (WT), (b) Línea 2BI, (c) Línea 9BI, (d) Línea 10BI transgénicas con <i>ScTPSI-TPS2</i> , (e) Línea 4Tre con <i>ScATH1</i> antes de ser inoculadas con la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i>	96
Figura 38. (a) Línea 9BI, (b) Línea 10BI, (c) Línea 2BI transgénicas con <i>ScTPSI-TPS2</i> a los 7 días posteriores a la inoculación con la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> . (d) Línea 4Tre con <i>ScATH1</i> . (e), (f) Fenómeno de cicatrización en el área lesionada donde se inoculó la bacteria en la línea 10BI.....	97
Figura 39. Número de colonias de bacterias de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en plantas de tabaco a las 24 horas de infección en una dilución de 10^{-7}	99
Figura 40. Número de colonias de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> a diferentes diluciones (a) Línea 9BI, (b) Línea 10BI, (c) Línea 1BI, (d) Línea 2BI, (e) Línea WTJ, (f) Línea WT2A a las 32 horas de incubación.....	100
Figura 41. (a) Tres líneas transgénicas con el gen bifuncional <i>Sc TPSI-TPS2</i> y un testigo sin transformar a los 7 días sin riego. (b) a los 14 días, (c) a los 21 días, (d) a los 28 días sin riego. (e) Tres líneas transgénicas con el gen bifuncional <i>Sc TPSI-TPS2</i> y un testigo sin transformar una vez reanudado el riego. (f) Dos líneas transgénicas con el gen bifuncional <i>Sc TPSI-TPS2</i> y un testigo sin transformar una vez reanudado el riego.....	102
Figura 42. Curva de deshidratación de lámina foliar de cuatro líneas transgénicas con <i>Sc TPSI-TPS2</i> y un testigo (WT), a lo largo de cinco horas con flujo de aire constante.....	103
Figura 43. Modelo propuesto para explicar el efecto de la alteración en la	

biosíntesis de trehalosa mediante la inserción del gen <i>ScATH1</i> en plantas de tabaco.....	108
Figura 44. Modelo propuesto para explicar el efecto de la alteración en la biosíntesis de trehalosa mediante la inserción del gen <i>ScATH1</i> en plantas de tabaco sobre la respuesta al ataque de la bacteria fitopatógena <i>P. carotovorum</i>	121
Figura 45. Modelo propuesto para explicar el efecto de la alteración en la biosíntesis de trehalosa mediante la inserción del gen bifuncional <i>Sc TPS1-TPS2</i> en plantas de tabaco sobre la respuesta al ataque de la bacteria fitopatógena <i>P. carotovorum</i>	126

1. INTRODUCCIÓN

Los problemas fitosanitarios, así como la prevención y control de los patógenos que los causan, se han convertido en actividades de primera importancia en los procesos productivos que se llevan a cabo en el ámbito agrícola.

El tabaco *Nicotiana tabacum* L. es una planta que ha sido ampliamente utilizada experimentalmente como modelo para la transformación genética y cultivo *in vitro* debido principalmente a su capacidad de ser fácilmente transformable y tener una morfología y fisiología más semejante a la de cultivos agronómicos como el jitomate (*Lycopersicum esculentum* L.) y otras dicotiledóneas. Muchas proteínas recombinantes que se quieren expresar en plantas superiores, así como proteínas recombinantes de interés farmacológico (para obtener las llamadas plantas transgénicas de tercera generación, utilizadas como fábricas de moléculas) son a menudo ensayadas en tabaco.

La factibilidad de utilizar tabaco como un modelo, nos permitió llevar a cabo la evaluación de la sobreexpresión de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* *ATH1* (que codifica para la trehalasa ácida encargada de la hidrólisis de trehalosa) y *ScTPS1-TPS2* (que codifica para biosíntesis de trehalosa); esto con la premisa de una serie de reportes científicos donde se menciona que la presencia de trehalosa (disacárido formado por dos glucosas unidas por sus carbonos anoméricos respectivos) realizados en *Arabidopsis thaliana* sugieren que el metabolismo de la trehalosa presente tanto en organismos

patógenos como en el hospedante juega un papel importante en la relación patogénica en una forma no elucidada a la fecha.

La biotecnología, y más específicamente la manipulación genética a través de *Agrobacterium tumefaciens* ofrecen una alternativa de muy alto potencial como complemento a los sistemas tradicionales de mejoramiento genético; ya que para esta investigación representó la vía para transferir los genes *ScATH1* y *ScTPS1-TPS2* responsables de la hidrólisis y síntesis de trehalosa respectivamente; a las plantas de tabaco 'Xanthi'; hecho que a su vez permitió llevar a cabo la caracterización de las plantas transgénicas obtenidas y poder determinar el grado de tolerancia y/o susceptibilidad que presentaban con respecto a la infección de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*, causante de un cuadro de marchitez foliar en tabaco.

Además de las diferentes respuestas de resistencia y/susceptibilidad de las plantas transgénicas, los resultados obtenidos con las líneas transgénicas de tabaco con *ScTPS1-TPS2* (que acumulan más trehalosa) permitieron llevar a cabo una caracterización de su tolerancia al estrés hídrico; teniendo como referente inmediato resultados publicados donde se hace mención a que la trehalosa parece estar involucrada en la regulación del metabolismo del carbono y en la fotosíntesis, y que su acumulación está asociada a una mayor tolerancia al estrés abiótico como la sequía.

Los siguientes objetivos fueron la base para desarrollar la presente investigación:

Objetivo general

Obtener plantas transgénicas de tabaco con capacidad de hidrolizar o biosintetizar trehalosa; para determinar su resistencia o susceptibilidad a la bacteria *Pectobacterium carotovorum*.

Objetivos particulares

1. Realizar transformación genética de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) mediante agroinfección que sobre expresen el gen *ScATH1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Obtener líneas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) mediante agroinfección que sobre expresen el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Realizar una caracterización molecular y morfológica de los materiales transgénicos obtenidos de tabaco transformados con genes que controlan la hidrólisis extracelular (*ScATH1*) o la biosíntesis intracelular de trehalosa (*ScTPS1-TPS2*).

3. Determinar la resistencia a patógenos de las plantas transgénicas obtenidas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L) ante la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.
4. Determinar la capacidad de tolerar sequía de las plantas transformadas con *ScTPS1-TPS2* al modificar el contenido de trehalosa en sus tejidos vegetales.

Para el desarrollo de esta investigación se estableció la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La alteración en el contenido endógeno de trehalosa de plantas de tabaco transformadas con genes que controlan la hidrólisis o biosíntesis de este azúcar, mostrarán fenotipos diferentes frente a las plantas no transformadas.

El metabolismo de la trehalosa presente tanto en microorganismos patógenos como en el hospedante, es un elemento importante en la relación patogénica, postulándose que la acumulación endógena de trehalosa en plantas transformadas podría conferir mayor tolerancia a patógenos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*

El uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la ingeniería genética de plantas, así como en la investigación básica. Para finales de los noventa se hablaba de que el 80 % de las plantas transgénicas obtenidas habían sido producto del uso de esta bacteria como herramienta en el proceso de introducción de genes foráneos (Wang y Fang, 1998).

Inicialmente se creía que solo las plantas dicotiledóneas, gimnospermas y unas cuantas especies monocotiledóneas podían ser transformadas por estas bacterias. Pero nuevos descubrimientos hicieron que se cambiara esta concepción demostrando que especies monocotiledóneas y hongos pueden ahora ser transformados (Chan, *et al.*, 1993; Bundock *et al.*, 1995).

El éxito del proceso de transformación genética mediante *A. tumefaciens* radica en la capacidad de infectar un gran número de plantas después de presentar heridas. El responsable de la formación de agallas o tumores es el plásmido Ti; lo anterior ha sido estudiado y actualmente se entiende que el plásmido Ti de la bacteria tiene la capacidad de producir el ADN-T el cual posteriormente se introduce e integra al genoma del organismo vegetal, este principio se ha aprovechado para introducir uno o varios genes a las plantas.

El proceso de transformación mediante *A. tumefaciens* se lleva a cabo en 7 pasos, enumerados por Sheng y Cotovsky (1996), mismos que se enuncian a continuación:

1. Reconocimiento de las células vegetales por la bacteria.
2. Reconocimiento de las señales moleculares de la planta por el sistema sensor/transductor de la bacteria VirA/VirG,
3. Activación de los genes bacterianos *vir*,
4. Producción de la hebra transferible T,
5. Formación del complejo T para transportarlo al interior de la célula vegetal,
6. Importe nuclear del complejo T,
7. Integración del ADN-T.

La versatilidad de *A. tumefaciens* ha permitido reportar la transformación genética de una gran cantidad de especies vegetales, solo por mencionar algunas especies como: crisantemo, rosa, anturio (Chen *et al.*, 1996), frutales como papaya (Cheng *et al.*, 1996) manzana (Norelli *et al.*, 1996), cítricos (Peña *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 1997; Cervera *et al.*, 1998), aguacate (Cruz-Hernández *et al.*, 1998), y cultivos extensivos como soya (Meurer *et al.*, 1998; Trick *et al.*, 1998), melón (Nishibayashi *et al.*, 1996) crucíferas (Metz *et al.*, 1995), jitomate, etc. se han logrado excelentes resultados al introducir los genes foráneos por esta vía. Sin embargo, cuando el proceso de transformación genética parte de una hipótesis a probar es conveniente contar con modelos que permitan llevar a cabo estudios suficientes para poder extrapolar los resultados de la transformación en plantas cuyo proceso de transformación pueda resultar más complejo, ante esto la plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* han sido de suma importancia

al convertirse en excelentes sistemas fáciles de transformar, y por ende de analizar. (Gómez *et al.*, 2004).

2.2. Azúcares en las plantas

De acuerdo con Rolland *et al.* (2002), los azúcares en las plantas cumplen una importante función tipo hormonal como mensajeros primarios en la transducción de señales; esto a la par de su papel esencial como sustratos en el metabolismo del carbono y de la energía, así como en la biosíntesis de polímeros.

Los azúcares pueden también actuar como morfógenos, dando información posicional a la maquinaria del ciclo celular y proporcionando diferentes programas de desarrollo. Además se encuentra una actividad señalizadora de los azúcares participando en el control del crecimiento y del desarrollo durante todo el ciclo de vida de la planta, un ejemplo claro se encuentra durante la germinación y el desarrollo temprano donde los azúcares controlan la movilización de los nutrimentos, el alargamiento del hipocótilo, la expansión y coloración verde de los cotiledones, y el desarrollo del brote (Rolland *et al.*, 2002).

Dentro de los azúcares con función señalizadora se encuentran las hexosas, cuya presencia dispara potentes señales que la planta detecta, sin embargo las rutas mediadas por trehalosa y sacarosa también juegan un papel importante en la regulación del desarrollo y la expresión de los genes. Se ha sugerido que en plántulas la sacarosa

regula la diferenciación y el almacenamiento, mientras que las hexosas controlan el crecimiento y el metabolismo (Rolland *et al.*, 2002).

Para llevar a cabo la activación de rutas de transducción de señales, el azúcar primero debe ser detectado. Rolland *et al.* (2002) resume lo anterior al mencionar que al estudiar la señalización por azúcares, se ha reportado la participación de proteínas fosfatasa como PP1; proteínas kinasa como SnRKs, proteínas kinasa dependientes de calcio, proteínas kinasa activadas por mitógenos; y por último el Ca^{2+} como mensajero secundario.

En cuanto a los mecanismos de percepción de los azúcares se propone un modelo de percepción de metabolitos que incluye receptores en la membrana y receptores internos. Con el desarrollo de estos modelos se pretende explicar que las moléculas receptoras de la membrana perciben las concentraciones externas de azúcares y desencadenan una cascada de señales regulando la biogénesis de transportadores y la inserción o degradación de proteínas en la membrana plasmática. En la situación de que existan bajas concentraciones de azúcares se activa un sensor que induce genes para transportadores, y al haber más proteínas transportadoras hay una mejor absorción de los azúcares. Por otro lado, con altas concentraciones internas de azúcares el sensor intracelular puede reprimir la transcripción para transportadores, o promover su inactivación vía endocitosis y degradación, reduciendo así la entrada de azúcares (Lalonde *et al.*, 1999).

El aspecto de la función señalizadora de los azúcares en plantas se ha enfocado en la expresión de varios genes. (Rolland *et al.*, 2002) mencionan que una gran diversidad de genes son regulados por azúcares al nivel de la transcripción, incluyendo genes relacionados con fotosíntesis, metabolismo del carbono y del nitrógeno, respuesta a estrés y metabolismo secundario en diferentes especies de plantas. Los mismos autores aseveran que los azúcares pueden reprimir la expresión de un gen afectando la estabilidad del ARN mensajero, a través de regiones que no se transcriben como se ha demostrado en *Arabidopsis*.

La regulación de los procesos mediante los azúcares proporciona a la planta mecanismos muy valiosos para ajustarse a las condiciones ambientales y para controlar procesos fisiológicos y del desarrollo, como fotosíntesis y floración. Los genes que responden a los carbohidratos inician respuestas de "banquete o hambruna". Los genes para fotosíntesis y movilización de recursos son inducidos por la baja en carbohidratos (respuesta a la hambruna), mientras que al aumentar las concentraciones de azúcares se estimula la expresión de los genes para utilización y almacenamiento (respuesta al banquete). Esto ocurre tanto en las células de la fuente como en los tejidos de la demanda (Lalonde *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2002).

Un aspecto importante a considerar es la función señalizadora de los azúcares es su implicación en la regulación de la senescencia de la hoja. Rolland *et al.* (2002) indican que los azúcares reprimen la expresión de los genes fotosintéticos, y que en plantas transgénicas, la expresión de la hexokinasa se correlaciona con la tasa de senescencia de la hoja. Es interesante que la expresión de la fosfolipasa D, la cual es importante para la

senescencia de la hoja, sea inducida por la glucosa. En algunos estudios el contenido de glucosa y fructosa se incrementó con la edad de la hoja, mientras que el contenido de almidón disminuyó drásticamente.

Los aspectos de senescencia de la hoja, dieron pauta para analizar los efectos de los azúcares en la transición del ápice vegetativo a floral, hecho que se ha estudiado con más detalle recientemente y que resulta ser sumamente complejo. En *Arabidopsis* se requiere el incremento en la exportación de las hojas y la movilización del almidón para que haya floración, lo cual sugiere que los carbohidratos del floema tienen una función crítica en la transición a floración (Rolland *et al.*, 2002).

2.3. Trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-[1,1]- α -D-glucopiranososa) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa enlazadas de modo que el enlace glucosídico se da entre el hidróxilo del carbono 1 de una molécula y el hidróxilo del carbono 1 de la otra molécula (Figura 1). Es bastante abundante en la naturaleza y comúnmente se encuentra en insectos, levaduras lactobacillus, hongos y otras plantas. Por su capacidad para actuar como protector de proteínas contra la desecación o la congelación, posee uso potencial en conservas alimenticias, comidas envasadas, alimentos congelados y en medicamentos y productos cosméticos. (Branca *et al.*, 1999).

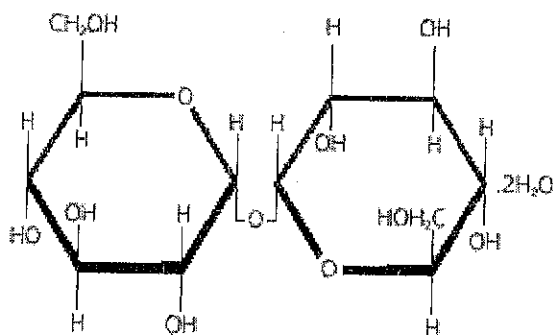


Figura 1. Estructura de la trehalosa.

De acuerdo con Thevelein, (1984) y Weisburd, (1988), el azúcar trehalosa (α -D-glucopiranosil- α - glucopiranosido), es un disacárido no reductor que en células eucariotes se encuentra comúnmente como un azúcar de reserva, así como implicado en la respuesta a diversos estreses ambientales.

Por su parte Wingler (2002), menciona que en adición a la función de carbohidrato de reserva, la trehalosa juega un papel muy importante en el rol de protección al estrés, especialmente durante estreses provocados por calor y deshidratación.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha determinado que la trehalosa es necesaria para que las células puedan contender con diversos estreses como el calor, desecación e inanición (De Virgilio *et al.*, 1994).

En cuanto a la acción de la trehalosa frente a estreses bajo condiciones *in vitro* autores como Elbein *et al.*, (2003) afirman que este disacárido protege a las enzimas del estrés

bajo términos *in vitro*, proporcionando un medio para que las células puedan sobrevivir a condiciones adversas. La trehalosa es capaz de preservar la integridad de las membranas bajo condiciones de altas temperaturas o estrés osmótico. Favorecería también la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando la separación de fases, la fusión y el rompimiento de las membranas (Crowe *et al.*, 1984).

2.4. Trehalosa como un compuesto de reserva

Autores como Elbein, (1974) hacen mención de que la trehalosa juega un papel importante como un componente de reserva en levaduras y hongos.

En *S. cerevisiae*, los genes que codifican para la trehalosa 6-fosfato sintasa (*TPS1*) y la trehalosa 6-fosfatasa (*TPS2*) han sido clonados y secuenciados (Vuorio *et al.*, 1993). Además, otras dos proteínas reguladoras están presentes (*TPS3* y *TSL1*), Thevelein y Hohmann (1995), las ubican como necesarias para la estabilización y la actividad máxima del complejo de la trehalosa sintasa. *TPS1p* también desempeña un papel crucial en el control del camino glucolítico pero de acuerdo con los mismos autores esta condición se lleva a cabo sin relación alguna a la síntesis de trehalosa.

La conceptualización de la trehalosa en el sentido estricto de funcionar como un carbohidrato de reserva ha sido cuestionado en la actualidad por investigadores como Wiemken (1990), donde le atribuyen, de acuerdo a su criterio; una función más importante como osmoprotector en levadura, que como un carbohidrato de reserva, poniendo así bajo análisis el esquema clásico de investigadores como Dawes y Senior

(1973), quienes en su momento afirmaron que la principal función de la trehalosa era como azúcar de reserva y que se debía sintetizar cuando la fuente de energía exógena excedía las necesidades celulares del crecimiento, mientras que la degradación ocurriría cuando hay deprivación de una fuente de carbono para sostener el crecimiento.

2.5. Funciones de trehalosa en levaduras

Los estudios más detallados sobre la función de la trehalosa en las células se han llevado a cabo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En esta, la síntesis del disacárido se realiza en dos pasos enzimáticos mediados por las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP). Ambas enzimas están codificadas por los genes TPS1 y TPS2 respectivamente. Existen además otros dos genes (TPS3 y TSL1) que codifican proteínas regulatorias que, junto con las proteínas TPS y TPP, forman un complejo encargado de la biosíntesis de trehalosa (Thevelein y Hohmann, 1995). En sentido opuesto, la hidrólisis de la trehalosa en sus dos moléculas de glucosa es llevada a cabo por la trehalasa (Müller *et al.*, 2001).

Thevelein y Hohmann (1995) obtuvieron la mutante *tps1* de la levadura *S. cerevisiae*, cuya característica fue la incapacidad de sintetizar trehalosa, y su imposibilidad para crecer en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Al respecto se han postulado dos hipótesis principales para explicar la inhabilidad de la mutante *tps1* para crecer en glucosa:

- 1) Que la proteína TPS1, junto con un transportador de azúcares y la hexocinasa 2, estarían conformando un complejo sensor de glucosa (GGS) (Thevelein y Hohmann, 1995).
- 2) La regulación estaría dada más que nada por el intermediario trehalosa 6-fosfato, ya que *in vitro* se ha demostrado que es capaz de inhibir la actividad de la hexocinasa 2 (Blázquez *et al.*, 1998).

2.6. Hidrólisis de la Trehalosa

La trehalosa como carbohidrato de reserva puede ser sintetizado por la célula u obtenido del ambiente externo y es convertida por la trehalasa en presencia de agua en dos moléculas de glucosa (Francois y Parrou, 2001).

La levadura *S. cerevisiae* posee dos enzimas trehalasas; una trehalasa ácida codificada por *ATH1* (Alizadeh y Klionsky, 1996), y una trehalasa neutra codificada por *NTH1* (Kopp *et al.*, 1993).

De acuerdo con Nwaka *et al.* (1995) existe un tercer locus, *NTH2*, el cual es 77 % idéntico al *NTH1*, pero de acuerdo a los autores este parece no tener una actividad de trehalasa; ni parece estar involucrado en el catabolismo de la trehalosa, puesto que la mutante *nth2* presentó niveles normales de actividad de trehalosa neutra y de trehalosa.

El gen *NTH1* ha sido clonado en *S. cerevisiae* y en *Kluyveromyces fragilis* (Kopp *et al.*, 1993; Amaral *et al.*, 1997) se trata de una enzima citosólica que muestra una actividad

máxima a un pH de 7.0; de ahí el nombre con el cual es identificada, esta misma se activa por Ca^{2+} ó Mn^{2+} y es inhibida por Mg^{2+} (Nwaka *et al.*, 1995; Francois y Parrou, 2001). NTH1p es controlado por la fosforilación de una proteína cinasa dependiente de AMPc y parece ser una enzima implicada directamente en la movilización de la trehalosa que ocurre en respuesta a distintos estímulos fisiológicos como lo son: germinación, recuperación ante situaciones de estrés etc. (Nwaka *et al.*, 1995; Francois y Parrou, 2001).

En cuanto al papel fisiológico de la trehalasa ácida (*ATH1*) en la levadura; se sabe que está situada dentro de las vacuolas en *S. cerevisiae* y *Candida utilis* (d'Enfert y Fontaine, 1997). La actividad es máxima a un pH ácido (4.5), no es regulada por la fosforilación de una proteína kinasa dependiente de AMPc y no es afectada por los cationes divalentes. Esta enzima no está implicada en la degradación fisiológica de la trehalosa, está sujeta a la represión catabólica en presencia de glucosa (San Miguel y Argüelles 1994). El mecanismo molecular por el cual la trehalosa puede ser transportada hacia la vacuola no se conoce claramente; sin embargo, recientemente se ha demostrado que más del 90 % de la actividad de Ath1p es extracelular, también se ha encontrado que Agt1p regula el transporte y la hidrólisis de la trehalosa, a través de la trehalasa neutral citosólica (Nth1p), la cual esta acoplada y representa una segunda vía independiente (Jules *et al.*, 2004).

De acuerdo con Jules *et al.* (2004), la trehalosa extracelular es degradada por Ath1p, la cual fue originalmente predispuesta para ser una proteína vacuolar, pero



experimentalmente se ha demostrado que principalmente se localiza en el espacio periplasmático, además de una pequeña fracción en la pared celular.

Por su parte Zahringer *et al.* (1997) hacen referencia a que *ATH1* aparentemente no es inducido por condiciones de estrés.

Nwaka *et al.* (1996) mencionan que la delección de *ATH1* resulta en una completa pérdida de la actividad de la trehalasa ácida y en una incapacidad de usar trehalosa como fuente exógena de carbono.

La hidrólisis de la trehalosa en levaduras se lleva exclusivamente en presencia de la enzima trehalasa, la única excepción conocida es en *Pichia fermentans*, la cual exhibe una actividad de una trehalosa fosforilasa (Schick *et al.*, 1995).

2.7. Funciones de trehalosa en plantas

En el caso de las plantas, se pensaba hasta hace poco que no poseían la capacidad de biosíntesis de trehalosa, con la excepción de plantas de resurrección como *Selaginella lepydophylla*. Pero no hace mucho fue reportada en tabaco, papa (Goddijn *et al.*, 1997), y arroz (García *et al.*, 1997).

Blázquez *et al.* (1998) hacen referencia a que los bajos niveles de trehalosa en *Arabidopsis*, presumiblemente sean debidos a los niveles muy bajos del transcrito de

AtTPS1. Adicionalmente mencionan que es posible que los bajos niveles de trehalosa en la mayoría de las plantas cultivadas pueda ser el resultado de una trehalasa muy activa. El mismo autor menciona que la idea de que *Arabidopsis* no producía trehalosa comenzó a cambiar a partir de los primeros reportes sobre el aislamiento y caracterización de genes *TPS* y *TPP* en *Arabidopsis thaliana* (Blázquez *et al.*, 1998). La secuenciación completa del genoma de esta planta permitió encontrar alrededor de 11 genes con alta homología con los *TPS* y *TPP* ya previamente identificados. Sin embargo hasta ahora solo *AtTPS1* y *AtTPPA* han sido capaces de complementar la actividad catalítica en la mutante *tps1* y *tps2* de levadura, restando aún por demostrar la posible función de los otros genes y proteínas de esta extensa familia (Leyman *et al.*, 2001). De la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* se aisló un ADNc, que también fue capaz, al igual que *AtTPS1*, de complementar a la mutante *tps1* de levadura y de restaurar el fenotipo de termotolerancia y osmotolerancia (Zentella *et al.*, 1999).

La acumulación del intermediario trehalosa 6-fosfato, cuando se lleva a cabo la sobre expresión de *AtTPS1* produce, además de tolerancia a estrés osmótico, efectos pleiotrópicos indeseables. Ante esta situación, la construcción de una fusión traduccional de los genes de *E. coli* *otsA-otsB*, fue capaz de sostener la biosíntesis de trehalosa sin efectos pleiotrópicos, produciendo plantas capaces de acumular trehalosa y que además se tornaron tolerantes a sequía y salinidad (Garg *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la mutación de *AtTPS1* es letal en la etapa embrionario, ya que si bien la morfogénesis del embrión es normal en las etapas tempranas de su desarrollo, aquella se detiene justo antes de la fase de expansión celular

y acumulación de reservas (Eastmond *et al.*, 2002). Recientemente, se ha encontrado que la sobreexpresión de *AtTPS1* en líneas transgénicas de *Arabidopsis*, origina plantas que son insensibles al retraso en el crecimiento inducido por glucosa y por ácido abscísico (ABA) en medio Murashigue-Skoog con agar. Se ha postulado que es posible de *AtTPS1* participe en la señalización por glucosa en una vía en la que también intervendría la hexocinasa (Avonce *et al.*, 2004).

En referencia a la correlación de la presencia de trehalosa-6-fosfato (Tre6P) con la actividad fotosintética de las plantas, autores como Pellny *et al.* (2002) demostraron que la presencia de este intermediario de la trehalosa esta estrechamente correlacionado con cambios en la actividad fotosintética de las plantas, lo anterior demostrado mediante estudios llevados a cabo en tabaco expresando el gen *otsA* de *E. coli*, el cual codifica para trehalosa fosfato sintasa (TPS); las plantas portadoras de este gen presentaron hojas más pequeñas y de una coloración verde más intensa, además las hojas presentaron una mayor capacidad fotosintética por unidad de área que las hojas de las plantas que no fueron transformadas genéticamente (tipo silvestre). El incremento de la capacidad fotosintética por unidad de área se correlaciona directamente con un incremento en Tre6P. En plantas que expresan el gen *otsB* que codifica para trehalosa fosfato fosfatasa (TPP) o trehalosa fosfato hidrolasa (TreC) las hojas son más largas y pálidas con una menor capacidad fotosintética por unidad de área. Las modificaciones genéticas dieron como resultado que fuera imposible medir la cantidad de trehalosa en las hojas.

Pellny *et al.* (2002) mencionan además que aparentemente Tre6P puede alterar el flujo del ciclo glicolítico del carbono y el balance carbono:nitrógeno implicado en la regulación fotosintética de las hojas.

Por su parte Paul *et al.* (2001) puntualizan progresos recientes y dan soporte a la hipótesis de que las modificaciones genéticas en el metabolismo de la trehalosa esta involucrada directamente en la interacción con las rutas de señalización por azúcares, lo que se traduce en un posible incremento en la tasa fotosintética, específicamente cuando se lleva a cabo, la inserción de genes de *E. coli* (*otsA*).

2.8. Presencia de trehalosa frente al déficit hídrico

Los primeros intentos por obtener plantas transgénicas que sobre produjeran trehalosa se hicieron utilizando los genes *otsA* *otsB* de *E. coli* y *ScTPSI* de levadura. El objetivo era obtener plantas que acumulasen este azúcar y que por lo tanto mostraran una mayor tolerancia a la sequía (Holmstrom *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

De acuerdo con Goddijn *et al.*, (1997) la sobreexpresión de los genes *TPSI* en plantas ha sido empleado para mejorar la tolerancia de estas ante condiciones de estrés. Sin embargo esta estrategia solo se reportaba con los genes *TPSI* de bacterias y levaduras. Cuando el gen *TPSI* de *E. coli* (*otsA*) fue sobreexpresado en plantas de tabaco y papa la trehalosa acumulada en tabaco se expresó en niveles muy bajos; mientras que en papa fue indetectable. Los mismos autores menciona que las plantas de tabaco con el este gen

mostraron además una tolerancia al estrés, sin embargo a la par las plantas transgénicas presentaban evidentes cambios morfológicos atribuidos a la presencia del transgén.

Se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre expresaban el gen *AtTPS1*, capaces de complementar a la mutante *tps1* de *S. cerevisiae*. Para evaluar los efectos de la sobreexpresión en la tolerancia al estrés por sequía, se estableció un experimento donde plantas de *Arabidopsis* de cuatro semanas de edad se sometieron a un régimen sin riego durante dos semanas. Los resultados mostraron que tanto las plantas transgénicas como las plantas control perdieron alrededor de 90 % de agua (Avonce *et al.*, 2004), sin embargo, al adicionar nuevamente agua las plantas sobre expresantes de *AtTPS1* fueron capaces de rehidratarse y continuar su ciclo de vida normal hasta la floración y producción de semillas fértiles, mientras que las plantas silvestres murieron por deshidratación. La cantidad de trehalosa acumulada en las plantas transgénicas no fue suficientemente alta como para explicar esta tolerancia, sin embargo se detectaron cambios en la expresión de genes importantes en la señalización y respuesta a estrés, lo que explicaría este fenotipo (Avonce *et al.*, 2004).

Avonce *et al.* (2004) mencionan que contrariamente a lo observado en otras plantas sobre-expresantes de genes *TPS* de *E. coli* y *S. cerevisiae*, la sobre expresión de *AtTPS1* no produjo ningún efecto aberrante en *Arabidopsis*, con excepción de que la floración se retrasó una semana.

La condición de efectos pleiotrópicos en las plantas de tabaco con el gen *TPS1*, estableció la pauta para llevar a cabo una serie de experimentos encaminados a aumentar el

contenido de trehalosa endógena, sin causar estos efectos indeseables, pero conservando las características de tolerancia a los diferentes estreses abióticos; ante esto Garg *et al.*, (2002) llevaron a cabo la expresión de un gen bifuncional de *otsA* y *otsB* (codificando para TPP) con los promotores ABA-Inducible y el *rbcS* en plantas de arroz, actuando el primero como un promotor en la regulación de estrés y el segundo como un promotor órgano específico, las plantas transgénicas resultantes presentaron una mayor capacidad fotosintética y una disminución en los daños por fotooxidación cuando se sometieron a las condiciones de estrés. Además de presentar resistencia a estreses abióticos las líneas transgénicas obtenidas no presentaron cambios morfológicos aparentes.

Además de la fusión bifuncional de *otsA* y *otsB*, existen otros trabajos como el de Jang *et al.* (2003), donde se obtuvieron plantas transgénicas de arroz las cuales eran capaces de producir una mayor cantidad de trehalosa, mediante la inclusión de un gen producto de la fusión bifuncional denominado *TPSP*, compuesto de la unión de los genes Trehalosa-6-fosfato sintasa (*TPS*) con el gen Trehalosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*), las plantas obtenidas con *TPSP*, bajo el control del promotor ubiquitina, no mostraron inhibición en el crecimiento o alteraciones fenotípicas visibles a pesar de los altos niveles de trehalosa producida. Además las plantas transgénicas presentaron tolerancia a sequía, estrés salino y frío. Los resultados obtenidos por el autor le permiten sugerir que la trehalosa actúa como un protectante global contra estreses abióticos. Importante de resaltar es también el hecho de que de acuerdo al autor el arroz es más tolerante a la síntesis de sacarosa que algunas plantas dicotiledóneas.

Recientemente Miranda (2006) reporta que las plantas transgénicas obtenidas de *Arabidopsis thaliana*, durante el desarrollo de su investigación, que expresaron una construcción génica bifuncional de *ScTPS1-TPS2* presentaron mayores concentraciones de trehalosa bajo un promotor constitutivo (*35SCaMV*) y uno inducible por estrés (*Rd29A*); y que las líneas generadas mejoraron en su resistencia a diversas condiciones de estrés abiótico tales como congelamiento, calor, sequía y salinidad. Además estas plantas no presentaron efectos pleiotrópicos en su fenotipo.

2.9. Presencia de trehalosa y su relación con la floración

van Dijken *et al.* (2004) reportan que en *Arabidopsis*, la expresión de *AtTPS1* es necesaria para que ocurra la transición del estado vegetativo al reproductivo, ya que el mutante homocigoto *tps1/tps1* es incapaz de llevar a cabo esta transición. Sin embargo, no hay evidencias que la sobre expresión o la ausencia de expresión de *AtTPS1* afecte la expresión de los genes que se saben afectan este proceso fisiológico, como *CO*, *SOC1*, *FLC*, *FT* y *LFY*.

Avonce *et al.* (2004) produjeron líneas de *Arabidopsis* que sobrexpresaron la construcción *35S::AtTPS1*, mismas que no mostraron alteraciones fenotípicas visibles, con excepción de un retraso en la floración, tolerancia a sequía, y contrario a la línea WT, insensibilidad para germinar en presencia de glucosa y ácido abscísico.

Miranda (2006) señala que líneas de *Arabidopsis* que sobrexpresaron la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* bajo el control del promotor constitutivo *35S* o el inducible

por estrés *Rd29A*, no mostraron fenotipo alterado (incluyendo la floración) en comparación con la línea no transformada.

2.10. Presencia de trehalosa en la interacción de *A. thaliana* con patógenos

Dengl y Jones (2001), mencionan que las interacciones planta-patógeno que se establecen entre la planta y parásitos están proporcionadas a nivel molecular por interacciones específicas, entre alelos del locus *avr* de avirulencia del patógeno y el locus *R* de resistencia de la planta. Cuando un locus específico *avr* del patógeno encuentra su contraparte *R* del hospedante, el resultado es la resistencia a la enfermedad. El reconocimiento de esta interacción, activa diversos mecanismos de defensa y conducen al arresto del crecimiento del patógeno. Se han aislado varios genes de *R* tanto del modelo *Arabidopsis* como de distintas especies cultivadas. Recientes estudios permiten reconocer que, no obstante el amplio rango taxonómico de los patógenos (bacterias, hongos, virus, nemátodos y algunos insectos) y de la gran variedad de elicitores que producen, los genes *R* codifican solamente para 5 diferentes clases de proteínas (NB-LRRs extracelular, Kin, LRR-Kin y RPW8 intracelular). En el modelo más simple, las proteínas codificadas por *R*, son receptores encargadas de detectar los elicitores del patógeno, iniciando así cascada de señalización que conduce a la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Staskawicz *et al.*, 1995).

De acuerdo con Fluhr (2001), para explicar como las plantas podrían reconocer una gran variedad de elicitores con una limitada variedad de productos *R*, recurre a la postulación de un modelo combinatorio, similar al que opera en las células olfativas en mamíferos,

en el cual con unos cuantos cientos de receptores sería posible mantener una eficiente red de monitoreo de defensa contra una miríada de patógenos y elicitores. Los primeros eventos detectados al activarse R, son un incremento de calcio intracelular, la alcalinización del espacio extracelular, activación de proteína-quinasas, producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) y de óxido nítrico (NO), y una reprogramación transcripcional (Baker *et al.*, 1997). La activación de proteína-quinasas da lugar a la activación de factores de transcripción que se requieren para la activación de genes de defensa. Tanto el NO como los ROIs, contribuyen a la rápida activación de una batería de genes de defensa tanto en el tejido infectado como en sus alrededores. Dentro de las funciones de estos genes de defensa se encuentran aquellas que incluyen la biosíntesis de ácido salicílico (SA), la biosíntesis de etileno, la lignificación y endurecimiento de la pared celular, la producción de compuestos antimicrobianos, como fitoalexinas, péptidos antimicrobianos y la respuesta de hipersensibilidad (HR), que conducen a la muerte mediante apoptosis del tejido infectado, lo cual finalmente repercute en el aislamiento al patógeno e impide su diseminación en la planta.

Se ha detectado la presencia de trehalosa en algunos tipos de interacciones planta-microorganismo de naturaleza fitopatógena. Se sabe desde hace tiempo que se acumulan grandes cantidades de trehalosa en raíces e hipocótilos colonizados por el patógeno *P. brassicae*. Müller *et al.* (1995) reportan que se ha detectado trehalosa en hongos ecto micorrízicos y en hongos micorrízicos vesicular-arbusculares.

Estudios recientes sobre el metabolismo de la trehalosa permite acercarse a conocer el papel de la trehalosa durante el proceso de infección. La disrupción del gen *TPS1* de

Candida albicans, agente causal de candidiasis en animales y humanos inmunodeprimidos, produjo un descenso en la infección del patógeno afectado drásticamente el desarrollo de las hifas (Zaragoza *et al.*, 1998). También la disrupción del gen *TPS2* (que codifica para TPP) en *C. albicans* redujo la infección y volvió a las cepas termosensibles (van Dijck *et al.*, 2002 a).

Durante el proceso de infección de *Arabidopsis* con *Plasmodiophora brassicae*, agente causal de la agalla de la raíz, se determinó que se acumula trehalosa, aparentemente producida por el hongo, y que esta a su vez induce la expresión del gen de la trehalasa de la planta. Al respecto Brodmann *et al.* (2002) plantean que la trehalosa del hongo podría alterar el metabolismo del carbono de la planta, por lo que ésta induce como mecanismo de defensa la expresión de la trehalasa.

En otro trabajo se deletó el gen *TPS1* del hongo *Magnaporthe grisea*, agente causal de la roya del arroz. La mutante mostró una patogenicidad drásticamente reducida y esporuló pobremente. El descenso en la patogenicidad se atribuyó a la falta de suficiente trehalosa al inicio de la infección para generar la presión osmótica necesaria de los apresorios para penetrar la pared celular. Este trabajo señala la importancia que el disacárido cumple en el proceso de infección y por otro lado la trehalasa que produce la planta la contrarresta. Ambos componentes trehalosa-trehalasa formarían parte del mecanismo basal de defensa en la relación planta-patógeno (Foster *et al.*, 2003).

Una pista sobre la posible función de la trehalosa como un activador de la respuesta de defensa la reporta Reignault *et al.* (2001), al realizar aplicaciones de trehalosa foliar (15

g.L⁻¹), a plantas de trigo, donde a través de los cambios evaluados en la actividad enzimática de la fenilalanina amino-liasas (PAL), la peroxidasa, (PO) y la cinnamyl alcohol-deshidrogenasa (CAD), afirma que el tratamiento confiere resistencia a las plantas de trigo contra *Blumeria graminis*, activando la respuesta de defensa de las plantas (por ejemplo deposición papilar, y actividad de PAL y PO).

En el mismo sentido, Schluepmann *et al.* (2004) analizaron mediante microarreglos, el comportamiento transcripcional de *Arabidopsis* al crecer a las plántulas en presencia de trehalosa 100 mM, así como en plantas transgénicas que sobre expresaron *otsA* de *E. coli*. En ambos casos, se incrementa el contenido endógeno de trehalosa 6-fosfato y este parece ser el efector que induce algunos genes relevantes de respuesta a estrés, entre los cuales destacan algunos que podrían estar implicados en mecanismos moleculares de defensa a patógenos, como los que codifican para una cinasa 1 asociada a pared celular (At1g21250), una proteína relacionada con AIG2 (At3g28930), una proteína TIR relacionada con genes de resistencia (At1g72930), una peroxidasa (At4g21960), el citocromo P450 (At4g22690) y una isoflavona reductasa (At1g75280). Las claves entre paréntesis corresponden a la base de datos de AGI-TAIR (Arabidopsis Genome Initiative- The Arabidopsis Information Resource); de acuerdo a lo anterior, el efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los patógenos no está dado por la trehalosa en sí, sino a los genes que se activan en la planta por efecto de la trehalosa y/o de la trehalosa 6-fosfato.

2.11. Trehalasa

De acuerdo con Garre (2003), el gen *ATH1* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica la trehalasa ácida, enzima vacuolar, que participa junto con la trehalasa neutra en la degradación de la trehalosa. La implicación de la trehalasa neutra en la respuesta a estrés se encuentra documentada, sin embargo es poco lo que se sabe sobre el papel de la trehalasa ácida. Datos obtenidos por este autor sugiere la participación de la trehalasa ácida en la degradación intracelular de trehalosa en fase estacionaria así como un papel de la misma en la respuesta a estrés. La trehalasa ácida es extracelular en muchos hongos. Ath1p puede ser localizada en vacuolas en la levadura *S. cerevisiae*.

Investigadores como Garre (2003) llevaron a cabo un estudio del patrón de expresión del gen *ATH1* y de las actividades trehalasa neutra y ácida en varias cepas de laboratorio con mutaciones en genes implicados en el metabolismo de la trehalosa, sometidas a diferentes intensidades y tipos de estrés. Los resultados del autor indican una inducción del gen *ATH1* en ciertas condiciones de estrés lo que apoya su implicación en el metabolismo de la trehalosa en dichas condiciones.

Jules *et al.* (2004), en un trabajo realizado para elucidar la vía de asimilación de trehalosa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* reportan que existen dos vías diferentes de asimilación de trehalosa, una de ellas es la ruta que depende de Agt1p-Nth1p. Los autores mencionan que la otra ruta donde está involucrada la trehalasa ácida parece ser la más importante en el sistema de asimilación de trehalosa.

En referencia a la condición de acción extracelular de la enzima trehalasa Aeschbacher *et al.* (1999) reportaron el aislamiento de la proteína GMTRE1 que codifica la trehalasa activa en los nódulos de soya (*Glycine max* L.), así como su cDNA y se encontró su transcrito en raíces, nódulos, hojas, flores y raíces maduras. Al comparar la secuencia de aminoácidos, se encontró similitud con la trehalasa de *Arabidopsis*, con TreA y TreF de *E. coli*, trehalasas periplásmica y citoplásmica, respectivamente y con la trehalasa humana. Al estimar la actividad de trehalasa en un cultivo en suspensión, se detectó más del 80 % de la actividad en el medio, sugiriendo que la proteína es secretada por la célula.

Müller *et al.* (2001), en su trabajo con *Arabidopsis*, exponen que la mayor actividad de la trehalasa se ha detectado en flores maduras y en menor medida en hojas, tallos y raíces. Un dato interesante es que la expresión del cDNA de gen *AtTRE1* de la trehalasa de *Arabidopsis* en una mutante *Scath1* de *Saccharomyces cerevisiae*, rescató el fenotipo inviable para desarrollarse en presencia de trehalosa). Los mismo autores mencionan que la levadura posee una trehalasa citoplásmica (Nth1) y una vacuolar o extracelular (Ath1) y que la complementación de la mutante *Scath1* por *AtTRE1* de *Arabidopsis*, sugiere que la proteína también se secreta extracelularmente.

2.12. La bacteria *Pectobacterium carotovorum*

Toth *et al.* (2003) mencionan que *Pectobacterium carotovorum*, la cual antiguamente era conocida como *Erwinia carotovora* sub. *carotovora*, es una bacteria fitopatógena que causa pudrición blanda. El desarrollo de esta bacteria comúnmente se presenta en

regiones subtropicales y templadas en una amplia variedad de cultivos tales como zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), chicoria (*Cichorium intybus* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.). En este último caso es una de las enfermedades poscosecha más severas en el mundo. La pudrición blanda puede ocurrir durante el almacenamiento de los tubérculos de papa, así como en el suelo antes de la cosecha, y por la utilización de tubérculos semillas contaminados que se deterioran después de la siembra (Kucharek y Bartz, 2000).

La taxonomía del género *Erwinia* es compleja y está constituida por varios grupos. El más relevante es el grupo *carotovora* que se caracteriza por incluir la especie *E. chrysanthemi* (Ech) y las subespecies *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). De acuerdo a Hauben *et al.* (1998) éstas han sido clasificadas en el género *Pectobacterium*, como *P. chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, sin embargo esta nomenclatura no ha sido ampliamente aceptada por los fitopatólogos.

Pérombelon y Salmond (1995) mencionan que el control de este fitopatógeno se dificulta mucho debido a que se disemina a través del agua de riego, sobrevive en la maquinaria agrícola y en los restos de cosechas infestadas. Otra opción adoptada por los agricultores, en aras de prevenir la enfermedad, es la desinfección del material de trabajo con sustancias químicas (bactericidas), el tratamiento de las aguas de riego con luz UV, y el de los cultivos con antibióticos y otras sustancias químicas.

En relación a la capacidad de *Pectobacterium carotovorum* para biosintetizar trehalosa Uhland *et al.* (2000) reportan para *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, (especie estrechamente relacionada con *P. carotovorum* completamente secuenciada (Bell *et al.*, 2004), que en esta especie no se encontró ninguna de las cinco vías de biosíntesis, reportadas por Avonce *et al.* (2006): a) la vía TPS/TPP de la trehalosa 6-fosfato sintasa y la trehalosa 6-fosfato fosfatasa, en la cual los substratos son UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato que forman al intermediario trehalosa 6-fosfato que luego origina a la trehalosa; b) la vía TreS, en la cual la trehalosa sintasa isomeriza a la maltosa para formar trehalosa; c) la vía TreY/TreZ en la cual el substrato puede ser glicógeno o almidón (maltodextrinas) y en dos pasos se libera trehalosa; d) la vía TreP en la cual la trehalosa fosforilasa (TreP) condensa la glucosa y glucosa 1-fosfato para formar trehalosa en una sola reacción; y e) la vía TreT, en la cual a partir de ADP-glucosa y glucosa se forma trehalosa por efecto de la TreT.

Uhland *et al.* (2000) mencionan además que aunque *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* no cuente con alguna de las vías conocidas de síntesis de trehalosa; si posee la capacidad para utilizar trehalosa de una forma similar que *E. coli*, ya que esta bacteria puede utilizar como fuente de carbono a la trehalosa, internalizándola y transformándola en trehalosa 6-fosfato por TreB/TreP, y posteriormente hidrolizando al intermediario por efecto de TreC en glucosa y glucosa 6-fosfato.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de Biotecnología Agrícola, y de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Las determinaciones de trehalosa se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Gabriel Iturriaga en el CEIB de la UAEM en Cuernavaca, Morelos.

3.2. Plásmidos

Para llevar a cabo el experimento de transformación genética de las plantas de tabaco, se utilizaron los vectores binarios pBin19 y pGreen 0029.1, con un origen de replicación para bacterias y un marcador de resistencia a kanamicina para realizar la selección bacteriana, y dentro de sus bordes izquierdo y derecho un marcador de selección para plantas, el cual es un *cassette* de resistencia a kanamicina (NPTII) (Bevan, 1984).

3.3. Construcciones

En el caso de la primera construcción se empleó un gen quimérico compuesto de la fusión de los genes *ScTPS1* y *ScTPS2*, cuyo tamaño es de aproximadamente de 2880 pb; bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (CAMV35S) (Benfey y Chua, 1990). Después del promotor la construcción incluyó una secuencia líder y al final una región NOS 3' para la poliadenilación del ARNm. Todo lo

anterior flanqueado por un par de secuencias de 25 pb y que definen al ADN-T (Figura 2)

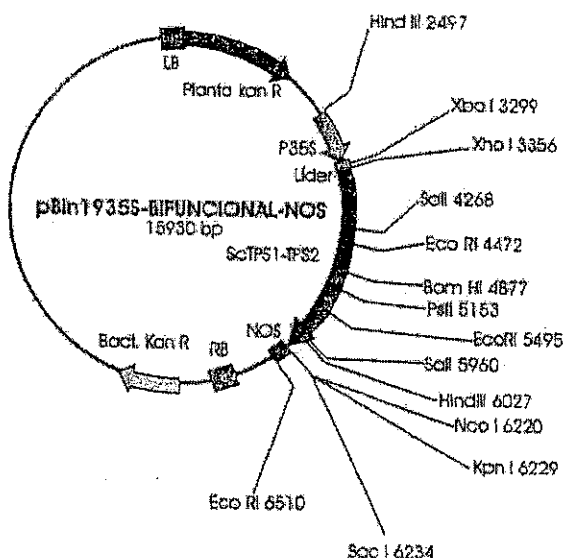


Figura 2. Mapa de la construcción pBIN19::35S::ScTPS1-TPS2::NOS.

Para la segunda construcción se empleó el gen *ScATH1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se encuentra en el cromosoma XVI, y está codificado por un ORF de 3637 nucleótidos, el cual codifica una proteína de 1211 residuos de aminoácidos con una masa de 136.9 kDa y un pI de 5.15. El gen se aisló por PCR de un banco genómico de la levadura empleando una polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity Roche®) para evitar la introducción de mutaciones. A los iniciadores específicos, se le añadieron los sitios de restricción BamHI en 5' y SacI en 3' para facilitar la clonación posterior en el vector pGreen0029.1 (gen de selección en planta Km y en *Agrobacterium tumefaciens*, Km). El vector con el gen pGreen0029.1::35S::ScATH1::nos (Figura 3), denominado pScATH1 y el vector helper pSOUP, se introdujeron por electroporación en la cepa de *A. tumefaciens*.

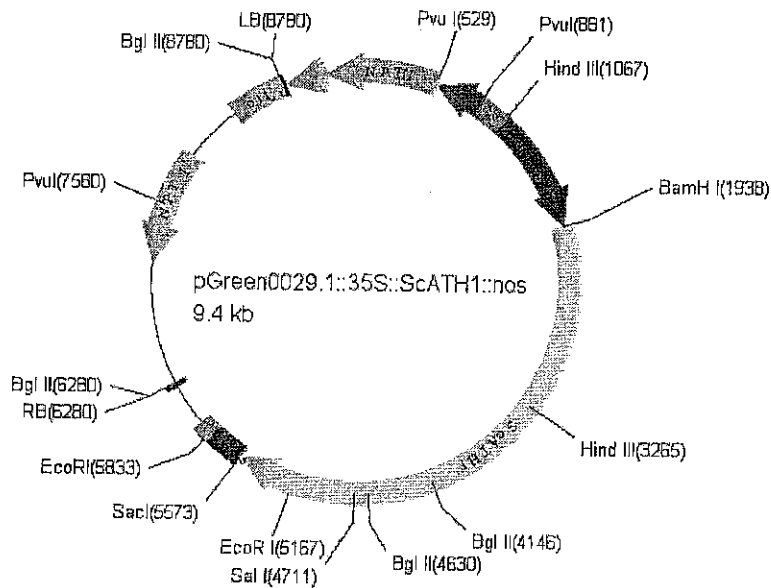


Figura 3. Mapa de la construcción pGreen0029.1::35S::ScATH1::NOS.

3.4. Cepas empleadas

La cepa bacteriana utilizada durante el desarrollo de la presente investigación fue la LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones descritas en el apartado anterior.

3.5. Medios de cultivo y agentes selectivos

Etapas de cocultivo de los explantes vegetales: Se prepararon cajas petri con medio de cultivo con la siguiente composición: Sales de MS 4.3 g L⁻¹ (Sigma M5524), tiamina 40

mg L⁻¹, sacarosa 30 g L⁻¹; Sin la adición de algún regulador de crecimiento, este medio fue solidificado con agar 7 g L⁻¹.

Selección de transformantes. Se prepararon cajas petri con medio de cultivo con la siguiente composición: Sales de MS 4.3 g L⁻¹, tiamina 40 mg L⁻¹, sacarosa 30 g L⁻¹, benzilaminopurina (BA) 1 mg L⁻¹, ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg L⁻¹. Al igual que el medio para cocultivo fue solidificado con agar 7 g L⁻¹.

Puesto que se trataba de los medios de cultivo para llevar a cabo la selección de los transformantes, fue necesario la adición de los antibióticos: ticarcilina (250 mg L⁻¹) para eliminar a la bacteria una vez que esta llevara a cabo la infección al tejido vegetal, así como de kanamicina (100 mg L⁻¹) como agente de selección de transformantes.

Se separaron las cajas petri en: a) aquellas que incluyeron el medio LB sólido con los correspondientes reguladores de crecimiento más la adición de ticarcilina y kanamicina (250 y 100 mg L⁻¹ respectivamente); b) cajas que solo incluyeron la adición de ticarcilina (250 mg L⁻¹); esta separación se llevó a cabo para hacer una comparación entre los explantes que se sometieron al proceso de agroinfección y aquellos que no lo recibieron.

Todos los medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C a una presión de 1.2 kg cm², durante 15 minutos.

Cultivo bacteriano. La cepa bacteriana *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con ambas construcciones de nuestro interés se creció en el medio LB (Luria Broth) a pH 7.2 ± 0.1 líquido con los antibióticos kanamicina 50 mg L^{-1} , y rifampicina 100 mg L^{-1} , durante 24 horas a 28°C . con agitación constante de 300 rpm en el agitador orbital.

3.6. Material vegetal

El material vegetal empleado fueron plantas de tabaco 'Xanthi' en estado vegetativo, obtenidas por germinación de semillas previamente colectadas, de las plantas se extrajeron hojas recién llegadas a madurez para obtener explantes foliares (discos de 0.5 cm de diámetro), la edad de las plantas al momento de tomar las hojas fue de tres meses. Las plantas de tabaco fueron desarrolladas en macetas individuales con un agrolita como sustrato.

3.7. Condiciones de cultivo

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el cultivo de tejidos *in vitro* incluyeron: 2000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, así como una humedad relativa en el cuarto de incubación de 50-60 %, a una temperatura constante de 24°C .

3.8. Transformación genética de tabaco

Se preparó el cultivo bacteriano para llevar a cabo la infección de los explantes (discos foliares de tabaco). Determinando la concentración de la bacterias desarrolladas en el medio LB líquido, mediante el uso de un espectrofotómetro JENWAY 6305 UV/Vis. Previamente calibrado y ajustado a 600 nanómetros para tomar la lectura.

La cepa LBA4404 con ambas construcciones después de las 24 horas de incubación de acuerdo con el espectrofotómetro utilizado arrojó una absorbancia de 1.0 a 600 nm. De tal manera, fue necesario centrifugar 10 mililitros de cultivo bacteriano en una microcentrífuga a 4000 revoluciones por minuto durante 5 minutos hasta obtener el pellet, mismo que para obtener una absorbancia 0.5, fue resuspendido en 20 mililitros de medio de cultivo líquido MS (4.3 g L⁻¹ de Sales minerales, 30 g L⁻¹ de sacarosa, pH 5.7). Una vez obtenida la concentración deseada de las bacterias, se llevó a cabo el proceso de transformación genética el cual se describe a continuación:

1. Se seleccionaron hojas de *Nicotiana tabacum* 'Xanthi'. Las hojas fueron perfectamente lavadas con jabón, y enjuagadas con agua, la desinfección superficial de las hojas se realizó con una solución de etanol al 70 % (v/v) por 30 segundos y una solución al 10 % de cloro comercial (v/v) por 20 minutos, para posteriormente enjuagarlas con agua destilada esterilizada dentro de la campana de flujo laminar.
2. Con un perforador metálico de hojas de papel esterilizado y flameado en alcohol, se cortaron los círculos de hoja de unos 6 mm de diámetro.
4. Los explantes se sumergieron por espacio de 30 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* previamente preparado.

4. Después de esto, los discos foliares se colocaron sobre papel filtro previamente esterilizado para eliminar los excesos de la bacteria.
5. Los discos con la bacteria se colocaron con el haz hacia abajo en cajas de petri con medio LB sin hormonas y se cocultivaron por 24 horas, bajo condiciones de fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 27 °C.
6. Los discos se lavaron con una solución de ticarcilina (250 mg L⁻¹) y se colocaron en cajas de petri con medio selectivo; los explantes permanecieron en incubación por cuatro semanas (bajo las condiciones ambientales previamente descritas) hasta que se dio lugar a la aparición de callo somero y posteriormente brotes.

3.9. Material para la extracción de ADN

Se emplearon 10 líneas (se consideró como línea a cada una de las plantas genéticamente modificadas) de cada construcción empleada y una que no fue expuesta al contacto del cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* considerada como no transformada (NT) o testigo; todas la líneas provenían de cultivo *in vitro*, de las cuales se empleó tejido foliar.

Nitrógeno líquido, morteros de porcelana estériles y pre enfriados, Buffer de extracción, Amortiguador TE, micropipetas de 20-200 y 100-1000 µl Eppendorf® y microcentrifuga Eppendorf® fueron empleados para llevar a acabo la extracción de ADN de las plantas sometidas a agroinfección con *ScATH1* y con *ScTPS1-TPS2*.

4.10. Metodología de extracción ADN

La metodología empleada fue una adaptación de la reportada por Dellaporta, S. L., y Word y J. B. Hicks (1983). Los siguientes son los pasos llevados a cabo:

1. Se tomaron aproximadamente 200 mg de tejido vegetal de las plantas sometidas a agroinfección con *ScATH1* y con *ScTPS1-TPS2*; así como de plantas sin agroinfección (WT), para posteriormente macerarlo con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado.

Una consideración importante tomada durante este paso fue que cuando se molió el tejido vegetal con el nitrógeno fue necesario evitar que las muestras adquirieran una tonalidad verde bandera ya que esto indicaría que existe descongelamiento y en consecuencia esto podría afectar la extracción del ADN, por lo que en algunas ocasiones fue necesario adicionar nitrógeno cada vez que se requiriera para obtener un polvito muy fino.

2. Se adicionaron 750 µl de buffer de extracción (Cuadro 9A) y se mezclaron ocasionalmente durante la incubación a 65 °C por 10 minutos en termoblock
3. Se añadieron 200 µl de una solución 5 M de acetato de potasio y se mezcló por inversión, para ser colocados en hielo por 30 minutos.
4. La mezcla anterior se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos en una microcentrífuga Eppendorf®.

5. El sobrenadante se dividió en dos partes iguales al tomar 450 μL y se colocaron en dos tubos eppendorf nuevos con 500 μL de isopropanol (del congelador) a cada uno. La mezcla se incubó por 15 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. El ADN precipitado se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de ADN con 200 μL de buffer de TE. (Cuadro 10A).
7. Se añadieron 2 μL de una solución de ARNasa (Cuadro 11A) y se incubó por una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
8. Se añadió 20 μL de acetato de sodio 3M y 200 μL de isopropanol frío (del congelador) y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 a 120 minutos. Se colectó el ADN con un palillo estéril, se pasó a otro tubo Eppendor y se lavó con etanol al 70 %, en dos ocasiones.
9. Se secó el pellet y luego se resuspendió en unos 20 μL de buffer TE y se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.11. Materiales para cuantificar ADN extraído

Muestras de ADN extraído de las plantas agroinfectadas con *ScATH1* y con *ScTPS1-TPS2* y sin agroinfección (WT) almacenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Espectrofotómetro JENWAY 6305 UV/Vis, micro pipeta Eppendor® de 20-200 μL , puntas estériles, y solución TE fueron empleados.

3.13. Metodología para cuantificar ADN extraído

Una vez obtenido el ADN genómico se procedió a cuantificar la cantidad de ADN obtenido de cada una de las plantas, para lo cual se tomo 1 μL de ADN y se diluyó con 49 μL de solución buffer TE dicha solución se colocó en una celda para medir la absorbancia en el espectrofotómetro JENGAY 6305 UV/Vis previa calibración con la solución blanco. Calibrado el equipo, se enjuagó la celda y se colocó una a una las muestras de las extracciones de ADN para determinar la absorbancia. Con los datos de absorbancia se hicieron los siguientes cálculos:

$$\text{Conc. ADN} = A_{260} \times 50^{(1)} \times 50^{(2)} = \mu\text{g mL}^{-1} \text{ de ADN}$$

⁽¹⁾ $A_{260}=1$; equivale a 50 mg mL^{-1} de ADN.

⁽²⁾ Factor de dilución utilizado en las mediciones.

Con lo anterior se obtuvo una serie de resultados que, dado las diferentes concentraciones que se presentaron, se procedió a homogenizarlas a 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ agregando un volumen determinado de solución TE.

Para conocer el volumen a agregar se partió de la formula $V_1C_1 = V_2C_2$ de donde se conocía el volumen inicial, la concentración inicial (en función a cada muestra) y la concentración final deseada de 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. De donde un simple despeje se tienen que la ecuación para calcular el volumen de la solución final para obtener la concentración de 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ es: $V_2 = (V_1C_1) / C_2$.

3.13. Materiales para la reacción de PCR

En este caso, solo se utilizó un par de iniciadores para amplificar el gen NTPII, que se emplea como gen de selección al obtener plantas transgénicas de manera experimental.

Iniciadores para NPTII

NPTII-5' 5'-AGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC-3'

NTPII-3' 5'-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG-3'

Se amplifica un fragmento de 780 pares de bases para PCR con estos iniciadores, Ta=58.3 °C.

3.14. Metodología para realizar el análisis de PCR

Mezcla o cóctel de reacción. Debido a que se analizaron muchas muestras para detectar una secuencia blanco por amplificar, con la finalidad de detectar cada muestra positiva o negativa, se preparó una mezcla de reacción, que luego se dispensó en muestras alícuotas. En el Cuadro 1 se muestra un ejemplo para el cálculo de los componentes del coctel para 14 muestras diferentes.

Cuadro 1. Cóctel de reacción en tubos eppendorf de 0.2 ml.

Componentes	Volumen 1X	Concentración 14X
Buffer PCR con Mg.	5 μ L	70 μ L
Mezcla de dNTPs	2 μ L	28 μ L
Iniciador 1	2 μ L	28 μ L
Iniciador 2	2 μ L	28 μ L
ADN templado ¹	1 μ L	
Taq polimerasa (1.0 u μ L ⁻¹)	2 μ L	28 μ L
H ₂ O desionizada estéril	36 μ L	504 μ L
Volumen final	50 μ L	700 μ L

¹ Se utilizaron normalmente 100 ng.

Taq polimerasa. Se empleó la enzima producida por la compañía Gibco-BRL en concentración de 1 u μ L⁻¹

Para realizar la reacción de PCR se empleó el siguiente programa en el termociclador Hybaid^(R) con sistema Peltier:

Entrada: 94 °C, 3 minutos 1 ciclo

Programa principal: 94 °C, 1 minuto (desnaturalización)

56 °C, 1 minuto (alineamiento)

72 °C, 1 minuto (alargamiento)

40 ciclos

Salida: 72 °C, 10 minutos, 1 ciclo.

Al finalizar la ejecución del programa de amplificación, se guardaron los tubos con las muestras a -20 °C hasta el momento de analizarlos. Se usaron 10 µL de la reacción para analizar electroforéticamente en un gel de agarosa cuya concentración fue de 1.6 % para separar fragmentos de 200-800 pares de bases.

3.15. Preparación de geles

La metodología empleada se basó en la reportada por Sambrook *et al.* (1989), y es la siguiente:

1. En un matraz Erlenmeyer, se preparó una mezcla de 0.8 y 1.6 de agarosa en TAE 1X (Cuadro A. 36) suficiente para el tamaño de la cámara, para gel de calidad y PCR respectivamente. Se disolvió calentando la mezcla en un horno de microondas, procurando que no hirviera, para que no se derramara el contenido. Después de que la mezcla se homogenizó (sin lentecillas de agarosa) se dejó enfriar un poco (50-60 °C.) antes de verter en la cámara de electroforesis y colocar un peine para formar los pozos de carga al solidificar el gel.
2. Se colocó el gel en posición adecuada en la cámara y se cubrió con suficiente buffer TAE 0.5X. (Cuadro 12A)
3. Las muestras de ADN (10 µL de la muestra de ADN digerido) se mezclaron con 2 µL del buffer de carga 6X (Cuadro 13A). La mezcla preparada se cargó con una micropipeta lentamente en los pozos del gel, con mucho cuidado, procurando que no se derramara la muestra hacia el carril adyacente. El primero y último

carril se emplearon para poner el marcador de peso molecular: M1= ladder DNA de 1 kb y/o M2= lambda HindIII.

4. La cámara fue tapada y conectadas las terminales a la fuente de poder. El ADN posee una carga negativa, por lo cual migró hacia el polo positivo. El voltaje utilizado fue de 100V.
5. Después que el colorante azul de bromofenol migró a la altura deseada (considerando que este migre a la altura de unos 500 pares de bases), se procedió a teñir el ADN para poderlo visualizar. Esto se logró sumergiendo el gel en una solución de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de bromuro de etidio por 15 minutos.
6. Para visualizar el ADN, se colocó el gel en un transluminador de luz UV, a longitud de onda alta y se fotografió y editó con el sistema EDAS260 de Kodak® conectado a la PC.

3.16. Prueba de tinción con lugol

Con la finalidad de establecer una prueba cualitativa que reflejara los cambios en el contenido de azúcares en el tejido vegetal se realizó un bioensayo para determinar el contenido de almidón en callos y explantes neoformados a partir de discos foliares de tabaco, regenerados en medio de cultivo que incluían diferentes fuentes de carbono como sacarosa y trehalosa; esta última en diferentes concentraciones.

El procedimiento para llevar a cabo la determinación del contenido de almidón, consistió en destañir los callos y/o brotes mediante su inmersión en etanol al 95 % por una hora para luego ser transferidos a una solución de lugol por una hora; seguido de tres

enjuagues con agua destilada. Los tratamientos evaluados en este bioensayo se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la prueba de tinción con lugol.

Tratamiento	Composición del medio del medio de cultivo
T1	MR ¹ + 10 mM de trehalosa
T2	MR + 50 mM de trehalosa
T3	MR + 100 mM de trehalosa
T4	MR + 200 mM de trehalosa
T5	MR + 300 mM de trehalosa
S1	MR + 100 mM de Sacarosa
T0	MR sin fuente de carbono.

MR¹= Medio de cultivo con las sales de MS adicionado con vitaminas; BA (0.1 mg L⁻¹) y ANA (1.0 mg L⁻¹) como reguladores de crecimiento y agar (7.0 g L⁻¹).

3.17. Extracción de trehalosa

Para llevar a cabo la extracción de trehalosa se siguió el siguiente protocolo para análisis por CLAE (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).

1. Pesar 200 mg de tejido fresco (anotar peso exacto).
2. Congelar en nitrógeno líquido y moler hasta pulverizar.
3. Añadir 1 ml de agua grado HPLC filtrada (una vez descongelado el tejido). En tubos de 1.5 ml, calentar la muestra a 95 °C por 10 minutos.

4. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos.
5. Pasar todo el sobrenadante por una columna preparada en una pipeta Pasteur (Figura 4). Una vez colectada la muestra, se guarda a -20 °C.

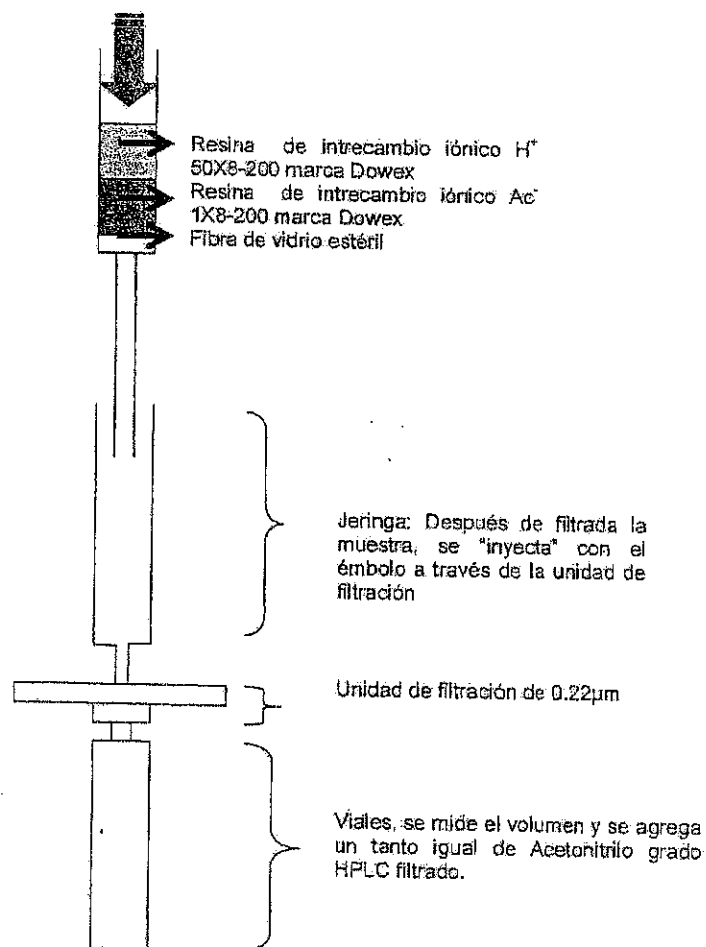


Figura 4. Sistema de purificación de trehalosa a partir de tejido vegetal fresco.

3.18. Cuantificación de trehalosa

Para la cuantificación de trehalosa por CLAE se utilizó una columna para análisis de carbohidratos Agilent Zorbax ®, con un flujo de 1 ml.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 65:35.

El cromatógrafo empleado fue un modelo KS801 de la marca de Waters ®, (Millipore 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 computo. El procesamiento y manejo de los datos cromatográficos se hizo a través del programa Millennium 2000 (Waters). Para la cuantificación de trehalosa de las muestras se compararon con los siguientes estándares: 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20, $\mu\text{g mL}^{-1}$ 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La extracción y cuantificación de trehalosa, se realizó a partir de las líneas transgénicas de cada construcción más su respectivo testigo (planta sin transformar) en la Figura 5, se muestra la correlación entre el área del pico del CLAE y la concentración de la trehalosa a distintas concentraciones.

1. 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
2. 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$
3. 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$
4. 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$
5. 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
6. 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

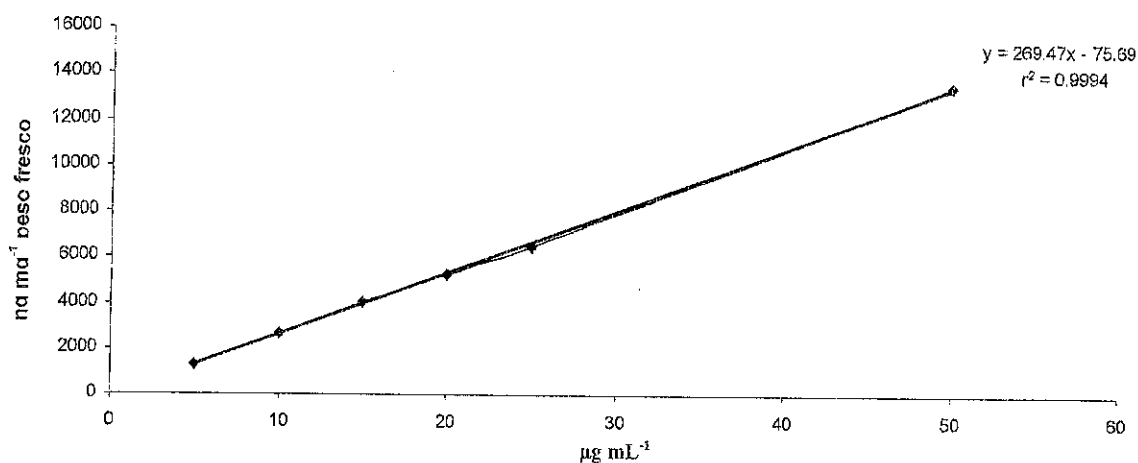


Figura 5. Curva patrón de trehalosa.

3.19. Prueba de regeneración *in vitro*

Con los datos de contenido de trehalosa obtenidos por HPLC y contemplando la posibilidad de poder utilizar el gen *ScATH1* como un gen para llevar a cabo selección positiva, se evaluó la capacidad morfogénica de cuatro líneas transgénicas determinadas; por tener dos de ellas alto contenido de trehalosa (4Tre y 9Tre) y dos líneas más con bajo contenido de trehalosa (3Tre y 5Tre) cuantificada por HPLC y un testigo sin transformar (WT). Cada línea se regeneró sobre un medio de cultivo para inducir brotes el medio se compuso de Sales de MS (4.3 g L⁻¹), adicionado con vitaminas WS, con los siguientes reguladores de crecimiento: BA (1.0 mg L⁻¹), ANA (0.1 mg L⁻¹). Donde la condición que se varió fue la fuente de carbono. De tal manera que se estructuraron los tratamientos que se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados en la prueba de regeneración de las líneas transgénicas con *ScATH1* y *ScTPS1-TPS2*.

Tratamiento	Fuente de carbono
T0	0 mM de Trehalosa ó Sacarosa
T1	10 mM de Trehalosa
T2	50 mM de Trehalosa
T3	100 mM de Trehalosa
T4	200 mM de Trehalosa
T5	300 mM de Trehalosa
T6	500 mM de Trehalosa
S1	87.6 mM de Sacarosa

3.20. Pruebas de patogenicidad *ex vitro* en plantas jóvenes de tabaco genéticamente modificadas

Para llevar a cabo cada una de las pruebas de patogenicidad se empleó la bacteria *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901) Waldee 1945, amablemente proporcionada por la Maestra en Ciencias Lourdes Rodríguez Mejía del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

En cuanto a la determinación de la tolerancia a patógenos adquirida vía transformación genética de las plantas obtenidas, se aclimataron dos ejemplares de cada línea (o evento

de transformación), cuya condición de transformante fue previamente comprobada por PCR; además de un testigo (planta sin transformar). Después de 4 semanas de aclimatación se evaluó su comportamiento frente al ataque de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*. Para esto fue necesario cultivar la bacteria en un medio de cultivo líquido LB en agitación constante a una temperatura de 24 °C; hasta que alcanzó una absorbancia de 1.0 a medida a 600 nanómetros.

Las plántulas fueron inoculadas con la solución bacteriana mediante la inyección 10 µL de la suspensión bacteriana directamente en el último entrenudo donde previamente, con una hoja de bisturí, se le hizo una pequeña incisión; inmediatamente después de la inoculación las plántulas fueron cubiertas con una bolsa plástica transparente para generar las condiciones adecuadas de infección bacteriana.

3.21. Pruebas de patogenicidad *ex vitro* de plantas adultas de tabaco

Plantas portadoras de gen *Sc ATH1*, fueron aclimatadas y llevadas a condiciones de invernadero para promover su desarrollo y evaluar la tolerancia y/o resistencia de estas plantas transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens* frente a la bacteria *P. carotovorum*, a los tres meses de desarrollo. Puesto que las líneas *Sc ATH1* fueron generadas mucho antes que las *Sc TPS1-TPS2*, por cuestiones de tiempo solo las *Sc ATH1* se evaluaron bajo la condición de plantas adultas.

Para estos ensayos se emplearon cuatro líneas de tabaco transformadas además de un testigo (planta sin transformar) a las cuales se les agregó 10 μ L de la solución bacteria a la concentración establecida, la solución fue vertida sobre una herida de 3 mm realizada en el último entrenudo, para posteriormente cubrir por completo a las plantas con una bolsa de polietileno y generar de esta manera las condiciones de humedad y temperatura óptimas para el crecimiento e invasión de la bacteria en el tejido vegetal (Figura 6 (a), (b), (c)).



Figura 6 (a) Cultivo bacteriano de *Pectobacterium carotovorum*. (b) Adición de 10 μ L de la solución bacteriana a la herida provocada de la planta adulta de tabaco. (c) Cubierta plástica de la planta inoculada para favorecer la invasión de la bacteria en el tejido vegetal.

3.22. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Para determinar el fenotipo de las plantas transformadas se realizó una prueba de infección con la bacteria *P. carotovorum* en plántulas desarrolladas bajo condiciones *in vitro*. Seleccionado dos líneas con alto contenido de trehalosa (datos de HPLC) y dos con bajo contenido de trehalosa; así como una línea tipo silvestre que fungió como

testigo, tanto para las líneas transgénicas con *ScATH1* como para las portadoras del gen bifuncional *ScTPSI-TPS2*.

De las plantas que correspondía a cada una de las líneas seleccionadas se les cortó la sección apical; la cual fue transferida a un nuevo medio de crecimiento *in vitro* para establecer condiciones similares de crecimiento entre líneas transformadas y testigo, después de dos semanas de desarrollo y una vez que cada línea emitió nuevas raíces se realizó la infección con la bacteria, mediante inyección de 2 microlitros de solución bacteriana tomada del medio LB en agitación constante a una temperatura de 24 °C; con una absorbancia de 1.0 a 600 nm. La inoculación se realizó directamente sobre las partes terminales de las microplántulas.

El muestreo del tejido vegetal se llevó a cabo a las 24 horas; ya que en este número de horas los síntomas de la invasión bacteriana fueron sumamente visibles al apreciarse manchas acuosas en el limbo y pecíolo de las hojas terminales; así como en la sección apical del tallo.

3.23. Cuantificación de la infección bacteriana

Para realizar la cuantificación del grado de invasión de la bacteria en el tejido vegetal tanto *in vitro* como *ex vitro*, se empleó una modificación de la metodología reportada por Fumiaki *et al.* (2002), haciendo la adecuación para *P. carotovorum*. La metodología empleada consistió de los siguientes pasos:

1. Las hojas de tabaco de cada una de las líneas seleccionadas fueron lavadas con una solución jabonosa para después ser desinfectadas superficialmente mediante inmersión en una solución de etanol al 70 % v/v durante un minuto. Las hojas durante este periodo se mantuvieron en agitación. Las hojas se enjuagaron con agua destilada estéril por un minuto. Posteriormente se eliminó el exceso de agua colocándolas en papel absorbente previamente esterilizado (este paso sólo se lleva a cabo en pruebas que involucran material *ex vitro*). Mediante el uso de una perforadora de papel se extrajeron discos foliares de 0.5 cm²; por cuestiones estadísticas fue necesario tomar dos replicas independientes de cada línea para tratar de eliminar la variabilidad de los resultados en cada evento.
2. Cada disco de hoja considerado como un solo evento independiente se colocó en un tubo eppendor de 1.5 para microcentrífuga, con 100 µL de agua destilada estéril. Los pasos uno y dos se repitieron para cada línea.
3. Las muestras de tejido se maceraron manualmente con la ayuda de una microespátula, hasta no dejar secciones de tejido vegetal visibles.
4. A los 100 µL de agua más el tejido macerado se les agregó 900 µL de agua destilada estéril para alcanzar un volumen conocido.
5. De esta manera en este paso el volumen alcanzado por cada muestra correspondiente a cada una de las líneas es de aproximadamente 1 mL.
6. Los paso 3 y 4 se repitieron para cada muestra.
7. Las muestras permanecieron en reposo durante dos horas para que las bacterias se distribuyeran en toda la solución.

8. Posterior al periodo de reposo se aplicó vortex a cada una de las muestras e inmediatamente se inició con la serie de diluciones necesarias para poder realizar el conteo de colonias.
9. Una alícuota de 100 μL se tomó de cada muestra y fue colocada en un nuevo tubo eppendor de 1.5 mL. Al cual se le agregó 900 μL de agua destilada estéril.
10. De esta manera se estableció una serie de diluciones 1:10 llegando hasta 10^{-7} , repitiendo este paso, con este número de diluciones fue posible realizar el conteo de las colonias presentes en las muestras del tejido vegetal.
11. Alícuotas de 9 μL de cada dilución con 6 repeticiones fueron colocadas en medio LB sólido, con un pH ajustado a 7.0 e incubadas a 26 °C, con luz constante las 24 h.
12. El conteo se llevó a cabo a las 24 horas de incubación.

3.24. Prueba de germinación de semillas *in vitro*

Las líneas transgénicas que llegaron a formar flores se les dio seguimiento hasta la formación de sus semillas, las cuales se colectaron y se sometieron a un proceso de desinfestación con cloro al 10 % (v/v) por 10 minutos para inmediatamente después enjuagar las semillas con agua destilada estéril y colocar con mucho cuidado cada una de estas en cajas petri con medio de cultivo compuesto únicamente por las sales de MS (1962) al 100 % y solidificado con agar al 7 %.

3.25. Prueba de estrés hídrico

Las plantas de tabaco de 4 semanas de edad posteriores al proceso de aclimatación, desarrolladas en contenedores de unicel en un sustrato 50 % peat moss y 50 % agrolita fueron llevadas a capacidad de campo para posteriormente eliminar cualquier aportación de agua durante 40 días. Para reportar resultados fue necesario tomar fotografías de las plantas seleccionadas cada semana. Donde las variables evaluadas fueron: capacidad de recuperación de las plantas transgénicas (evaluación visual) en comparación con el testigo sin transformar y el porcentaje de humedad perdido hasta los 350 minutos de flujo de aire constante.

3.26. Cuantificación de la pérdida de humedad

Para establecer parámetros cuantitativos de la pérdida de agua tanto de las plantas transgénicas; como de las no transgénicas (WT), se cortó la hoja turgente más cercana al ápice; buscando en todo momento que las dimensiones de estas fueran lo mas parecidas entre sí con respecto a cada una de las líneas. Se seleccionaron las hojas de cuatro líneas transgénicas *ScTPS1-TPS2*; dos de ellas con alto contenido de trehalosa (9BI y 10BI) y dos con bajo contenido de trehalosa (1BI y 2BI); además de un testigo sin transformar (WT). Las hojas seleccionadas se colocaron en cajas petri con su respectiva identificación a flujo de aire constante en la campana de flujo laminar. Cada una de las hojas se pesó al momento de ser disectadas en una balanza analítica, y a este peso se le consideró como el 100 % de humedad, a los 15, 45, 105, 165, 225, y 350 minutos respectivamente se tomaron los pesos de las cuatro líneas transgénicas y el testigo, para

determinar en función a la disminución de su peso la pérdida de agua en el periodo de tiempo comprendido.

3.27 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas: Altura de planta, Número de hojas, Número de raíces en plantas *in vitro* con y sin sacarosa; así como Altura de plantas aclimatadas y Número de colonias bacterianas formadas, fueron analizadas bajo un diseño de bloques al azar, mediante un análisis de varianza y sus correspondientes pruebas de comparación de medias de Tukey; con el apoyo del programa SAS (Sistema de Análisis estadístico) Versión 8.2.

4. RESULTADOS

4.1 Transformación con pGREEN0029.1::35S::ScATH1::NOS

Una vez que los discos foliares de tabaco fueron sometidos a la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, los brotes neoformados a partir de estos, fueron transferidos a los correspondientes medios selectivos, donde aquellos que sobrevivieron sin presentar síntomas de toxicidad fueron separados como posibles transformantes (Figuras 7, 8).

De esta manera se logró regenerar 25 plantas en medio selectivo con kanamicina de un total de 60 discos de hoja infectados; cada una de estas 25 plantas se consideraron como líneas independientes, para futuras pruebas cada línea se multiplicó bajo condiciones *in vitro* para contar con al menos tres repeticiones de cada línea. Una de las replicas de cada línea se llevó a aclimatación para realizar pruebas *ex vitro*.

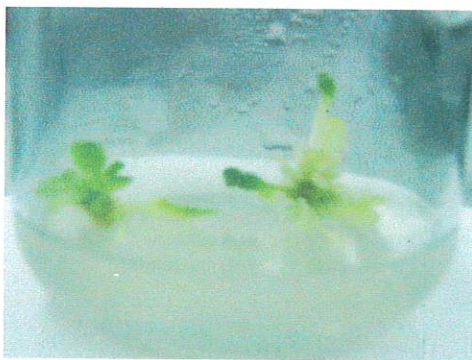


Figura 7. Microplántulas de tabaco que presentan susceptibilidad a kanamicina.



Figura 8. Microplántulas de tabaco que presentan resistencia a kanamicina (posible transformante).

4.1.1. Análisis molecular por PCR

Para validar molecularmente la selección de las líneas consideradas como posibles transformantes y descartar aquellas que a las cuales el transgén no se insertó en el genoma de la planta. Se amplificó por PCR la región correspondiente a NPTII, generando un fragmento de (780 kb) (Figura 9) de 16 líneas sometidas a la prueba la totalidad de ellas resultaron ser transformadas; esto bajo el criterio de haber presentado la banda correspondiente al gen de selección empleado durante la fase de transformación.

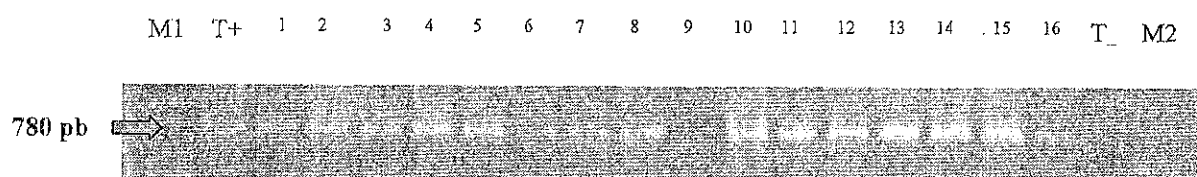


Figura 9. Fragmento amplificado (NPTII), donde se muestra la comparación de las líneas seleccionadas con el testigo positivo (T+) de las 16 líneas de tabaco sometidas a agroinfección.

M1. Marcador de peso molecular Ladder DNA de 1 kb.

T+. Control positivo (Muestra de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* portadora del gen NPTII).

1-16. Líneas originadas de brotes neoformados sobre medio de cultivo selectivo con Kanamicina (100 mg L^{-1}) y Ticarcilina (250 mg L^{-1}).

T-. Testigo negativo (WT).

M2. Lambda HindII.

De las 16 líneas candidatas a ser transformantes todas presentaron la banda correspondiente a NPTII, lo que indicó la condición de transformantes de cada una de estas líneas.

4.1.2. Prueba de tinción con lugol

En vista de que se planeó introducir el gen *ScATH1* en las plantas de tabaco, se pensó que las plantas transgénicas podrían exhibir un crecimiento diferencial en presencia de trehalosa, comparadas con las plantas no transgénicas. La trehalasa hidroliza a la trehalosa en dos moléculas de glucosa y este azúcar puede estimular el desarrollo o inhibirlo dependiendo de la concentración en el medio. La diferencia en la respuesta podría servir para diferenciar brotes transgénicos de no transgénicos.

En un estudio realizado por Wingler *et al.* (2000) quedó de manifiesto que en plántulas de *Arabidopsis* la aplicación de trehalosa exógena desde concentraciones de 25 mM, induce específicamente la expresión de genes como *Apl3*, el cual codifica para la subunidad grande de ADP-Glucosa fosforilasa, primera enzima en la biosíntesis de almidón; lo que se traduce directamente en una mayor acumulación de este carbohidrato de reserva principalmente en las hojas contiledonares; la corroboración de este hecho lo describe Fritzius *et al.* (2001) donde mencionan que la trehalosa inhibe la elongación de raíces, pero que a su vez permite la acumulación de almidón, al incrementar la actividad de AGPasa, y que además este disacárido induce la expresión de *ApL3* en los brotes.

Con el conocimiento previo de que podría existir una mayor acumulación de almidón con la presencia de trehalosa en forma exógena, se diseñaron los siete tratamientos (ver Cuadro 2) para llevar a cabo la evaluación de la regeneración *in vitro* de discos de hojas de 3 mm., extraídos de hojas de microplántulas de tabaco portadoras del gen *ScATH1*, el

cual codifica para la trehalasa ácida, una de las enzimas responsables de la degradación de la trehalosa.

Como se aprecia en la serie de fotografías (Figuras 10 a,a1,b,b1,c,c1,d,d1,e,e1,f,f1,g,g1), los ensayos no este ensayo no mostraron diferencias apreciables entre los explantes transgénicos de aquellos que no lo eran, ya que no fue posible apreciar diferencias entre los callos o los brotes obtenidos bajo diferentes concentraciones de trehalosa, o incluso regenerados en medios carentes de fuente de carbono o donde la fuente de carbono fue sacarosa (3 %). Razón por la cual se omitió esta prueba para futuros trabajos de caracterización de plantas transgénicas.

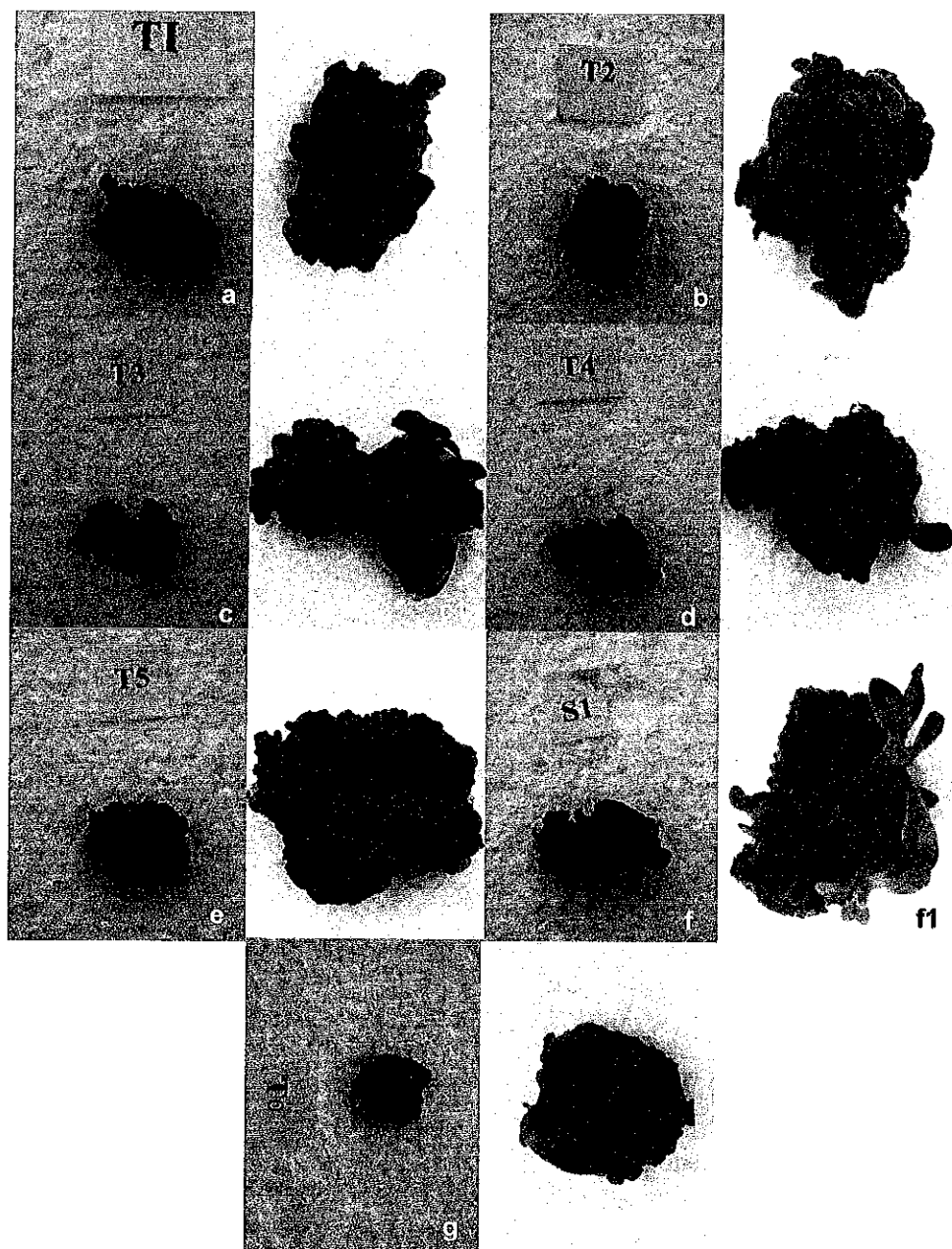


Figura 10. Pigmentación obtenida por reacción con la solución de lugol de los callos y brotes neoformados a partir de discos de hojas de plantas transgénicas de tabaco con *ScATH1* y sin transformar; regenerados en cada uno de los tratamientos con las fuentes de carbono (T1=10 mM, T2=50 mM, T3=100 mM, T4=200 mM, T5=300 mM de trehalosa) y dos testigos el primero sin fuente de carbono en el medio de cultivo (T0) y el segundo con sacarosa como fuente de carbono (87.6 mM). Las letras (a, b, c, d, e, f, g) representan a los callos sin transformar, mientras que las letras seguidas por un numero (a1, b1, c1,d1, e1, f1, g1) representan callos formados a partir de una línea transgénica *Sc ATH1*.

4.1.3. Cuantificación de trehalosa

En el Cuadro 4; se muestran los valores obtenidos del contenido de trehalosa en tejido foliar de plántulas de tabaco desarrolladas bajo condiciones *in vitro*,

Cuadro 4. Líneas utilizadas para cuantificar los niveles de trehalosa en tejido foliar. Se indican las líneas transformadas (NTre) y el control sin transformar (WT).

Líneas	Area1	Area2	Conc. 1	Conc. 2	ng mg-1 peso fresco 1	ng mg-1 peso fresco 2	ng mg-1 peso fresco Prom.
WT (ST1)	5066.0000	5195.0000	19.0805	19.5592	173.9536	178.2884	176.1210
2 Tre	7119.5000	6944.0000	26.7009	26.0497	246.9833	241.0189	244.0011
3 Tre	4593.0000	4653.0000	17.3252	17.5479	158.4212	160.2819	159.3515
4 Tre	9207.5000	9758.5000	34.4494	36.4941	316.6798	335.1552	325.9175
5 Tre	5416.5000	5973.0000	20.3812	22.4464	157.6480	173.5735	165.6107
6 Tre	5808.0000	6514.0000	21.8340	24.4540	181.2825	203.6750	192.4787
7 Tre	7503.0000	7150.0000	28.1240	26.8141	241.9080	229.9182	235.9131
8 Tre	7268.0000	7353.5000	27.2520	27.5693	198.5676	205.0189	201.7932
9 Tre	12638.5000	10848.5000	47.1816	40.5390	434.6930	373.4844	404.0887
11 Tre	8725.0000	9364.5000	32.6588	35.0320	255.0347	273.5741	264.3044
12 Tre	5549.5000	5355.0000	20.8747	20.1529	196.1358	188.4247	192.2802

Como se puede apreciar en la Figura 11, los niveles que alcanza este azúcar en los tejidos seleccionados se encuentran por arriba del valor que arroja el testigo (WT ST1), en el 80 % de los casos. Este resultado no deja de ser contradictorio, ya que se esperaría que la trehalasa redujera el contenido endógeno de trehalosa a niveles por debajo del control sin transformar.

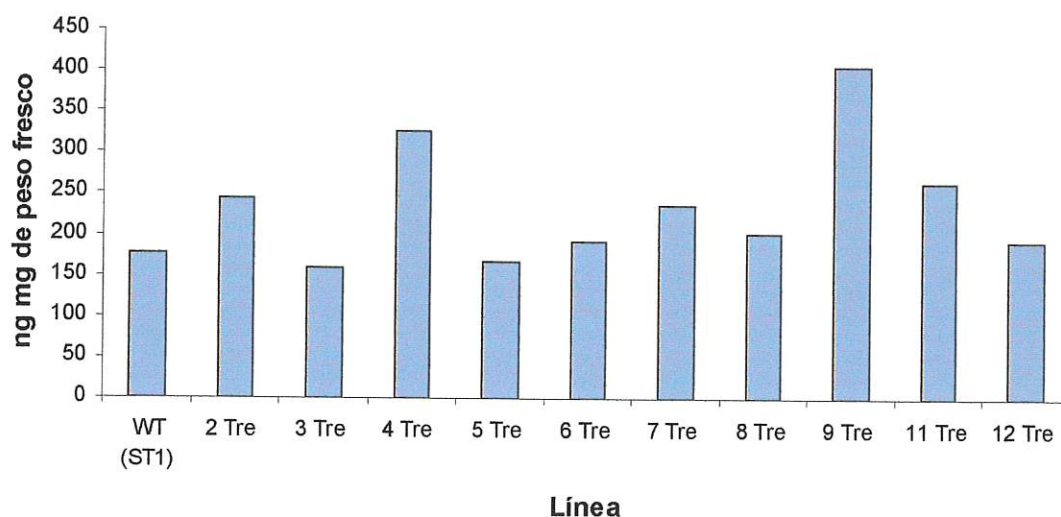


Figura 11. Concentración de trehalosa en nanogramos por miligramo de peso fresco de las líneas de tabaco obtenidas con el gen *ScATH1*.

4.1.4. Caracterización morfológica de los materiales transgénicos con *ScATH1* *in vitro*

Debido a la alteración de los contenidos endógenos de trehalosa de las líneas transgénicas con *ScATH1*; existían altas probabilidades de que al modificarse este factor, se modificara también la actividad fotosintética, lo que daría como resultado diferencias morfológicas y en el desarrollo de las plantas transgénicas comparadas con el testigo sin transformar cuando ambas fueran desarrolladas en presencia y ausencia de sacarosa; lo anterior se planteó bajo el conocimiento de que los azúcares en el medio de cultivo en específico la sacarosa son un importante componente en cualquier medio nutritivo y su adición es esencial para un crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que la fotosíntesis es insuficiente para sostener el desarrollo bajo estas condiciones.

4.1.4. Altura de planta. (brotes desarrollados *in vitro*)

Los resultados que se muestran en la Figura 12, indican que la condición de transformante aumenta la altura de planta de cada una de las líneas transgénicas con respecto al testigo sin transformar (WT) cuando los explantes son desarrollados con sacarosa en el medio de cultivo.

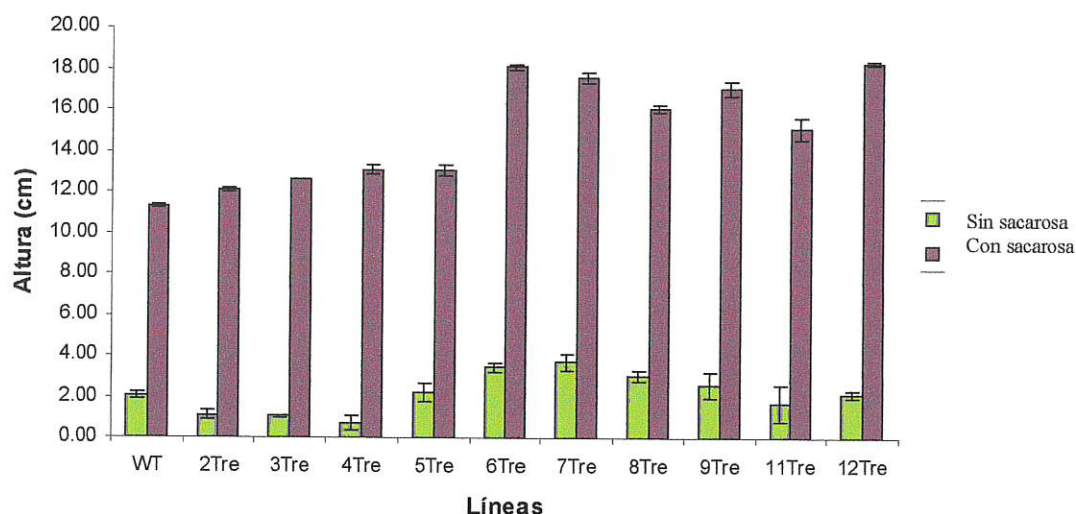


Figura 12. Altura de las plantas transgénicas con *ScATH1* (NTre) y un testigo (WT), desarrolladas *in vitro* a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.

Bajo la condición de sacarosa como fuente de carbono, el testigo (planta sin transformar) presenta los valores más bajos, en cuanto a altura se refiere, en comparación con el resto de las líneas transformadas con *ATH1*; es conveniente mencionar que esta diferencia es estadísticamente significativa (Cuadro 1A y 2A). Realizando un análisis sobre el comportamiento de las diferentes líneas en relación a su crecimiento y a su relación con su contenido inicial de trehalosa; encontramos que no existe correlación alguna entre la altura alcanzada en promedio por cada una de las líneas y el contenido de trehalosa reportado inicialmente; ya que es factible encontrar líneas con bajo contenido de

trehalosa reportado, que presentan un crecimiento promedio de 18 cm en 56 días, como lo es en el caso de la línea 12Tre ó 6Tre, y a la vez encontrar alturas muy similares con líneas cuyos contenido de este azúcar son elevados, como es el caso de las líneas 7Tre y 9Tre.

Al eliminar la fuente de carbono en el medio de cultivo, la altura de los brotes manejados *in vitro*, se vio severamente reducida en comparación con los manejados con sacarosa; sin embargo la condición de transformante con *ScATH1* mostró que algunas líneas portadoras de este gen continuaron con su desarrollo sin sacarosa, como en las líneas 6Tre, 7Tre, 8Tre cuya altura fue de 3.43, 3.70 y 3.0 cm respectivamente.

La línea sin transformar (WT) arrojó un valor promedio de 2.28 cm por explante; en cuanto a las líneas transgénicas los valores fluctuaron de 0.7 cm para la línea 4Tre y de 3.7 cm para la 7Tre. Los datos obtenidos de altura de brotes desarrollados sin sacarosa no permiten establecer una correlación entre su crecimiento y el contenido de trehalosa reportado por HPLC. Los valores extremos (0.7 y 3.7 cm) corresponden; el primero a una línea con alto contenido de trehalosa y el segundo a una con un bajo contenido del azúcar; pero a la par se presentan casos como la línea 5Tre cuyo valor de contenido de trehalosa es aproximadamente la mitad del que se reporta para 4Tre, por lo que se esperaría presentara un reducido crecimiento, pero la altura alcanzada por los brotes que corresponden a esta línea superan a los del testigo y se acercan a los de la línea 7Tre cuyo contenido de trehalosa es sumamente alto. Estadísticamente las líneas transgénicas analizadas en conjunto no ofrecen diferentes estadísticas con respecto a las plantas sin transformar (Cuadro 1A y 2A).

4.1.4.2. Número de hojas

En la variable número de hojas promedio por cada línea evaluada, se obtuvieron valores muy similares entre cada línea transgénica y a su vez muy cercanos al valor reportado para el testigo sin transformar (Figura 13) (Cuadro 1A. y 2A). El número de hojas fue en todos los casos superior a 20 hojas promedio por explante cuando los brotes fueron desarrollados bajo condiciones *in vitro* con sacarosa (87.6 mμ) como la fuente primaria de carbono.

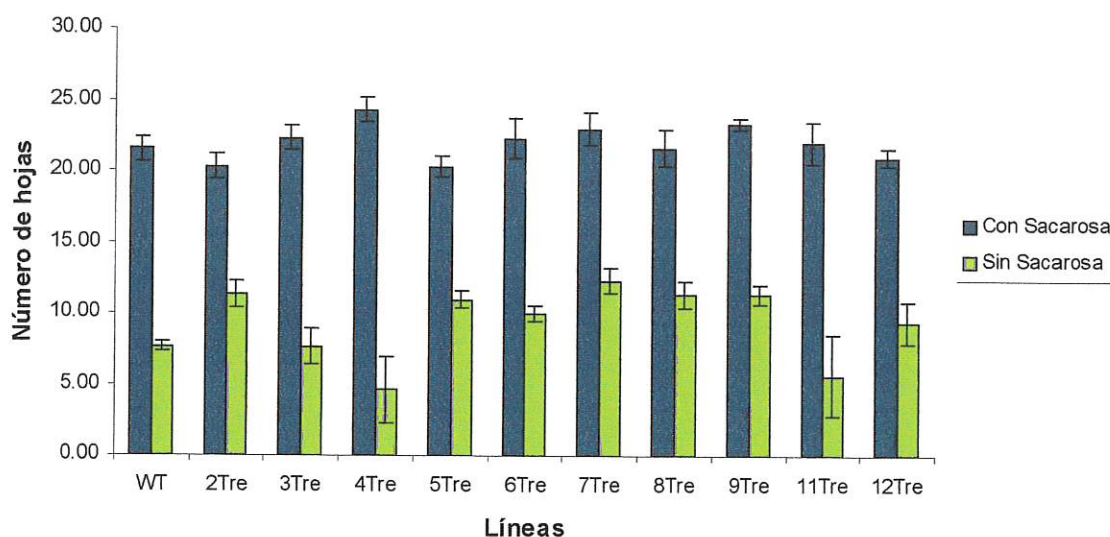


Figura 13. Número de hojas de las plantas transgénicas con *ScATH1* (NTre) y un testigo (WT), desarrolladas *in vitro* a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.

Sin sacarosa, el número de hojas se redujo en proporción a la reducción de la altura de las plantas. El número de hojas de las líneas transgénicas fueron de 4.67 en la línea 4Tre, hasta 12.33 en la línea 7Tre. Al igual que en el caso de la variable altura de planta no es

posible establecer correlación alguna entre el número de hojas y el contenido endógeno de trehalosa reportado; aunque si se detecta una diferencia estadística si se analiza a las plantas transgénicas como un conjunto y se les compara con sus respectivos testigos sin transformar (WT), (Cuadro 1A y 2A).

4.1.4.3. Número de raíces

Como se puede apreciar en la Figura 14; las líneas transformadas genéticamente con *ScATH1* muestran valores muy cercanos entre sí con respecto al número de raíces neoformadas promedio por explante y los correspondientes testigos, lo que estadísticamente se considera igual (Cuadro 1A y 2A), cuando la evaluación se llevó a cabo en brotes desarrollados sobre medio de cultivo con sacarosa.

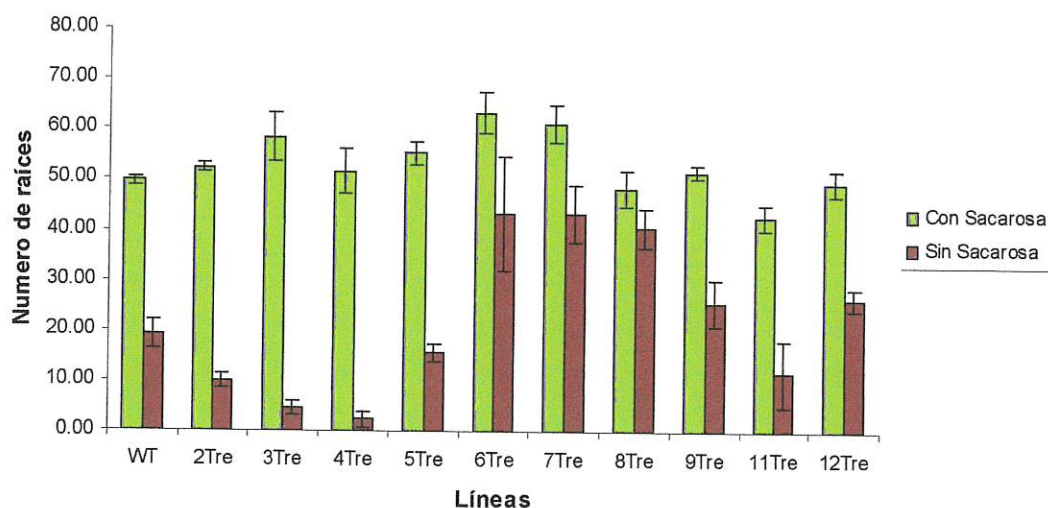


Figura 14. Número de raíces de las plantas transgénicas con *ScATH1* (NTre) y un testigo (WT), desarrolladas *in vitro* a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.

Cuando se suprime la sacarosa en el medio de cultivo, la línea sin transformar disminuye en más de la mitad su capacidad rizogénica; mientras que líneas como la 6Tre, 7Tre y 8Tre alcanzan valores cercanos a los que se obtienen cuando se desarrollan con sacarosa, sin embargo al igual que en el resto de los casos no existe relación directa entre el número de raíces neoformadas con el contenido de trehalosa. De la misma manera estadísticamente no existen diferencias en conjunto de las planta transgénicas al compararlas con las plantas con fenotipo tipo silvestre (sin transformar) (Cuadro 1A y 2A).

4.1.5. Prueba de regeneración *in vitro* de líneas de tabaco transgénicas *ScATH1*

Contemplando la posibilidad de poder utilizar el gen *ScATH1* como un gen para llevar a cabo selección positiva en un medio con trehalosa donde los tejidos transformados podrían adquirir una mayor capacidad para sostener su crecimiento y desarrollo en presencia de trehalosa como fuente de carbono, se evaluaron cuatro líneas transgénicas determinadas; por tener dos de ellas alto contenido de trehalosa (4Tre y 9Tre) y dos líneas más con bajo contenido de trehalosa (3Tre y 5Tre) cuantificada por HPLC y un testigo sin transformar (WT), sobre medios de cultivo con sacarosa 87.6 mM (S1), Trehalosa 10 mM (T1), 50 mM (T2), 100 mM (T3), 200 mM (T4), 300 mM (T5), 500 mM (T6). Se anexó además un tratamiento sin fuente de carbono (T0) tanto para las líneas transgénicas como para el testigo sin transformar.

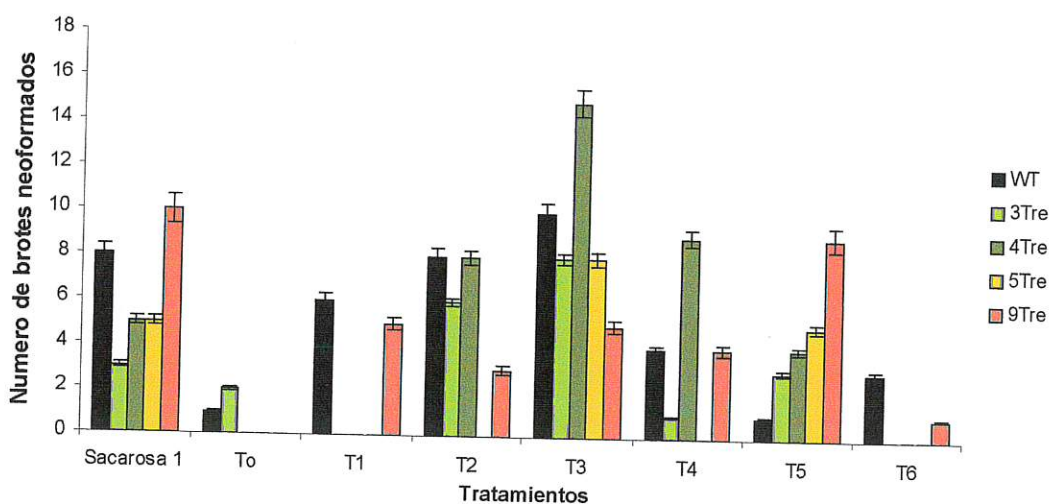


Figura 15. Número de brotes neoformados a partir de discos foliares de plantas de tabaco transgénicas con *ScATH1* (NTre) y un testigo sin transformar (WT), en medio de cultivo con trehalosa y sacarosa como fuentes de carbono.

En la Figura 15, se aprecia que la mayor cantidad de brotes neoformados en medio de cultivo con sacarosa se obtiene al utilizar la línea 9Tre la cual posee un alto contenido de trehalosa, seguido por el testigo cuyo valor promedio asciende a 8 brotes neoformados por explante. La ausencia de fuente de carbono (T0), podría haber funcionado como un agente selectivo, ya que el testigo emite brotes y tres de las líneas se ven imposibilitadas a desarrollar el proceso organogénico; sin embargo la presencia de nuevos brotes en la línea 3Tre, descarta esta posibilidad a presentarse como un evento que aunque esporádico, es constante en el número de brotes que se forman. Los tratamientos con trehalosa no permiten ubicarlos como tratamientos eficientes para poder ser utilizados como agentes selectivos, ya que se presentan una respuesta morfogénica sumamente variable entre cantidad de trehalosa en el medio de cultivo y la cantidad de brotes que forma cada línea, conjuntamente esta variabilidad imposibilita poder establecer alguna

correlación entre el contenido de trehalosa endógena y su respuesta organogénica y la relación de ambas con respecto a la cantidad del disacárido en el medio de cultivo.

4.1.6. Crecimiento de las líneas transgénicas con *ScATH1* en plantas aclimatadas

Las líneas (plantas) transgénicas de tabaco con *ScATH1* muy semejantes al testigo (planta sin transformar WT), esto incluyó la altura y el desarrollo que cada línea alcanzó a los 30 días posteriores a su proceso de aclimatación (Figura 16); donde no se pudo apreciar diferencias significativas en la altura alcanzada por cada línea y el testigo sin transformar (Figura 17), (Cuadro 1A y 2A).

La trehalosa no fue una condición para poder inferir una respuesta en cuanto a crecimiento de cada línea ya que la altura de planta se comportó de forma independientemente al contenido endógeno de trehalosa

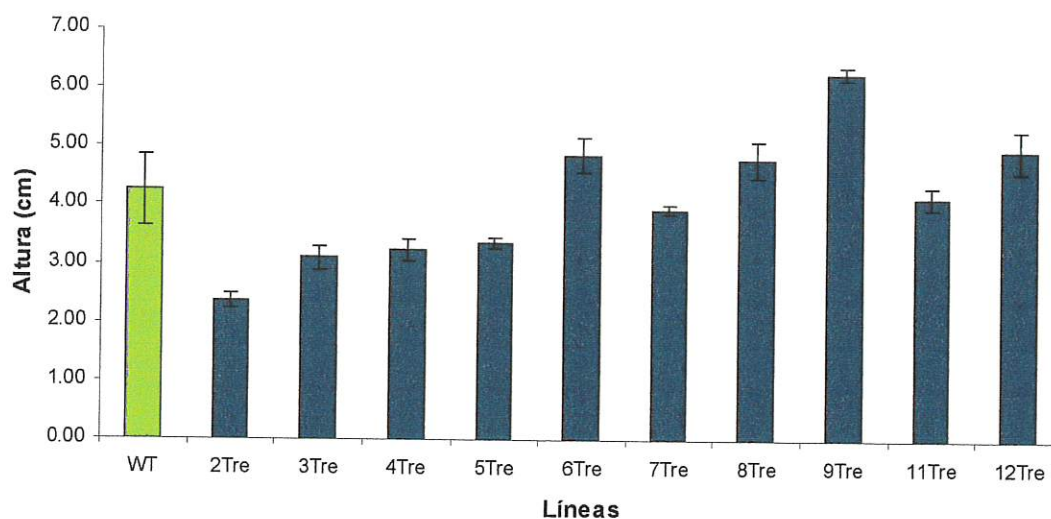


Figura 16. Altura de las plantas transgénicas *ScATH1*, y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.

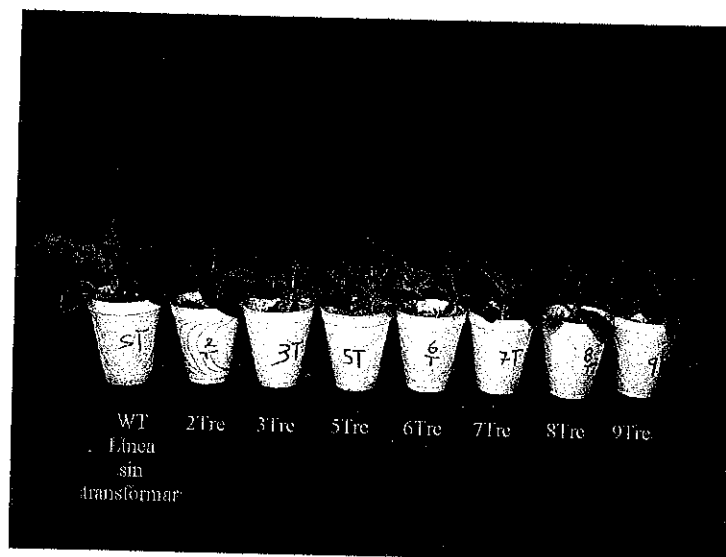


Figura 17. Vista panorámica de las líneas transgénicas de tabaco portadoras del gen *ScATH1* (NTre) y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.

4.1.7. Pruebas de patogenicidad *ex vitro* de plantas transgénicas adultas de tabaco portadoras del gen *ScATH1*

Con la determinación inicial de los niveles de trehalosa en cada una de las líneas transgénicas portadoras del gen *ScATH1*, se seleccionaron cuatro líneas cuyos niveles estuvieran originalmente por arriba de los valores del testigo con la finalidad de utilizarlas en una evaluación de su comportamiento frente al ataque de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*; una vez que estas plantas alcanzaron un desarrollo de tres meses de edad posteriores a su proceso de aclimatación *ex vitro*. La cantidad de trehalosa reportada inicialmente en su estado de microplántula por HPLC para el testigo y las cuatro líneas evaluadas se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Contenido inicial de trehalosa de las líneas evaluadas en la prueba de patogenicidad de plantas adultas de tabaco transgénicas con 35S::*ScATH1*.

Líneas	Contenido de trehalosa ng mg ⁻¹ de peso fresco promedio
WT (Testigo)	176.1210
2Tre	244.0011
4Tre	325.9175
11Tre	264.3044
12Tre	192.2802

En la siguiente serie de fotografías (Figura 18, (a), (b), (c), (d), (e)), se muestra el fenotipo de cada una de las líneas transgénicas así como del respectivo testigo utilizado (Figura 18 a), las características morfológicas iniciales de las líneas transgénicas fueron muy similares a las del testigo. Aún cuando los niveles de contenido de trehalosa son más altos en las cuatro líneas con respecto al testigo, no existe evidencia de que esta acumulación induzca anomalías fenotípicas visibles, por lo que la evaluación de la susceptibilidad o resistencia de estos materiales frente a la bacteria fitopatógena se llevó a cabo de forma estandarizada para cada una de las líneas.

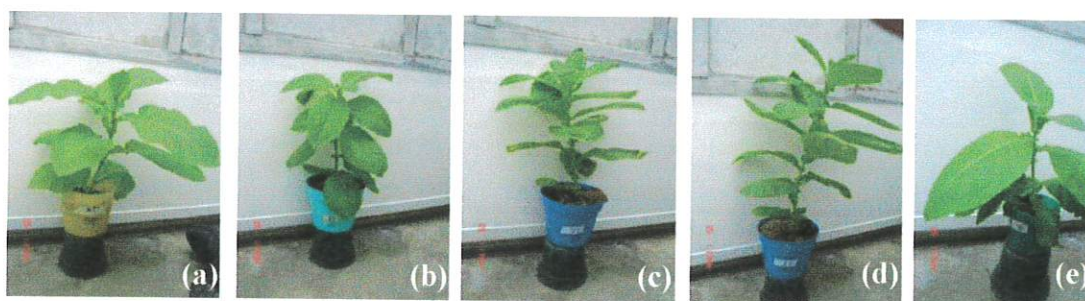


Figura 18. Plantas empleadas en las prueba de patogenicidad frente a *Pectobacterium carotovorum* con tres meses de desarrollo posterior a su aclimatación *ex vitro*. (a) Línea WT (Testigo), (b) Línea 2Tre, (c) Línea 4Tre, (d) Línea 11Tre, (e) Línea 12Tre.

Los síntomas fueron visibles durante el transcurso de la primera semana, siendo la marchitez y manchas acuosas en cada una de las líneas el síntoma más destacable, al cabo de tres semanas fue fácilmente detectable el avance de la invasión bacteriana mediante la ubicación de secciones con apariencia necrótica y/o acuosa. El testigo se presentó más turgente y se mostró más vigoroso que las líneas transgénicas cuyas hojas superiores y tallo presentaba severos daños en los tejidos de conducción; disminuyendo notablemente su desarrollo. A los 28 días posteriores a la infección las líneas 11Tre y 12Tre presentaron daños irreversibles culminando con su muerte (Figuras 19 (d), (e)), mientras que las líneas 2Tre y 4Tre, aun cuando los daños fueron muy graves no llegaron a la muerte; en su lugar las plantas comenzaron a emitir brotes basales sin síntomas aparentes de ataque bacteriano (Figura 19 (b), (c)). En cuanto al testigo, este en comparación con el resto de las líneas transgénicas se comportó con más tolerancia frente a la bacteria fitopatógena. Contrariamente a lo esperado el testigo sobrevivió al ataque de la bacteria.

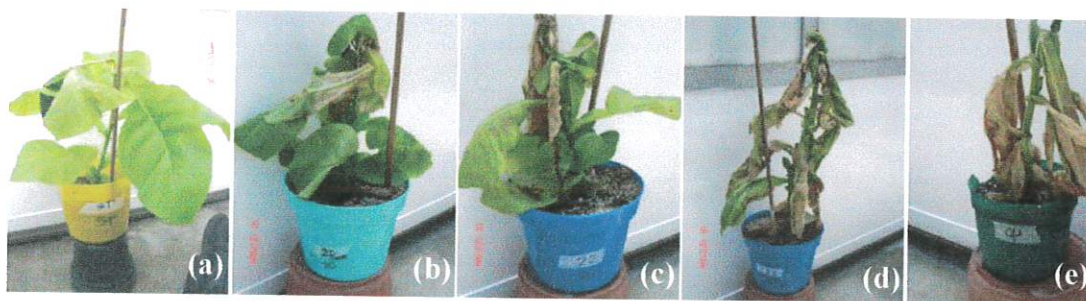


Figura 19. Plantas de tabaco inoculadas con *Pectobacterium carotovorum* 28 días antes. (a) Línea WT (Testigo), (b) Línea 2Tre, (c) Línea 4Tre, (d) Línea 11Tre, (e) Línea 12Tre.

Como se puede apreciar (Figura 19, (a), (b), (c), (d), (e)), las plantas transgénicas presentaron una mayor susceptibilidad frente al ataque de la bacteria; no existe correlación aparente en las líneas transgénicas, entre los daños ocasionados por esta y los niveles del azúcar trehalosa cuantificados inicialmente por HPLC, ya que líneas como 12Tre cuyos niveles de trehalosa son mucho menores que líneas como 11Tre, presentan síntomas muy graves de invasión bacteriana.

4.1.8. Cuantificación de la infección bacteriana

Además de evaluar visualmente los daños ocasionados por *P. carotovorum* en las líneas transgénicas y en el testigo, fue necesario contar con una prueba que arrojara parámetros cuantitativos para medir las diferencias en cuanto a tolerancia y/o susceptibilidad de las líneas transgénicas frente a las plantas sin transformar (WT). Para lo anterior se procedió de acuerdo con la metodología citada en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. De esta manera fue posible observar que en los materiales transgénicos la cantidad de bacterias presentes en las muestras de tejido foliar fue menor en el testigo en todos los casos, en la Figura 20, se aprecian las placas con el desarrollo de las colonias; en el lado derecho de cada una de las imágenes se presenta las muestras que corresponden al testigo y a la izquierda las líneas transgénicas, en todos los casos una dilución de la muestra con el tejido infectado de 10^{-5} fue insuficiente para determinar el número de colonias de la bacteria en las cuatro líneas transgénicas 2Tre, 4Tre, 11Tre, 12Tre, mientras que en el testigo una dilución de 10^{-4} o menor (10^{-3}) fue suficiente para observar la ausencia de la bacteria.

En resumen la cantidad de células bacterianas presentes en la planta testigo (WT sin transformar) fue hasta 1000 veces menor con respecto a cada una de las líneas transgénicas. Estos datos concuerdan con el grado de severidad observado en las plantas infectadas y manejadas en el invernadero, donde el testigo, se presentó con mayor tolerancia al ataque de la bacteria.

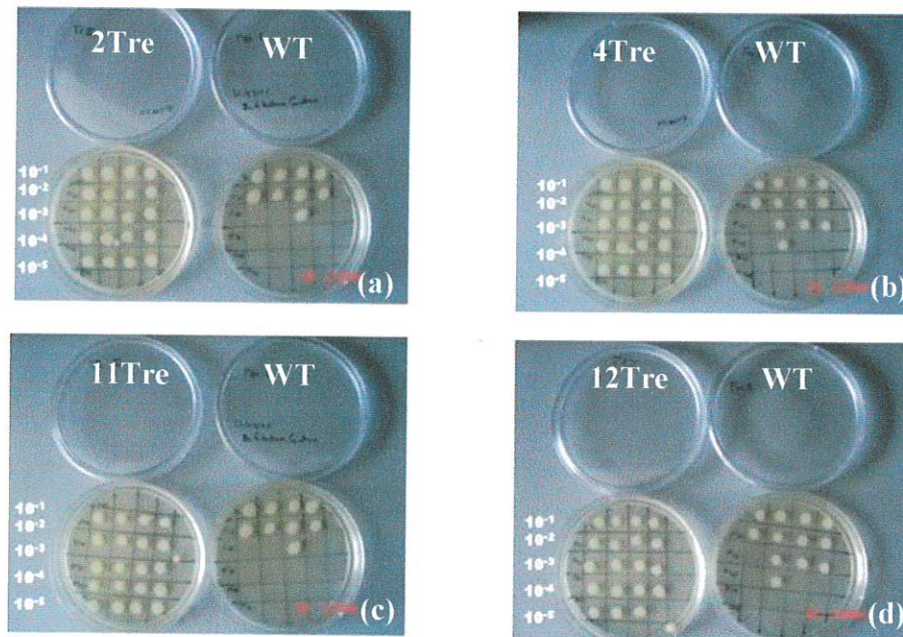


Figura 20. Número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a diferentes diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) en: (a) Línea 2Tre, (b) Línea 4Tre, (c) Línea 11Tre, (d) a las 32 horas de incubación.

4.1.9. Pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Para llevar a cabo este ensayo se seleccionaron dos plantas transgénicas con bajo contenido de trehalosa y dos con alto contenido, en comparación con el testigo sin transformar (WT) desarrolladas todas bajo condiciones *in vitro*.

Al analizar los síntomas en las microplántulas infectadas con la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, el único patrón constante en cada una de las líneas y sus correspondientes repeticiones evaluadas, fue que las líneas transformadas con *ScATH1* cuyo contenido inicial de trehalosa cuantificado por HPLC era mayor (4Tre y 9Tre) que el reportado para las líneas sin transformar (WT2A y WTJ), sufrieron una mayor invasión y daño del tejido vegetal por parte de la bacteria inoculada; mientras que líneas con una menor cantidad de trehalosa (3Tre y 5Tre) se comportaron con mayor tolerancia al desarrollo de la bacteria.

4.1.9. Cuantificación de la infección bacteriana

El número de bacterias cuantificado (Figura 21), osciló hasta la dilución de 10^{-7} , en la cual en todas las líneas fue posible llevar a cabo el conteo de las colonias formadas. Nuevamente se presenta el mismo patrón de infección de la bacteria, donde el desarrollo de esta, fue mucho mayor en las líneas 4Tre y 9Tre, cuya característica similar esta dada por poseer ambas un contenido inicial elevado de trehalosa. Por su parte las líneas 3Tre y 5Tre presentaron un menor número de colonias desarrolladas en el medio; lo que se correlacionó directamente con un bajo contenido de trehalosa inicial. Estadísticamente las líneas más susceptibles al ataque de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* fueron la 9Tre y la 4Tre, mientras que las 3Tre y 5Tre se comportaron ligeramente menos susceptibles al ataque de esta bacteria, aún y cuando existan diferencias estadísticas entre estas líneas. (Cuadro 3A y 4A).

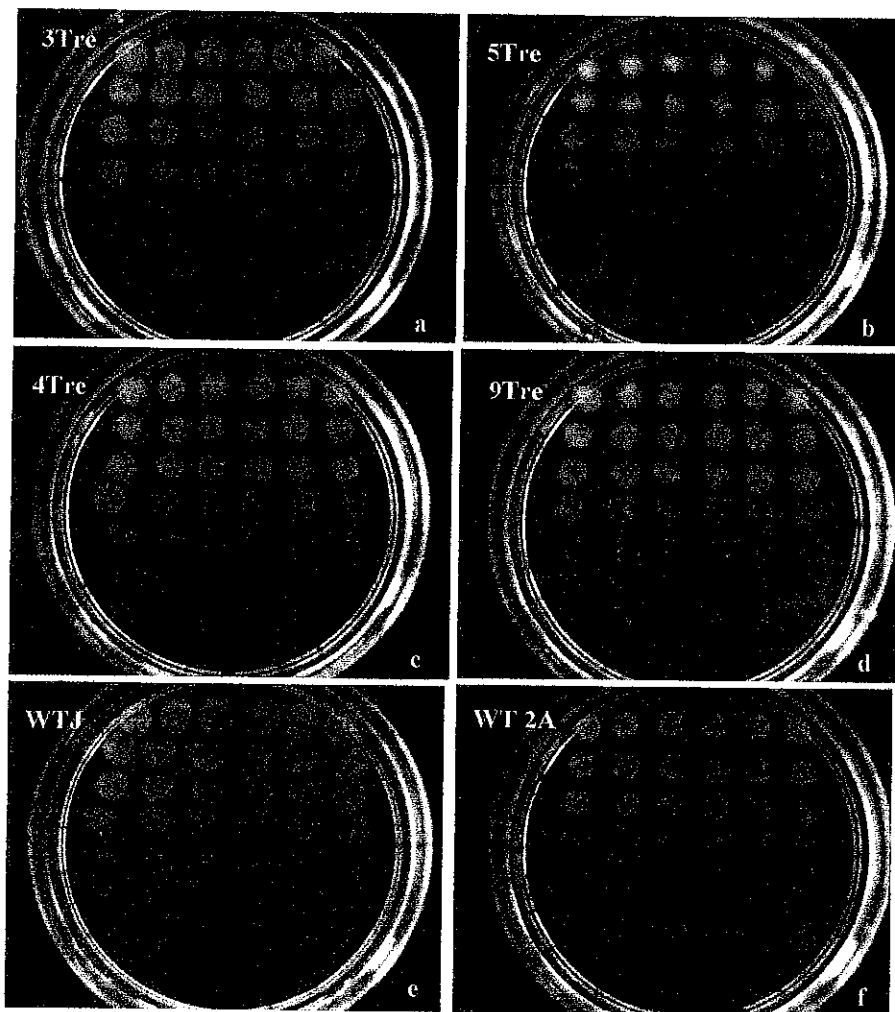


Figura 21. Número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a diferentes diluciones (a) Línea 3Tre, (b) Línea 5Tre, (c) Línea 4Tre, (d) Línea 9Tre, (e) Línea WTJ (testigo), (f) Línea WT2A (testigo) a las 32 horas de incubación desarrolladas a partir de tejidos *in vitro*.

En el número de colonias desarrolladas (Figura 22) se puede apreciar en forma más clara como la condición de transformadas (4Tre y 9Tre) con altos contenidos de trehalosa favorecen el desarrollo de la bacteria mientras que bajos niveles de trehalosa (3Tre y 5Tre) presentan un menor número de colonias, hasta cuatro veces menos. Sin embargo es conveniente hacer la consideración de que estas diferencias se presentan en una

misma dilución 10^{-7} , al estar sumamente diluida las bacterias muestreadas a partir de tejido infectado, las diferencias en cuanto a síntomas visibles no son tan notorias como comúnmente se esperaría.

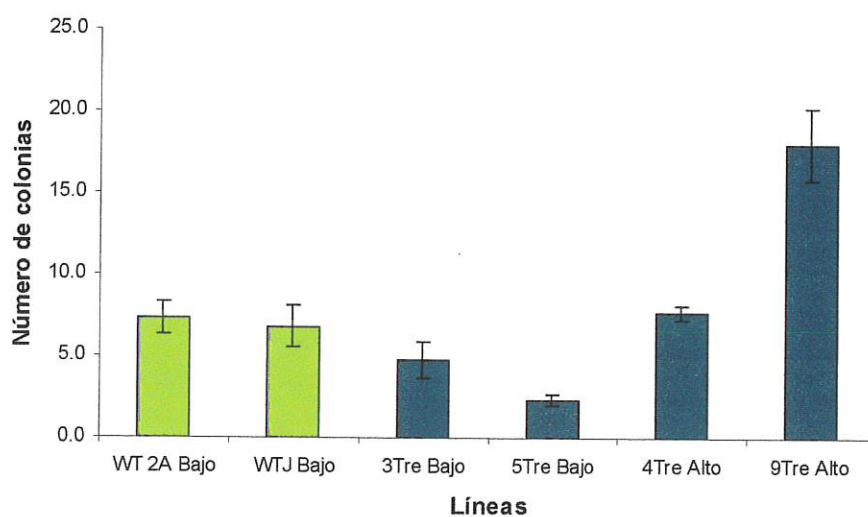


Figura 22. Número de colonias de bacterias de *Pectobacterium carotovorum* en plantas de tabaco *in vitro* a las 24 horas de infección en una dilución de 10^{-7} .

4.2. Transformación con pBIN19::35S::ScTPS1-TPS2::NOS

Al igual que el experimento anterior de transformación los discos foliares de tabaco fueron sometidos a la infección con *Agrobacterium tumefaciens*; y de la misma manera los brotes neoformados a partir de estos, fueron transferidos a los correspondientes medios selectivos, donde aquellos que sobrevivieron sin presentar síntomas de toxicidad fueron separados como posibles transformantes, para continuar con la caracterización molecular.

Como resultado de esta selección se lograron regenerar 20 plantas *in vitro* en medio selectivo con kanamicina de un total de 45 discos de hoja infectados; cada una de estas plantas se consideraron como líneas transgénicas independientes.

4.2.1. Análisis molecular por PCR

La selección de las líneas consideradas como posibles transformantes se llevó a cabo mediante PCR con la finalidad de descartar las falsas transformantes o posibles escapes. Se amplificó por PCR la región correspondiente a NPTII, generando un fragmento de (780 kb) (Figura 23) de 16 líneas seleccionadas solo 11 presentaron la banda correspondiente al gen de selección. Una vez identificadas las líneas transformantes, se procedió a reclasificarlas en un orden consecutivo para los siguientes experimentos.

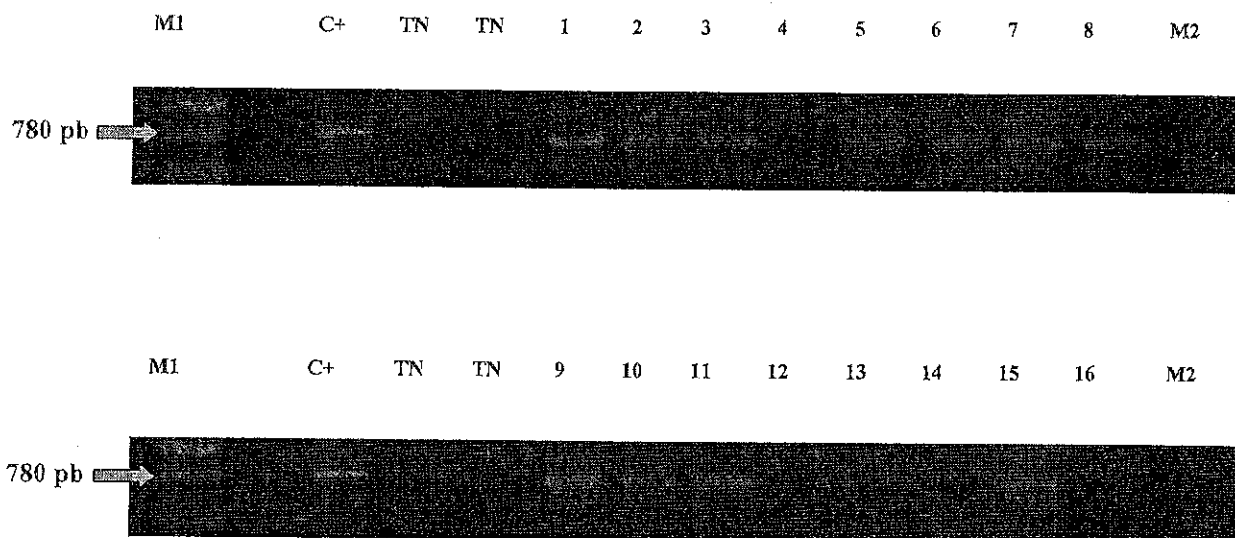


Figura 23: Fragmento amplificado (NPTII), se muestra la comparación de las líneas seleccionadas con el testigo positivo (T+) de las 16 líneas de tabaco sometidas a agroinfección con la construcción pBIN19::35S::ScTPS1-TPS2::NOS.

M1. Marcador de peso molecular Ladder DNA de 1 kb.

T+. Control positivo (Muestra de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* portadora del gen *NPTII*).

1-16. Líneas originadas a partir de brotes neoformados sobre medio de cultivo selectivo con kanamicina (100 mg L^{-1}) y ticarcilina (250 mg L^{-1}).

TN-. Testigo negativo (WT).

M2. Lambda HindII.

4.2.2. Cuantificación de trehalosa

Contando con los mismos valores de la curva patrón de trehalosa utilizados para la construcción con el gen *ScATH1*, en el caso de las líneas obtenidas como transformantes de la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2*, se seleccionaron la totalidad de las líneas obtenidas más un testigo sin transformar, la condición de las 11 líneas y el testigo (WT

ST1), se corroboraron previamente por PCR. En el Cuadro 6 se muestran los valores de la determinación de trehalosa por HPLC.

Cuadro 6. Líneas utilizadas para cuantificar los niveles de trehalosa en tejido foliar.

Líneas	Area1	Area2	Conc. 1	Conc. 2	ng mg-1 peso fresco 1	ng mg-1 peso fresco2	ng mg-1 peso fresco Prom.
WT (ST1)	5066.0000	5195.0000	19.0805	19.5592	173.9536	178.2884	176.1210
1 BI	4795.5000	4532.5000	18.0767	17.1007	139.7818	131.6195	135.7007
2 BI	4275.0000	4380.0000	16.1452	16.5348	132.4940	135.5650	134.0295
3 BI	5530.5000	5269.0000	20.8042	19.8338	165.6478	157.7899	161.7188
4 BI	7413.5000	7273.5000	27.7919	27.2724	222.9105	219.0963	221.0034
5 BI	7544.0000	8557.5000	28.2762	32.0373	211.4271	237.6328	224.5300
6 BI	6274.5000	6450.0000	23.5652	24.2164	175.5781	179.1098	177.3440
7 BI	17091.0000	16025.0000	63.7046	59.7487	536.8400	498.1641	517.5021
8 BI	13031.5000	13511.5000	48.6400	50.4213	272.7800	283.4293	278.1046
9 BI	13202.5000	12460.5000	49.2746	46.5211	429.0869	403.8584	416.4727
10 BI	12320.0000	12232.0000	45.9997	45.6731	453.3305	450.4762	451.9034
13 BI	6283.0000	6006.0000	23.5967	22.5688	177.4188	169.6902	173.5545

Como se puede apreciar en la Figura 25, los niveles de este azúcar varían considerablemente entre las diferentes líneas seleccionadas, es así que encontramos cuatro líneas (1BI, 2BI, 3BI y 13 BI), cuyos valores se encuentran por debajo de los que se reportan para el testigo sin transformar, a su vez encontramos valores muy altos como en el caso de la línea 7BI, misma que acumula casi tres veces más que el testigo, o líneas como la 9BI y 10BI, capaces de acumular más del doble de la cantidad de trehalosa que el testigo. La tendencia indica, en términos generales, que las plantas transgénicas con *TPS1-TPS2* tienden a acumular más trehalosa que el testigo sin transformar.

La línea 7BI (Figura 24), además de presentar los valores más altos en el contenido de trehalosa, esta construcción presenta un fenotipo aberrante con hojas en roseta y aspecto rugoso, presentó además un crecimiento anormal adquiriendo una forma compacta, la situación de su apariencia fuera del fenotipo típico de las plantas de tabaco la descartó

inmediatamente como una línea para futuros trabajos de caracterización ante el ataque de patógenos.

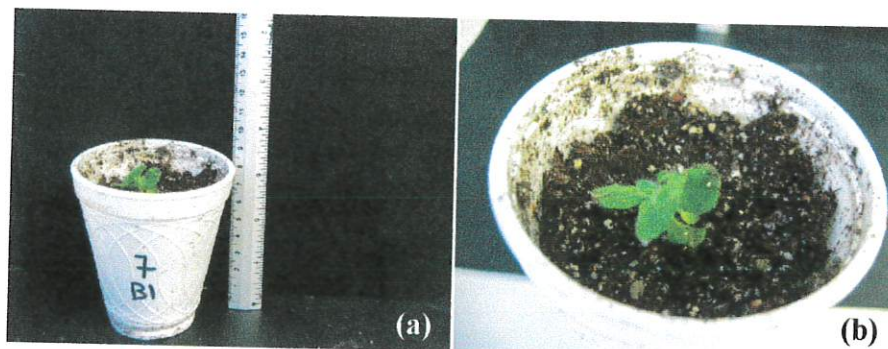


Figura 24. (a) (b). Línea 7BI de tabaco que sobreexpresa la producción de trehalosa con un fenotipo aberrante.

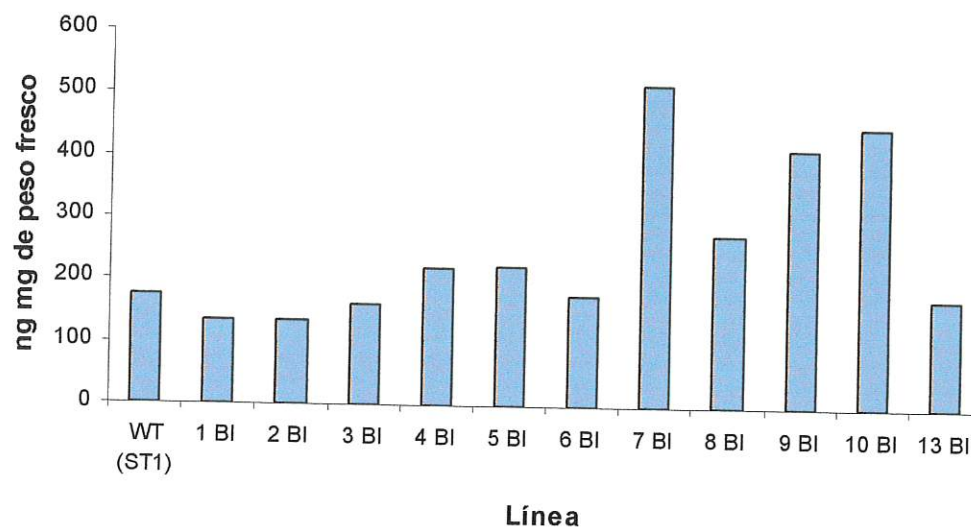


Figura 25. Concentración de trehalosa en nanogramos por miligramo de peso fresco de las líneas obtenidas con la construcción bifuncional *ScTPSI-TPS2*.

4.2.3. Caracterización morfológica de los materiales transgénicos con el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*.

Al igual que con las plantas transgénicas que sobre expresan el gen *ScATH1*, en este caso, fue caracterizada la morfología de las plantas transformadas, comparándolas con un control o testigo no transformado. Lo anterior con la finalidad de determinar en primera instancia si la sobre-expresión de *ScTPS1-TPS2* pudiera inducir aberraciones en la morfología de las plantas.

4.2.3.1. Altura de planta

En ausencia de una fuente de carbono (sin sacarosa), la línea sin transformar (WT) presentó una reducción de crecimiento, sin embargo a los 56 días fue capaz de alcanzar alturas de más de 2 cm en promedio, mientras que las líneas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* fueron incapaces de mantener su desarrollo durante los 56 días que comprendió la evaluación (Cuadro 5A y 6A). La muerte por senescencia de estas plantas se debió a que durante la primera y segunda semanas presentaron un crecimiento acelerado y un mayor desarrollo lo que involucró un gran consumo energético en un periodo muy corto lo que a la larga probablemente produjo el agotamiento de las reservas energéticas endógenas de las plantas transformadas (Figura 26).



Figura 26. Líneas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* y un testigo (WT) desarrolladas *in vitro* sin sacarosa como fuente de carbono en el medio de cultivo a los 56 días de desarrollo.

Como se aprecia en la Figura 27, la altura promedio alcanzada en cada una de las líneas transgénicas es mayor que el control no transformado, cuando se desarrollan en un medio de cultivo con sacarosa, mientras que en ausencia de sacarosa ninguna de las líneas transgénicas puede mantener su desarrollo. En este caso el testigo sin transformar, puede mantener un lento desarrollo suficiente para mantenerse vivo durante más de 56 días.

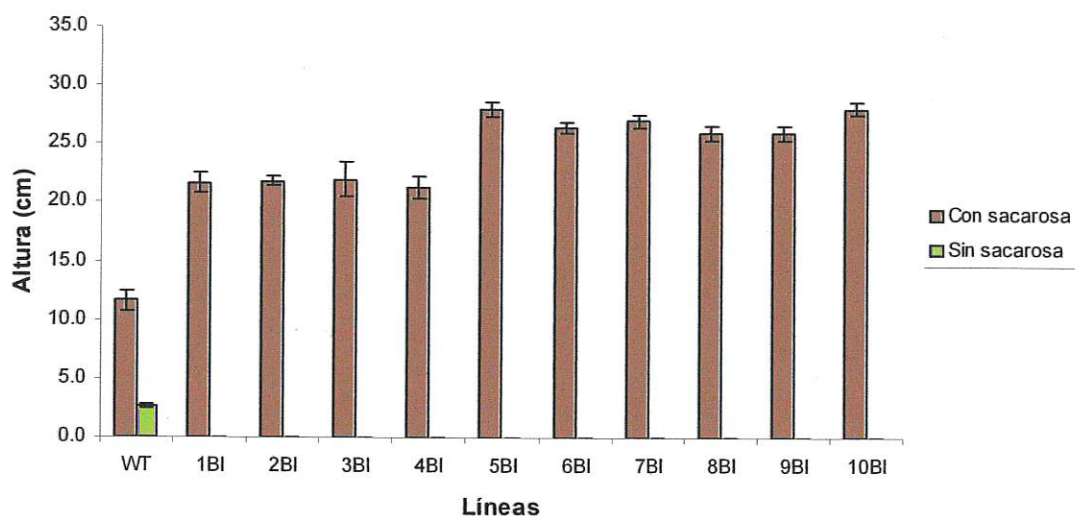


Figura 27. Altura de las plantas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* (NBI) y un testigo (WT), desarrolladas *in vitro* a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.

La apariencia de las líneas transgénicas desarrolladas con sacarosa durante las dos primeras semanas bajo condiciones *in vitro* fue de plantas con entrenudos largos y hojas con coloración verde intensa, pero a partir de la tercera semana la tonalidad de las hojas viró hacia una clorosis evidente, presentándose una apariencia semejante a una hoja en inicio de senescencia, lo que aparentemente se podía interpretar como un envejecimiento prematuro, debido probablemente a una mayor actividad fotosintética.

4.2.3.2. Número de hojas

Al igual que para la variable altura de planta los datos revelan diferencia estadística entre el testigo (planta sin transformar WT), con el resto de las líneas transgénicas (Cuadro 5A y 6A), pero no muestra ninguna diferencia entre líneas transgénicas ya que el número de hojas en promedio en cada una de ellas es muy similar, superior a 30 hojas en todos los casos cuando las líneas transgénicas son desarrolladas en un medio de cultivo con sacarosa 87.6 μM . Las plantas desarrolladas sin sacarosa a los 56 días de evaluación no presentaron hoja alguna, lo que indicó la necesidad de una fuente de carbono para llevar a cabo la brotación de hojas, mientras que el testigo (WT), aún cuando su desarrollo se vio limitado por la falta de una fuente energética, si fue capaz de emitir nuevas hojas alcanzando un promedio de 7 hojas por brote (Figura 28). Al parecer las líneas transgénicas se comportan con un desarrollo acelerado cuando no tienen limitantes de fuente de carbono en el medio de cultivo lo que se traduce en una apariencia de las hojas durante los primeros días con un alto contenido de clorofila ya que su coloración es muy verde, pero a medida que continúa el desarrollo de las plantas las hojas continúan su proceso de madurez sin detenerse lo que las lleva rápidamente a

presentar síntomas prematuros de senescencia, esta característica es atribuible a que la construcción empleada incluyó un promotor constitutivo (35 S), el cual es el responsable de que la fusión bifuncional *TPS1-TPS2* se esté expresando en todo momento, dando muy probablemente como resultado un envejecimiento irreversible de las plantas portadoras de este gen. La condición de no desarrollar hojas de las plantas transgénicas explica las diferencias estadísticas encontradas al compararlas con las plantas sin transformar (Cuadro 5A y 6A).

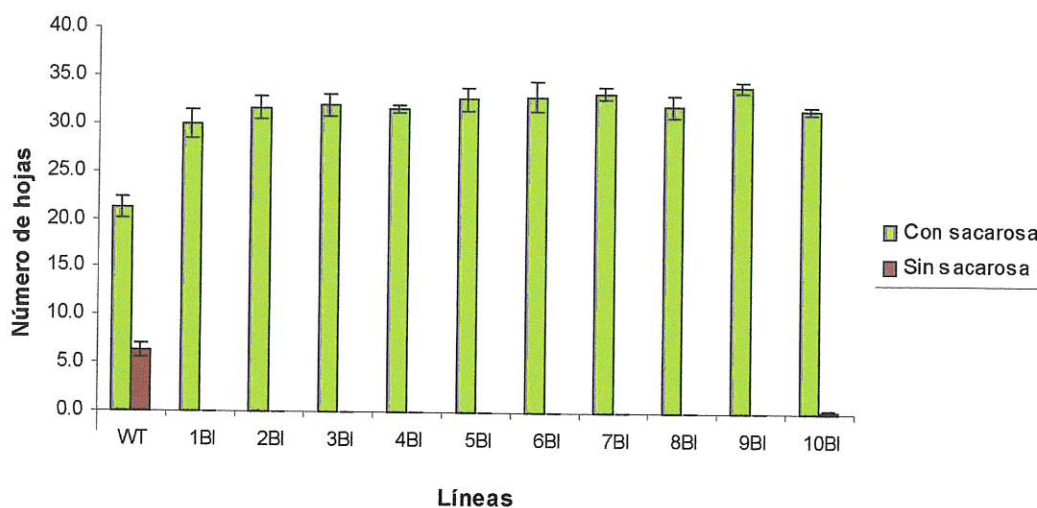


Figura 28. Número de hojas de las plantas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* (NBI) y un testigo (WT), desarrolladas *in vitro* a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.

4.2.3.3. Número de raíces

En la Figura 29 se muestra esquemáticamente como la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, propició un gran número de raíces superando las 50, a los 56 días de cultivo bajo condiciones *in vitro*, ofreciendo diferencias estadísticas de las líneas transgénicas

con respecto al testigo (Cuadro 5A y 6A), donde las líneas transgénicas presentaron el mayor número de raíces por explante. Bajo la condición sin sacarosa únicamente el testigo sin transformar fue capaz de desencadenar el proceso rizogénico dando un promedio de 15 raíces en promedio por explante, lo que claramente es estadísticamente diferente de cada una de las líneas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* donde la neoformación de raíces se vio detenida por completo al carecer los explantes de una fuente constante de carbono exógena para sostener este complejo proceso (Cuadro A 27 y A 28).

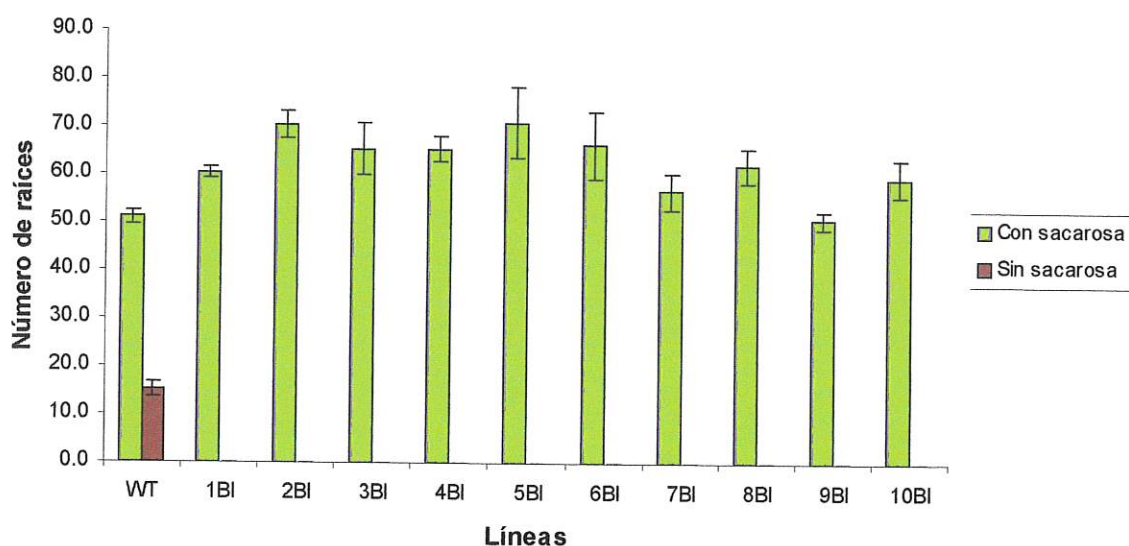


Figura 29. Número de raíces de las plantas transgénicas con *TPS1-TPS2* y un testigo (WT), desarrolladas *in vitro* a los 56 días de desarrollo en medio de cultivo con sacarosa al 3 % y sin sacarosa como fuente de carbono.

4.2.4. Floración prematura *in vitro*

Dentro de las características más destacables de las líneas transgénicas con el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* fue la prematura conversión del ápice vegetativo a

reproductivo, incluso bajo condiciones *in vitro*. Como se aprecia en las Figuras 30 (a) y (b) es evidente la presencia de botones florales en microplántulas de 30 días de desarrollo, aparentemente estos botones florales presentan estructuras completas sin deformaciones o estructuras incompletas. Este hecho nos obliga a pensar en la función de los azúcares como señales en la transición del ápice de vegetativo a reproductivo. Los dos casos de floración prematura *in vitro* corresponden a dos líneas cuyos contenidos iniciales de trehalosa fueron más del doble (9BI y 10BI), en comparación con el testigo (planta sin transformar).



Figura 30. (a) Formación prematura de botones florales en microplántulas de tabaco de la línea 10BI a los 30 días de desarrollo.(b) Estructuras florales completas en botones florales prematuros *in vitro* a los 30 días de desarrollo.

4.2.5. Floración prematura en plantas aclimatadas

Con el claro objetivo de observar el fenotipo de algunas líneas transgénicas que habían presentado el desarrollo prematuro de botones florales, algunos ejemplares representativos de estas líneas, se sometieron al proceso de aclimatación para analizar su comportamiento y desarrollo en su estado de planta adulta, sin embargo esto no fue del

todo posible ya que la línea 10BI nuevamente dio lugar a la formación de flor en un periodo de tiempo corto, en este caso la conversión del ápice fue claramente visible a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación (Figuras 31 (a) y (b)) donde el desarrollo floral continuó hasta llegar a la formación de semillas.

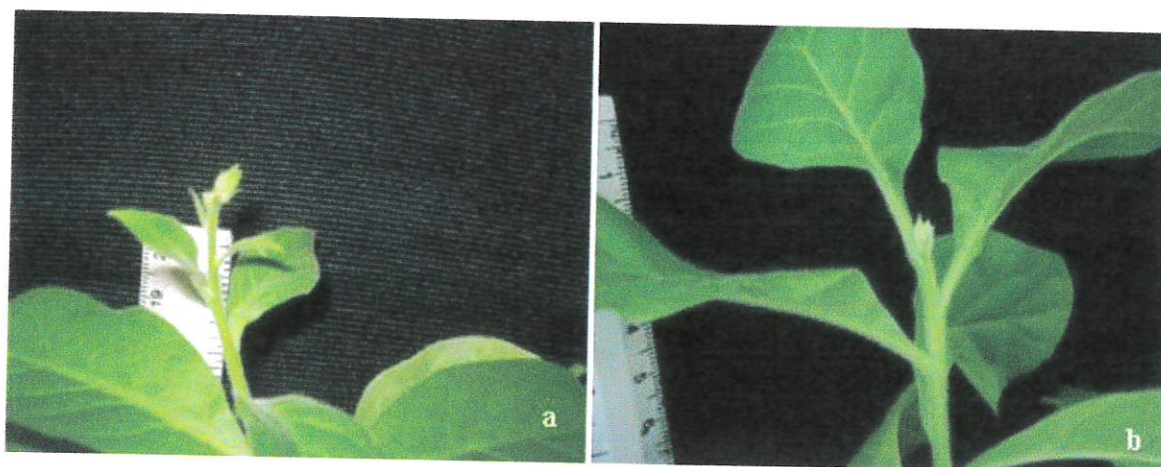


Figura 31. (a), (b) Desarrollo del ápice reproductivo en la línea 10BI transgénica con *TPS1-TPS2* a los 30 días de desarrollo como plántula.

Similar a lo ocurrido bajo condiciones *in vitro* las flores que se desarrollaron en las líneas transgénicas como se aprecia en la Figura 32 (b) y (c), presentan estructuras completas y bien desarrolladas sin la menor presencia de aberraciones, lo que permitió su correcto desarrollo y posterior formación de semillas.

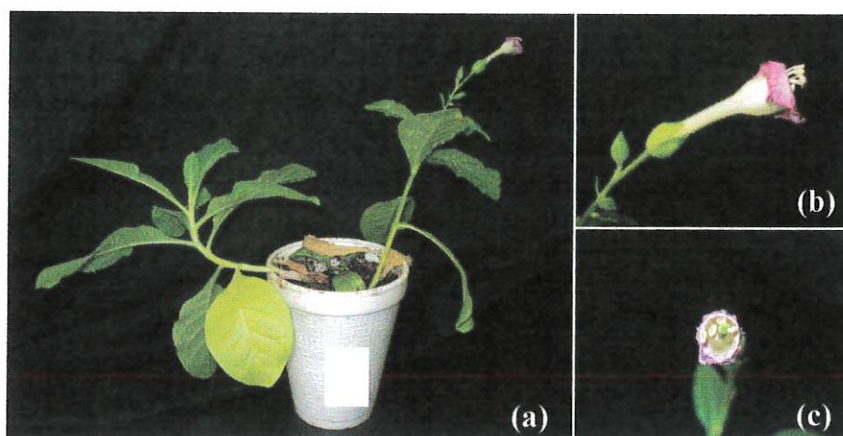


Figura 32. (a) Desarrollo floral en la línea 13BI transgénica con *TPS1-TPS2* a los 30 días de desarrollo como plántula. (b) Flor prematura obtenida después de 30 días de desarrollo. (c) estructuras florales completas en flores prematuras de la línea 13BI transgénica con *TPS1-TPS2*.

4.2.6. Prueba de germinación de semillas de las líneas portadoras del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*

Debido a la presencia de una prematura floración y su inmediata fecundación, cabía la posibilidad de que las semillas formadas en tan corto periodo de tiempo podrían no haberse correctamente desarrollado, lo que podría dar como resultado la presencia de semillas no viables. Para corroborar o refutar lo anterior se planteó una pequeña y sencilla prueba de viabilidad, sometiendo las semillas colectadas de tabaco de las líneas 13BI y 14BI a una desinfección superficial con hipoclorito de sodio, para posteriormente ser establecidas bajo condiciones *in vitro* en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y promover de esta manera su germinación.

Como se muestra en la Figura 33 (a) más del 90 % de semillas obtenidas de la línea 13BI germinaron dando lugar a una gran cantidad de plántulas. La misma situación se

presentó para la línea 14BI (Figura 33 (b)), donde más del 80 % de las semillas sometidas a germinación *in vitro* germinaron en un periodo promedio de 5 días.

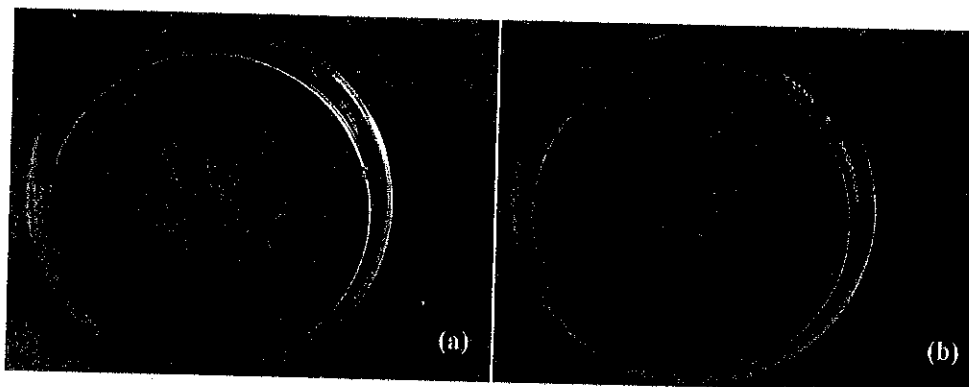


Figura 33. (a) Plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de las semillas colectadas de la línea transgénica de tabaco 13BI. (b) Plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de la línea transgénica de tabaco 14BI; ambas portadoras del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* a los 5 días de incubación.

La viabilidad de las semillas formadas prematuramente nos permite inferir que la presencia del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* en algunas líneas transgénicas acelera el proceso de floración, si este es comparado con el de las plantas sin transformar donde a un mismo número de días de desarrollo, las plantas sin transformar continúan sin efectuar la transición del ápice de vegetativo a reproductivo.

Complementariamente este hecho (formación prematura de semillas) no afecta la capacidad germinativa de las semillas que bajo estas condiciones se forman.

4.2.7. Prueba de regeneración *in vitro* de las líneas de tabaco transgénicas con *ScTPS1-TPS2*

Como se mostró anteriormente, las plantas transformadas con *ScTPS1-TPS2* mostraron diferencias en la morfología y el desarrollo respecto al testigo al creerse en medio MS con sacarosa. Dadas estas diferencias, se consideró pertinente evaluar la respuesta de estas mismas plantas a otra fuente de carbono, en este caso la trehalosa.

Como se aprecia en la Figura 34, las líneas transgénicas fueron incapaces de desencadenar algún proceso organogénico en ausencia de una fuente de carbono, no así el caso del testigo (WT) ya que bajo estas mismas condiciones dio lugar en promedio a dos brotes por explante. De la misma manera donde la fuente de carbono fue trehalosa 10 mμ (T1), el testigo dio lugar a la neoformación de brotes con un promedio de 5 por explante; mientras que nuevamente ninguna de las líneas transgénicas presentó formación alguna de brotes bajo condiciones *in vitro*. Los explantes son incapaces de regenerar cuando la cantidad de trehalosa en el medio es de 300 mM (T5) a diferencia del testigo (WT). En cuanto al resto de los tratamientos 50 mM (T2), 100 mM (T3), 200 mM (T4), presentan respuestas organogénicas diferentes en cada una de las líneas transgénicas.

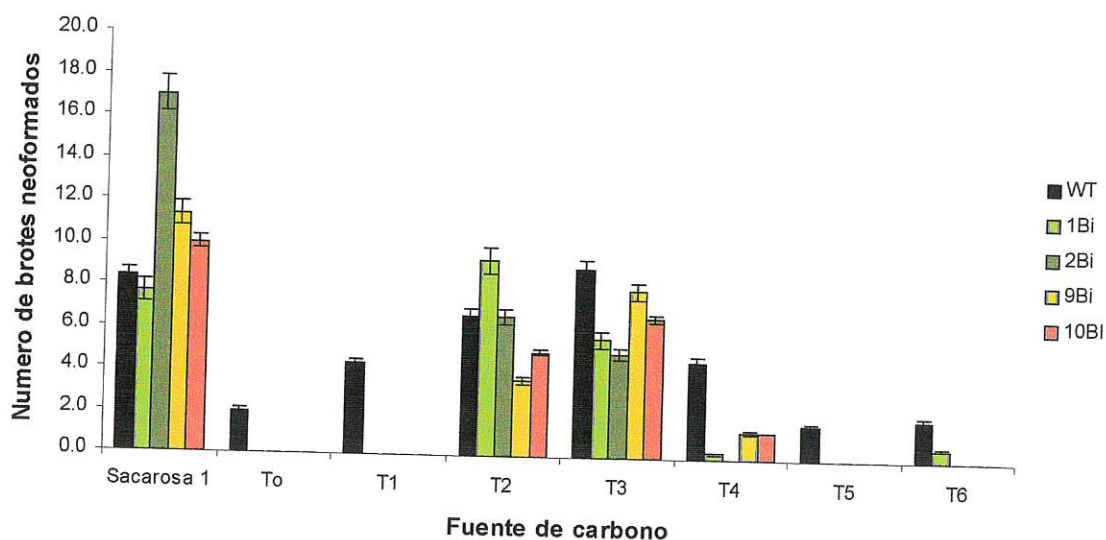


Figura 34. Número de brotes neoformados a partir de discos foliares de plantas de tabaco transgénicas con *ScTPS1-TPS2* y un testigo sin transformar (WT), en medio de cultivo con trehalosa y sacarosa como fuentes de carbono.

4.2.8. Crecimiento de las líneas transgénicas con *TPS1-TPS2* en plantas aclimatadas

La presencia del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* con el promotor constitutivo 35S, confiere a las plantas la capacidad de crecer a mayor velocidad como resultado inherente a una mayor acumulación del azúcar trehalosa.

Como se aprecia en la Figura 35; 9 de las 10 líneas transgénicas con *ScTPS1-TPS2*, superan en altura a la planta testigo sin transformar (WT), no existe correlación alguna entre el contenido de trehalosa inicial cuantificado por HPLC y la altura de planta alcanzada a los 30 días de desarrollo bajo condiciones *in vitro*.

En cuanto al análisis estadístico de los datos de altura a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación estos reflejan diferencias entre líneas transgénicas así como con respecto al testigo, (Cuadro 5A y 6A). Analizando la Figura 35 se puede observar que existen valores promedio en líneas transgénicas hasta cuatro veces mayores a los que se presentan en el testigo, como lo es en la línea 1BI, con una altura promedio de 14.8 cm en comparación con la altura promedio del testigo de apenas superior a los 4 cm promedio.

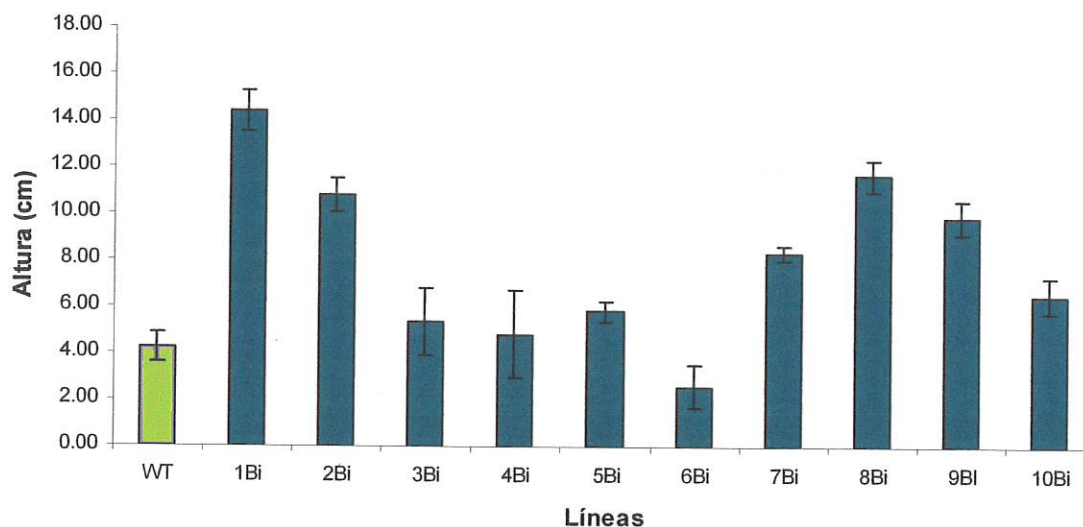


Figura 35. Altura de las plantas transgénicas *ScTPS1-TPS2*, y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.

En la Figura 36. Se observa que el testigo (WT) presentó un crecimiento menor en comparación con cada una de las líneas transgénicas *ScTPS1-TPS2*. La misma figura también nos permite exponer como la morfología de las plantas aclimatadas a los 30 días de desarrollo, es diferente de las líneas transgénicas en comparación con la del testigo. Las hojas adquirieron una forma más lanceolada en las plantas transgénicas y suelen presentar un incipiente amarillamiento indicativo de una senescencia acelerada; además

los entrenudos son más largos, sobre todo el terminal, el cual tiende en todos los casos a alargarse y adelgazarse lo que en las líneas con alto contenido de trehalosa antecede a la formación de botones florales, y posteriormente a la formación de semillas.

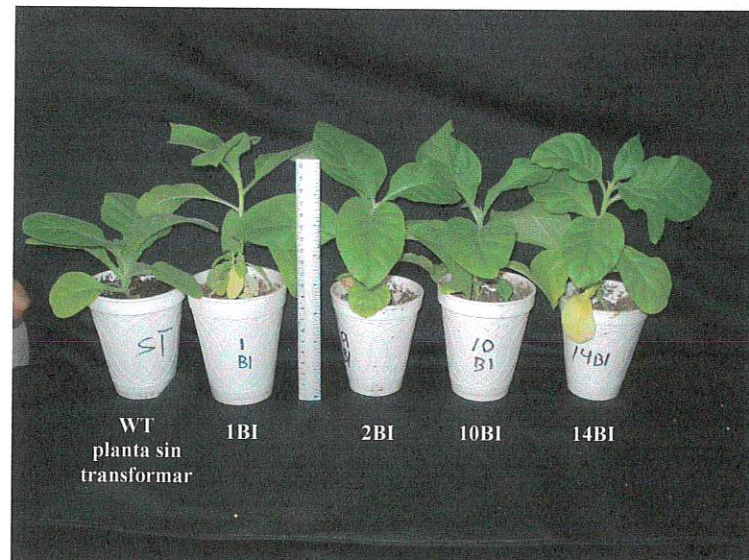


Figura 36. Vista panorámica de las líneas transgénicas de tabaco portadoras del gen *ScTPS1-TPS2* (1BI, 2BI, 10BI, 14BI) y un testigo sin transformar (WT) a los 30 días posteriores al proceso de aclimatación.

4.2.9. Pruebas de patogenicidad *ex vitro* de plantas jóvenes de tabaco

Las líneas transgénicas 2BI, 9BI y 10BI, fueron aclimatadas, y a los 30 días se inocularon con 10 μ L de solución bacteriana de *Pectobacterium carotovorum* desarrollada en un medio líquido LB a una absorbancia de 1.0 a 600 nm; bajo el mismo procedimiento que para las plantas transformadas con *ScATH1* se propiciaron las óptimas condiciones para la invasión de la bacteria al tejido vegetal. Además de las

líneas transgénicas con *ScTPS1-TPS2*, se emplearon como testigos en cada caso una planta sin transformar (WT) de la misma edad que las transgénicas. Para complementar la comparación del grado de invasión de la bacteria se utilizó además la línea 4Tre (trehalasa) con el mismo número de días de desarrollo que el resto de las plantas evaluadas; misma que en experimentos anteriores se había comportando como susceptible al ataque de la bacteria bajo condiciones *in vitro* (Figura 37 (a), (b), (c), (d), (e)).

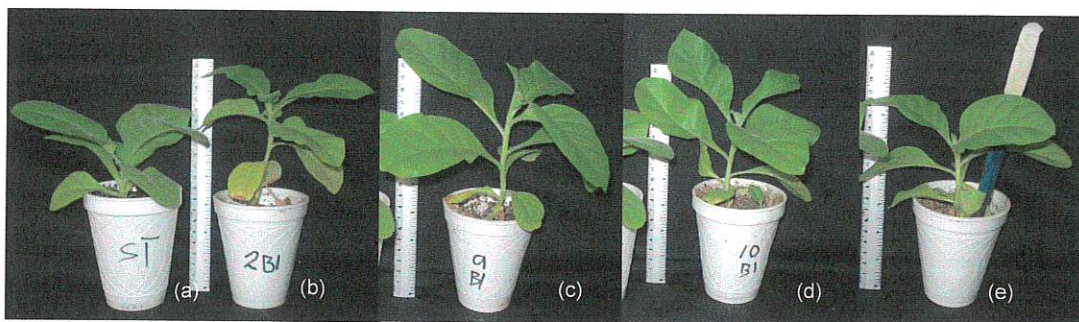


Figura 37. (a) Testigo sin transformar (WT), (b) Línea 2BI, (c) Línea 9BI, (d) Línea 10BI transgénicas con *ScTPS1-TPS2*. (e) Línea 4Tre con *ScATH1*. antes de ser inoculadas con la bacteria *Pectobacterium carotovorum*.

Como puede observarse en la Figura 38. (a), (b) y (c) después de 7 días de haber realizado la inoculación las tres líneas transgénicas con el gen *ScTPS1-TPS2* (NBI) las tres se comportaron como tolerantes al ataque de la bacteria, en comparación con las plantas testigo, que para ese momento habían muerto por el ataque de la bacteria. Este fenotipo no se correlaciona con el contenido inicial cuantificado de trehalosa. En la Figura 38, (e) y (f) se puede apreciar como en el lugar donde se realizó la incisión para colocar la solución bacteriana la planta respondió con una rápida cicatrización del área lesionada, lo cual probablemente limitó la invasión de la bacteria.

En contraparte a las líneas transgénicas 2BI, 9BI y 10BI, la portadora de *ScATH1* (4Tre) mostró síntomas de la infección bacteriana a las 48 horas posteriores a la inoculación, llegando hasta su total muerte a los 7 días después de la inoculación bacteriana (Figura 38 (d) fenómeno que repitió exactamente igual la planta testigo sin transformar al morir por efecto de la invasión de la bacteria fitopatógena en el mismo número de días.

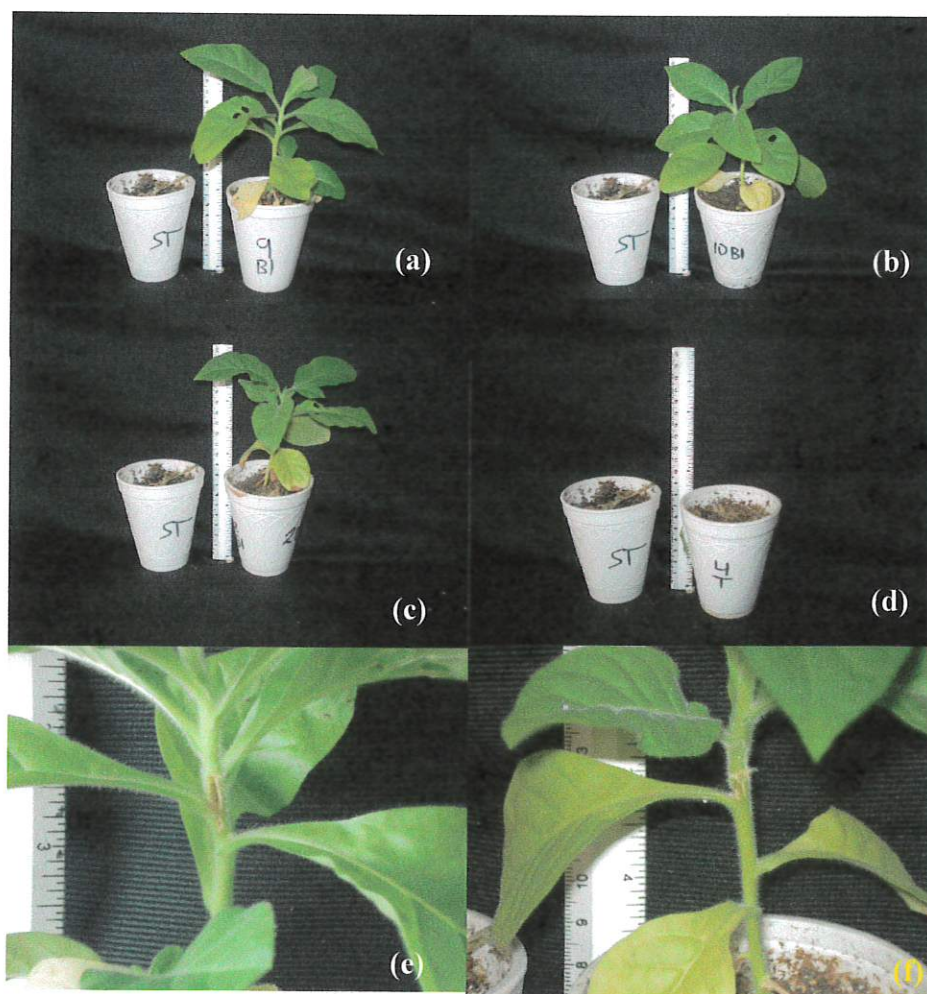


Figura 38. (a) Línea 9BI, (b) Línea 10BI, (c) Línea 2BI transgénicas con *ScTPS1-TPS2* a los 7 días posteriores a la inoculación con la bacteria *Pectobacterium carotovorum*. (d) Línea 4Tre con *ScATH1*. (e), (f) Fenómeno de cicatrización en el área lesionada donde se inoculó la bacteria en la línea 10BI.

4.2.10. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Para llevar a cabo la prueba de patogenicidad se seleccionaron cuatro líneas dos de ellas con alto contenido de trehalosa (9BI y 10BI) y dos más con bajo contenido de trehalosa (1BI y 2BI) para evaluar su fenotipo frente a la presencia de la bacteria fitopatógena. Los datos obtenidos nos ofrecen la posibilidad de correlacionar un alto contenido de trehalosa con una menor cantidad de bacterias presentes en el tejido muestreado.

En la Figura 39, se muestra claramente como las líneas con bajo contenido de trehalosa 9BI y 10BI presentan los valores más bajos en cuanto al número de colonias desarrolladas a partir de tejidos infectados. El testigo (WT) presentó valores muy similares a los de las líneas con alto contenido de trehalosa en cuanto a las colonias desarrolladas en medio LB, pero a su vez presentó valores mayores que las líneas con bajo contenido de trehalosa. En esta prueba se manejaron dos testigos ambos sin transformar pero diferentes uno del otro por la edad de la planta *in vitro*, así el WT2A correspondió a una planta con tres meses de desarrollo *in vitro*, y el WTJ a una plántula de tres semanas de desarrollo *in vitro*, sin embargo al realizar la cuantificación de las colonias la cantidad de estas fue muy similar no ofreciendo diferencias estadísticas al variar el estado de desarrollo de las plantas sin transformar (Cuadro 7A y 8A).

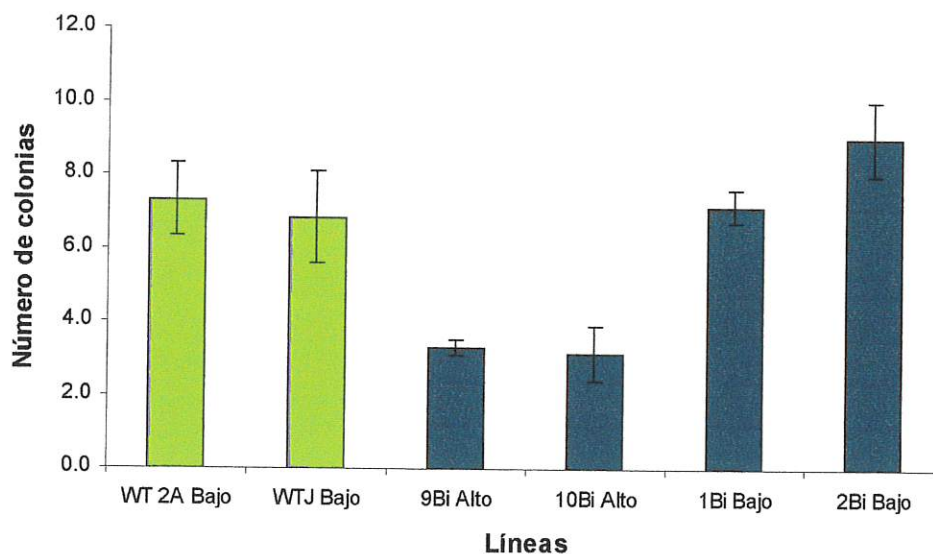


Figura 39. Número de colonias de bacterias de *Pectobacterium carotovorum* en plantas de tabaco a las 24 horas de infección en una dilución de 10^{-7} .

4.2.11. Cuantificación de la infección bacteriana

Como se puede ver en la Figura 40, las diferencias entre el número de colonias bacterianas de las diferentes líneas transgénicas y los testigos se encuentran en el mismo número de diluciones 10^{-7} , lo que en términos estrictos representaría diferencias mínimas, en cuanto a la presencia de esta bacteria en el tejido vegetal. Sin embargo aunque la diferencia sea aparentemente mínima, a nivel visual esta diferencia se traduce en plantas con apariencia de menores daños de en cuanto a marchitez y/o pudrición blanda; ambos síntomas clásicos del ataque de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*. Parece que el conteo bacteriano en este caso no refleja diferencias sustanciales que permitan explicar la resistencia al patógeno observada en los experimentos *ex vitro*.

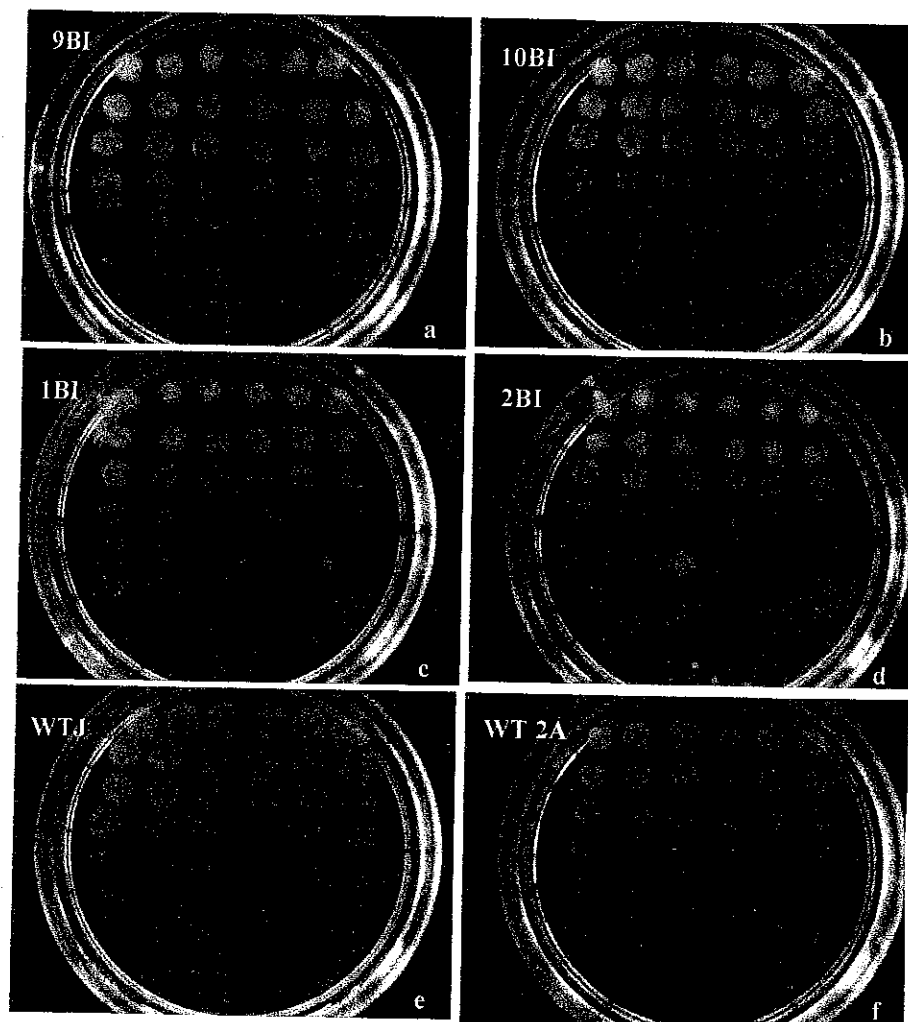


Figura 40. Número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a diferentes diluciones (a) Línea 9BI, (b) Línea 10BI, (c) Línea 1BI, (d) Línea 2BI, (e) Línea WTJ, (f) Línea WT2A a las 32 horas de incubación.

4.2.12. Pruebas de tolerancia a estrés hídrico

Considerando que los efectos de un periodo de sequía son evidentes cuando las plantas muestran síntomas de deshidratación y no son capaces de recuperarse aún y cuando sea restituida el aporte de agua (marchitez permanente), cada una de las líneas transgénicas y el testigo WT, se llevaron a capacidad de campo en sus respectivos contenedores para

posteriormente suspender totalmente el agua durante 40 días. Como se aprecia en la Figura 41 (a), a los 7 días sin riego, el testigo muestra síntomas evidentes de deshidratación, mientras que las líneas transgénicas 9BI, 13BI y 14BI, (todas con contenidos superiores de trehalosa con respecto al testigo), se aprecian turgentes sin síntomas aparentes de deshidratación. A los 14 días las tres líneas transgénicas presentan ya, síntomas claros de deshidratación, en comparación el testigo muestra síntomas aún más marcados de pérdida de agua. (Figura 41 (b)). Al cabo de tres (Figura 41 (c) y posteriormente cuatro semanas (Figura 41 (d)), la apariencia tanto de las líneas transgénicas como del testigo, es de una turgencia muy disminuida, una importante marchitez y la senescencia prematura de las hojas basales en el caso de las líneas transgénicas y la senescencia total en el caso del testigo sin transformar.

Una vez transcurridos los 40 días sin aporte de agua, el sustrato de cada una de las líneas fue nuevamente llevado a capacidad de campo para rehidratar cada una de las plantas en la Figura 41 (e) y (f) se aprecia como las hojas cercanas al ápice terminal de las líneas transgénicas 9BI, 13BI y 14BI, empezaron a recobrar una apariencia semiturgente además de una coloración verde; mientras que las hojas de la plantas testigo sin transformar (ST), no mostraron algún síntoma de recuperación aparente.

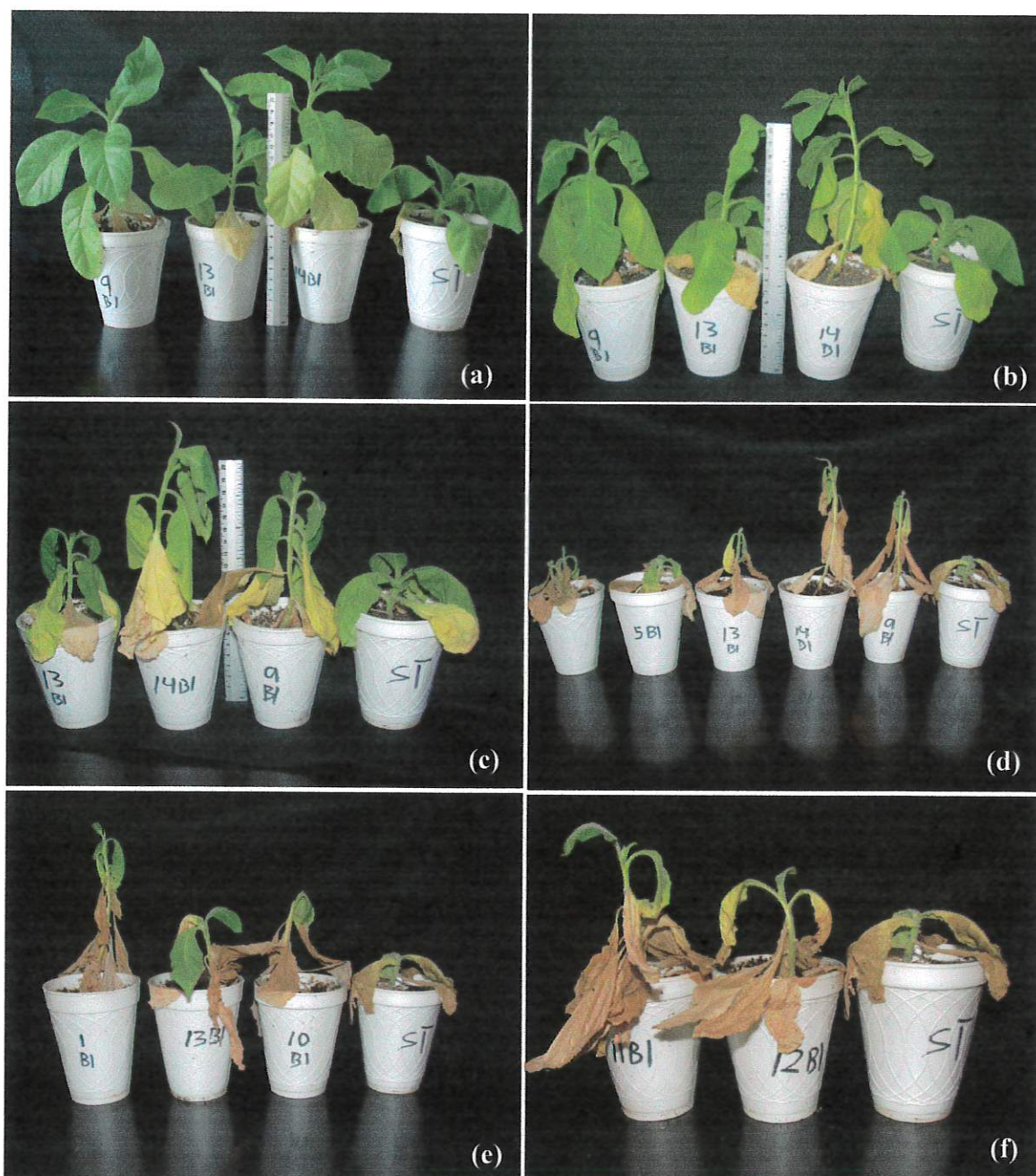


Figura 41. (a) Tres líneas transgénicas con el gen bifuncional *Sc TPS1-TPS2* y un testigo sin transformar a los 7 días sin riego. (b) A los 14 días, (c) A los 21 días, (d) A los 28 días sin riego. (e) Tres líneas transgénicas con el gen bifuncional *Sc TPS1-TPS2* y un testigo sin transformar una vez reanudado el riego. (f) Dos líneas transgénicas con el gen bifuncional *Sc TPS1-TPS2* y un testigo sin transformar una vez reanudado el riego.

4.2.13. Cuantificación de la pérdida de humedad

Además de la prueba de estrés hídrico fue necesario llevar a cabo una prueba de pérdida de humedad a flujo de aire constante donde se evaluó el comportamiento de cuatro líneas transgénicas; dos con alto contenido de trehalosa (9BI y 10BI) y dos más con un contenido menor al reportado para el testigo (1BI y 2BI). Como se puede apreciar en la Figura 42; transcurridos 350 minutos el testigo perdió 89 % de humedad bajo un flujo de aire constante en la campana de flujo laminar; mientras que líneas transgénicas como la 10BI, solo pierden 58.16 % de agua y líneas como la BI9 el 76.2 %.

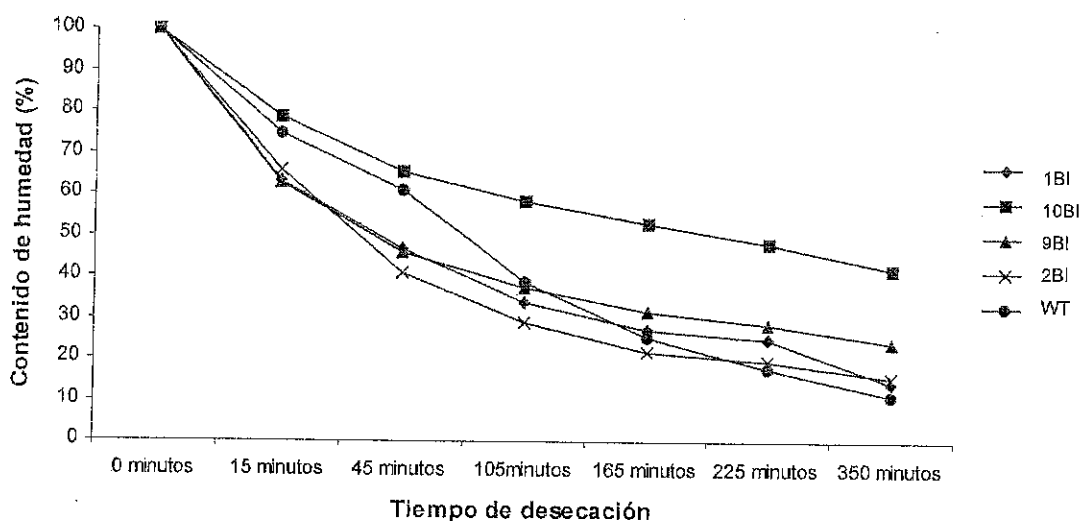


Figura 42. Curva de deshidratación de lámina foliar de cuatro líneas transgénicas con *Sc TPS1-TPS2* y un testigo (WT), a lo largo de cinco horas con flujo de aire constante.

De lo anterior se puede deducir que la presencia de trehalosa en cantidades elevadas en el tejido vegetal de tabaco permite una mayor retención de agua en plantas portadoras del gen *ScTPS1-TPS2*; lo anterior puede corroborarse si se analiza el comportamiento de

las líneas 1BI y 2BI, las cuales perdieron 85.97 % y 84 % de agua respectivamente bajo las mismas condiciones. El aumento en la cantidad de agua perdida por deshidratación se correlaciona positivamente con una menor cantidad de trehalosa en el tejido vegetal. A su vez cada una de las líneas transgénicas presentan valores menores en el porcentaje de humedad perdida que el testigo WT (planta sin transformar). Dado el comportamiento de perdida de agua que se presenta en la Figura 42, es evidente que la presencia del transgén previene la pérdida acelerada de agua en las hojas de tabaco.

5. DISCUSIÓN

5.1. Modificaciones fenotípicas de las plantas transgénicas

5.1.1. Variación en los niveles de trehalosa en las plantas genéticamente modificadas

Mediante HPLC se determinó la cantidad de trehalosa total presente en hojas de tabaco tanto en las líneas transgénicas con *ScATH1* como en las portadoras del gen bifuncional *Sc TPS1-TPS2*. En el primer caso es decir las que sobreexpresan trehalasa ácida (*Sc ATH1*) los niveles de trehalosa en los tejidos seleccionados superaron el valor que arrojó el testigo (WT ST1) de 176.1210 ng mg⁻¹ de peso fresco, en 8 de las 10 líneas transgénicas seleccionados por al menos 16.1592 ng mg⁻¹ de peso fresco de trehalosa y en dos líneas se presentan valores muy cercanos al testigo sin transformar (Cuadro 4, Figura 11). Teóricamente la respuesta que se esperaba era que una mayor cantidad de la enzima trehalasa ácida no afectara, o redujera el contenido de trehalosa extracelular lo cual al realizar la cuantificación total mediante HPLC tendría que verse reflejado en niveles por debajo del control sin transformar; atribuyendo esta condición a la sobreexpresión de la enzima *ScATH1* y su acción degradativa a nivel extracelular o periplasmática (Jules *et al.*, 2004). La presencia de esta enzima a nivel extracelular; ha sido reportada previamente por Aeschbacher *et al.* (1999), donde mencionan que se logró estimar la actividad de trehalasa en un cultivo en suspensión de soya (*Glycine max* L.), en este experimento se detectó más del 80 % de la actividad de la proteína GMTRE1 (que codifica la trehalasa activa en los nódulos de soya (*Glycine max* L.)), en el medio, sugiriendo que la proteína es secretada por la célula. Otro experimento relevante que

sustenta la presencia y acción de la trehalasa ácida a nivel extracelular lo ofrecen Müller *et al.* (2001), quienes afirman que en *Arabidopsis*, la mayor actividad de la trehalasa se ha detectado en flores maduras y en menor medida en hojas, tallos y raíces. Un dato interesante es que la expresión del cDNA de gen *AtTRE1* de la trehalasa de *Arabidopsis* en una mutante *Scath1* de *Saccharomyces cerevisiae*, rescató el fenotipo inviable para desarrollarse en presencia de trehalosa. La levadura posee una trehalasa citoplásmica (Nth1) y una vacuolar o extracelular (Ath1). La complementación de la mutante *Scath1* por *AtTRE1* de *Arabidopsis*, sugiere que la proteína también se secreta extracelularmente, confirmando los resultados obtenidos con *GMTRE1* de la soya Aeschbacher *et al.* (1999). Sin embargo, hasta ahora no está claro cuál podría ser el significado fisiológico de secretar a la trehalasa al espacio extracelular en la célula vegetal. En relación a la localización de la trehalasa ácida Jules *et al.* (2004) reportaron que más del 90 % de la actividad de Ath1p es extracelular, por lo cual esta enzima actuando a nivel extracelular no afectaría los contenidos citoplasmáticos de trehalosa; en relación a esto es conveniente mencionar que en cuanto al papel fisiológico de la trehalasa ácida (*ATH1*) en la levadura; se sabe que esta se encuentra dentro de las vacuolas ya que su actividad es máxima a un pH ácido (4.5) (San Miguel y Argüelles, 1994) en *S. cerevisiae* y *Candida utilis* (d'Enfert y Fontaine, 1997) y que de acuerdo a autores como Huang *et al.* (2007), la mayor actividad de esta enzima se ubica en el espacio periplasmático, a donde llega a través de la vía de secreción *MVB* (*Multi Vesicular Body*).

De acuerdo con Jules *et al.* (2004), los niveles intracelulares de trehalosa no se ven afectados por la pérdida o delección de *ATH1*, supuestamente porque la localización

vacuolar de esta enzima previene su acción sobre la trehalosa almacenada en el citoplasma. Pero al realizar la sobreexpresión de *ATH1* de *Saccharomyces cerevisiae* probablemente esta condición podría cambiar. Este supuesto se constató en el desarrollo de esta investigación, donde no solo los niveles de trehalosa no se abatieron, sino que además los niveles de trehalosa total se incrementaron en ocho de las 10 líneas transgénicas. En la Figura 43 se muestra un modelo hipotético propuesto para explicar la biosíntesis de trehalosa en plantas genéticamente modificadas con *ScATH1*. En este modelo se representa la acción de la proteína heteróloga (Trehalasa ácida) en una típica célula vegetal, donde la presencia de la proteína producto de la inserción del gen *ScATH1*, es secretada por la vía MVB hacia afuera del citoplasma donde esta enzima lleva a cabo la hidrólisis de trehalosa presente en el espacio periplasmático y/o en la pared de la célula, descomponiéndola en dos moléculas de glucosa. Se ha estimado que más del 90 % de esta enzima es la que sale de la célula (Jules *et al.*, 2004), el resto pasa a la vacuola probablemente a través de la misma vía para ser almacenada o probablemente degradada. En este hipotético modelo se plantea la posibilidad de que la misma condición heteróloga de la proteína le provea la capacidad de que una pequeña porción de esta enzima permanezca en el citoplasma, hidrolizando parte de la trehalosa citoplasmática, fraccionándola en sus dos moléculas de glucosa, el aumento de glucosa en el citoplasma por la acción de esta enzima podría activar a los genes involucrados en la biosíntesis de trehalosa, aumentando la cantidad citoplasmática de este disacárido. Se sabe que en *Arabidopsis*, la adición exógena de glucosa inhibe la transcripción del gen *AtTPS1* (Avonce *et al.*, 2004). Sin embargo, la glucosa entra en la célula y de inmediato es transformada en glucosa 6-fosfato por la hexocinasa 1 (*AtHXK1*) reprimiendo y activando numerosos genes mediante esta vía (Rolland *et al.*, 2002). No se sabe si la

glucosa intracelular liberada por la hidrólisis de la trehalosa por *ScATH1*, a diferencia de la glucosa 6-fosfato pudiera estar produciendo un efecto diferente sobre la transcripción de genes como *AtTPS1*, lo cual podría ser elucidado mediante experimentos de RT-PCR para estimar la transcripción de *AtTPS1* en las plantas transgénicas. La glucosa regula, vía *AtHXK1* una gran cantidad de genes, muchos de los cuales se relacionan con el metabolismo de carbono (Rolland *et al.*, 2002).

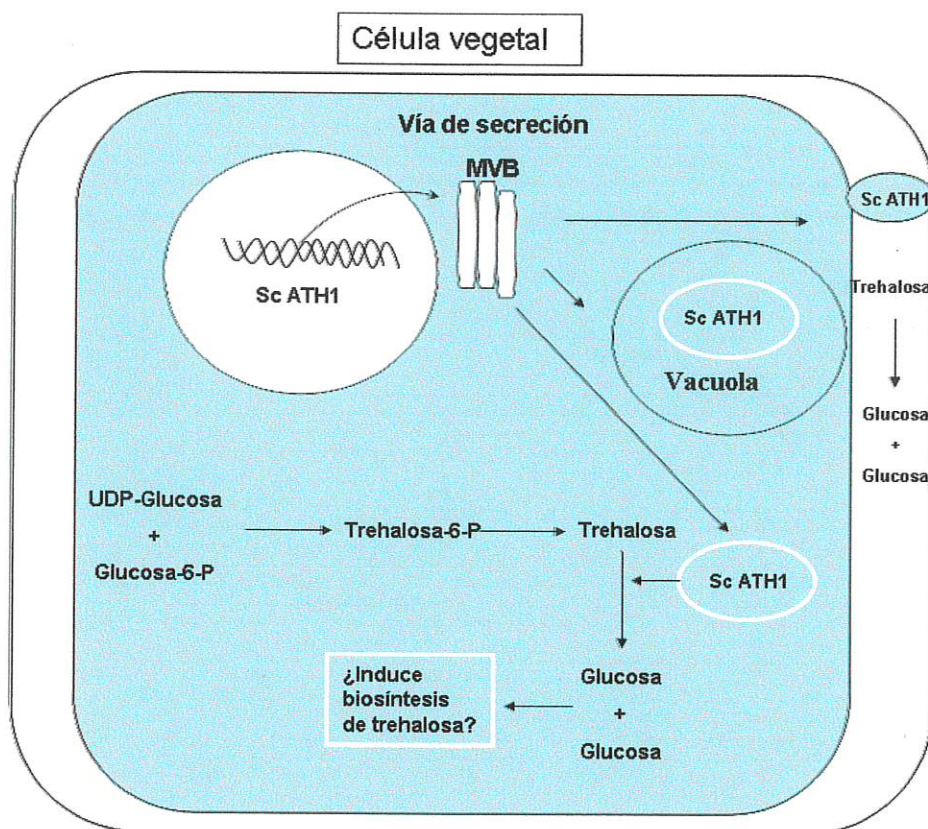


Figura 43. Modelo propuesto para explicar el efecto de la alteración en la biosíntesis de trehalosa mediante la inserción del gen *ScATH1* en plantas de tabaco.

En el caso de las líneas transgénicas obtenidas con el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*, la sobreexpresión de la proteína bifuncional con actividad trehalosa fosfato sintasa y

fosfatasa de *Saccharomyces cerevisiae*, en términos generales se comportó como lo esperado en cuanto a la capacidad de aumentar los contenidos endógenos de trehalosa, lo cual concuerda con reportes de sobre-expresión de construcciones bifuncionales con los dos genes involucrados en la biosíntesis de trehalosa (Cuadro 6, Figura 25). Garg *et al.* (2002), y Jang *et al.* (2003), expresaron un gen bifuncional de *otsA* y *otsB* (homólogos de *TPS1* y *TPS2* respectivamente) con los promotores ABA-Inducible y el *rbcS* en plantas de arroz, resultando que las plantas transgénicas presentaron una mayor capacidad fotosintética y una disminución en los daños por fotooxidación cuando se sometieron a diferentes condiciones de estrés abiótico; en todos los casos se reportó un incremento en la cantidad de trehalosa presente en los tejidos vegetales muestreados.

Adicionalmente, los resultados obtenidos presentan estrecha relación con los reportados por Miranda (2006), quien señala que líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* bajo el control del promotor constitutivo 35S incrementó los niveles de trehalosa en diferentes magnitudes para cada evento de transformación obtenido.

5.1.2. Cambios morfológicos de las líneas transgénicas

Al realizar la transformación genética de las plantas de tabaco con *ScATH1* las plantas genéticamente modificadas no mostraron diferencias en las variables morfológicas evaluadas con respecto al testigo, tanto en la condición de presencia como en la de ausencia de sacarosa como fuente de carbono (Figuras 12, 13 y 14). La similitud morfológica y de desarrollo de las líneas transgénicas, incluyó además la ausencia de

efectos pleiotrópicos visibles, lo que muy probablemente se debe a que los niveles de trehalosa y trehalosa 6P, no sufrieron cambios considerables. Algunos autores atribuyen los efectos pleiotrópicos a un incremento en los niveles de este intermediario, lo que da lugar a fenotipos como el reportado por Goddijn y van Dun (1999), donde la sobreexpresión de la trehalosa 6-fosfato sintasa de levaduras (*ScTPS1*) o la misma enzima pero de *E. coli*, en planta de tabaco presentan hojas más pequeñas, de aspecto lanceoladas y de un color verde más intenso que las de las plantas tipo silvestre sin transformar, los autores correlacionan directamente la aparición de los efectos pleiotrópicos con una mayor cantidad del intermediario.

Todo lo contrario ocurre en la plantas genéticamente modificadas con *ScTPS1-TPS2*; donde mediante la inclusión de este gen bifuncional se altera la vía de síntesis de trehalosa, lo cual ocasionó los cambios morfológicos que sufrieron las plantas transgénicas, como hojas lanceoladas, una mayor velocidad de crecimiento, la incapacidad de crecer *in vitro* en ausencia de sacarosa, y floración prematura (Figuras 27, 28 y 29). Estas variaciones fenotípicas encuentran su origen muy probablemente en el aumento en el contenido del intermediario trehalosa 6-fosfato (T 6P).

La presencia de la enzima TPS1 como parte de la construcción bifuncional manejada en los eventos de transformación *ScTPS1-TPS2* se encuentra estrechamente relacionada; además de cambios en el proceso fotosintético (Paul *et al.*, 2001; Paul y Pellny, 2003), con la expresión de *AtTPS1* donde su presencia es necesaria en la transición del ápice de vegetativo a reproductivo en *Arabidopsis*, basándose en la afirmación de los autores de que el mutante homocigoto *tps1/tps1* es incapaz de llevar a cabo esta transición. Sin

embargo, no hay evidencias que la sobre-expresión o la ausencia de expresión de *AtTPS1* afecte la expresión de los genes que se sabe regulan el desarrollo de la floración, como *CO*, *SOC1*, *FLC*, *FT* y *LFY* (van Dijken *et al.*, 2004).

Por otra parte, es necesario que *TPS1* se sobre exprese en presencia de *TPS2* para que se lleve a cabo la floración prematura, ya que existen reportes como el de Avonce *et al.* (2004), quienes produjeron líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron la construcción *35S::AtTPS1*, que mostró retraso en la floración. Contrario a lo esperado, los resultados de esta investigación se contraponen con otros reportes en los que se señala que líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron una construcción bifuncional similar a la manejada en esta investigación *ScTPS1-TPS2* bajo el control del promotor constitutivo *35S* o el inducible por estrés *Rd29A*, no mostraron alteración en la floración en comparación con la línea no transformada (Miranda, 2006).

La apariencia de las líneas transgénicas *ScTPS1-TPS2* desarrolladas con sacarosa durante las dos primeras semanas bajo condiciones *in vitro* fue de plantas con entrenudos largos y hojas con coloración verde intensa, pero a partir de la tercera semana la tonalidad de las hojas viró hacia una clorosis evidente, lo que originó una apariencia semejante a una hoja en inicio de senescencia, hecho que se interpretó como envejecimiento prematuro, debido probablemente a una mayor actividad fotosintética, y una acumulación de almidón en amiloplastos; lo que las llevó a presentar un crecimiento acelerado consumiendo una gran cantidad de energía en un corto tiempo, no obstante lo anterior, las semillas obtenidas de las plantas precoces fueron viables (Figura 33).

El incremento en la actividad fotosintética había sido previamente reportada en experimentos en los que los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli* se sobre expresaron en tabaco, en estos experimentos las plantas con mayor actividad TPS1 (sobre expresantes de *otsA*), incrementaron la fotosíntesis hasta un tercio, bajo condiciones de saturación luminosa, mientras que en aquellas con mayor actividad TPP (que sobre expresaron *otsB*), la fotosíntesis disminuyó en igual proporción. El incremento en la capacidad fotosintética se correlacionó con el incremento del intermediario trehalosa-6-fosfato (Tre6P) (Paul *et al.*, 2001).

Dentro de los cambios que sufrieron las líneas transgénicas portadoras del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*, se presentó una respuesta de mayor retención de agua cuando se someten a condiciones de estrés hídrico, en los casos evaluados la mayor retención de agua coincidió cuando la línea transgénica presenta mayor contenido endógeno de trehalosa como en la línea 10BI (Figuras 41 y 42). El papel de la trehalosa en un rol de protección a estreses había sido reportado con anterioridad por una serie de autores (Wingler, 2002; De Virgilio *et al.*, 1994; Elbein *et al.*, 2003; Crowe *et al.*, 1998), específicamente manipulando la sobreexpresión de genes *otsA* *otsB* de *E. coli* y *ScTPS1* (Goddijn *et al.*, (1997) y de levadura (Goddijn *et al.*, 1997; Avonce *et al.*, 2004), con el objetivo de obtener plantas que acumulasen este azúcar y que por lo tanto mostraran una mayor tolerancia a la sequía (Holmstrom *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998).

El resultado de esta investigación con la construcción bifuncional *35S::Sc TPS1-TPS2* en las plantas de tabaco coincide con los obtenidos por Garg *et al.* (2002), quienes

llevaron a cabo la expresión de un gen bifuncional de *otsA* y *otsB* (homólogos de *TPS1* y *TPS2* respectivamente) con los promotores ABA-Inducible y el *rbcS* en plantas de arroz, donde las plantas transgénicas resultantes presentaron resistencia a estreses abióticos (dentro de ellos sequía), coincide además con los resultados de Jang *et al.* (2003), quienes obtuvieron plantas transgénicas de arroz las cuales eran capaces de producir una mayor cantidad de trehalosa, mediante la inclusión de un gen producto de la fusión bifuncional denominado *TPSP*, compuesto de la unión de los genes Trehalosa-6-fosfato sintasa (*TPS*) con el gen Trehalosa-6-fosfato fosfatasa (*TPP*), las plantas obtenidas con *TPSP*, bajo el control del promotor ubiquitina, donde las plantas transgénicas obtenidas presentaron tolerancia a sequía, estrés salino y frío. Debido a la similitud del gen bifuncional los resultados de tolerancia a estrés hídrico coinciden además con lo reportado por Miranda (2006) quien obtuvo plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresaron una construcción génica bifuncional de *ScTPS1-TPS2* cuyas líneas generadas mejoraron en su resistencia a diversas condiciones de estrés abiótico tales como congelamiento, calor, sequía y salinidad. La única diferencia con este último autor fue que las plantas obtenidas en nuestra investigación presentaron alteraciones fenotípicas bajo el promotor constitutivo 35S.

5.1.3 Regeneración de las plantas transgénicas sobre sacarosa y trehalosa como fuente de carbono

La posibilidad de encontrar diferencias de las líneas transgénicas *ScATH1* con respecto al testigo sin transformar en cuanto a su capacidad regenerativa en presencia de trehalosa

se origina de una hipótesis planteada en los trabajos de Nwaka *et al.* (1996), donde se menciona que la delección de *ATH1* en levadura resulta en una completa pérdida de la actividad de la trehalasa ácida y como consecuencia una incapacidad de usar trehalosa como fuente exógena de carbono. La hipótesis alterna manejada en este experimento fue que la sobreexpresión de esta enzima conferiría a las plantas de tabaco la capacidad de desarrollarse en un medio con trehalosa como fuente exógena de carbono para desencadenar una respuesta morfogénica. De tal manera que las líneas transgénicas con *ScATH1* por contener a la proteína heteróloga actuando a nivel extracelular podría hidrolizar la trehalosa del medio convirtiéndola en sus moléculas de glucosa, y que esta glucosa podría ser utilizada por los explantes de tabaco para formar brotes. En cada una de las dosis evaluadas de trehalosa: 10 mM (T1), 50 mM (T2), 100 mM (T3), 200 mM (T4), 300 mM (T5), 500 mM (T6), más los dos testigos: sacarosa 87.6 mM (S1) y sin fuente de carbono (T0) tanto para las líneas transgénicas como para el testigo sin transformar; las respuestas fueron sumamente variables lo que imposibilitó establecer algún tipo de correlación entre el contenido de la fuente de carbono en el medio (o la ausencia de esta) y la capacidad organogénica de las cuatro líneas transgénicas evaluadas y el testigo sin transformar (WT) (Figura 15). Las respuestas obtenidas nos permiten especular que el contenido de la trehalasa ácida es sumamente variable entre las líneas genéticamente modificadas y que la actividad de esta enzima parece ser que se encuentra cuando la trehalosa exógena se presenta en concentraciones de 100 y 200 mM, ya que en estas se reportó la mayor cantidad de brotes neoformados a partir de discos foliares de tabaco genéticamente modificados con *ScATH1*.

Por su parte en las líneas transgénicas *ScTPS1-TPS2* la respuesta es similar que en las líneas *ScATH1* ya que a concentraciones de 100 y 200 mμ, de trehalosa en el medio de cultivo se presenta una respuesta constante organogénica de los explantes foliares, tanto en líneas transgénicas como las del tipo silvestre (WT) (Figura 34).

La inconsistencia en la respuesta de los explantes no transformados y los transformados con *ScATH1* o con *ScTPS1-TPS2* cuando son inducidos a organogénesis en presencia de trehalosa o sin fuente de carbono, hace improbable que cualquiera de las dos construcciones pueda emplearse para implementar un sistema de selección para obtener plantas transgénicas, como se hizo con otros genes implicados en la utilización de azúcares como la xilosa o la manosa (Haldrup *et al.*, 1996, 1998)

5.2 Alteraciones en el interacción planta- patógeno de las plantas transgénicas

La parte fundamental de esta investigación fue determinar el tipo de respuesta que podían presentar las líneas transgénicas obtenidas; tanto las portadoras del gen *ScATH1*, como las portadoras de *ScTPS1-TPS2*. En cada uno de los casos la respuesta de resistencia y/susceptibilidad fue diferente. Considerando que las pruebas realizadas se llevaron a cabo tanto en plántulas desarrolladas bajo condiciones *in vitro* como en plantas aclimatadas, las respuestas parecen ser más claras a medida que aumenta la edad de las plantas, donde tanto los síntomas de susceptibilidad como de resistencia se acentúan.

Para las líneas transgénicas *ScATH1*, al haber sido las primeras en ser obtenidas permitieron llevar a cabo pruebas de patogenicidad en estado adulto (tres meses posteriores al proceso de aclimatación) donde al ser inoculadas bajo las mismas condiciones que el testigo (planta de la misma edad sin transformar), resultaron ser muy susceptibles al ataque de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, mientras que el testigo presentó un mayor grado de tolerancia al ataque de esta bacteria, si bien los síntomas visibles permitieron determinar la severidad de los daños ocasionados por la bacteria, la cuantificación de esta en placas de medio LB con tejido infectado muestreado de las plantas inoculadas, ofreció un parámetro cuantitativo para confirmar la susceptibilidad de las líneas transgénicas; donde se pudo determinar que la cantidad de células bacterianas presentes en la planta testigo (WT sin transformar) fue hasta 1000 veces menor con respecto a cada una de las líneas transgénicas. En adición el desarrollo de esta prueba no ofreció la posibilidad de correlacionar los contenidos endógenos reportados inicialmente por HPLC con la respuesta frente al ataque de la bacteria, ya que las cuatro líneas transgénicas se comportaron como susceptibles en menor o mayor grado independientemente de la cantidad de trehalosa total reportada en los análisis de cuantificación de este azúcar. Cuando la misma prueba se llevó a cabo en plántulas desarrolladas bajo condiciones *in vitro* los síntomas fueron visibles en un par de días siendo más evidentes en las líneas transformadas con una mayor cantidad de trehalosa medida por HPLC (4Tre y 9Tre), mientras que las líneas con menores contenidos de trehalosa (3Tre y 5Tre) presentaron menores daños en el mismo periodo de tiempo, complementariamente el testigo tuvo un comportamiento intermedia con respecto a las líneas transformadas, cuantitativamente al llevar a cabo el conteo de colonias, el desarrollo de estas coincidió con los síntomas que presentaban las vitroplantas, ya que

las líneas 4Tre y 9Tre presentaron ambas el mayor número de colonias en una dilución de 10^{-7} , de tejido infectado, mientras que 3Tre y 5Tre dieron lugar a un número de colonias menor incluso a las que se desarrollaron a partir de tejido muestreado del testigo sin transformar.

La hipótesis original bajo la cual se generaron las líneas transgénicas *ScATH1* contemplaba la posibilidad de que al sobreexpresar la trehalasa ácida y al actuar ésta a nivel extracelular (Jules *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2001) podría interferir modificando la relación planta-patógeno, mediante la degradación de trehalosa en el patógeno, como había sido previamente sugerido por Brodmann *et al.* (2002), donde los autores trabajando con el patosistema de *Plasmodiophora brassicae* hongo causante de un tipo de agalla (culbroot) en crucíferas reportaron que se detectó la inducción del gen *AtTRE1* que codifica la trehalasa de *Arabidopsis* debido a que hay inducción transcripcional del gen *PbTPS1* del hongo, asumiendo que la mayor parte de la trehalosa detectada durante la interacción pudo haber sido sintetizada por el patógeno, de esta manera los autores plantearon la posibilidad de que, mediante la liberación de trehalosa, el patógeno podría estar alterando el metabolismo carbonado de la planta a su favor y en respuesta la planta estaría activando a la trehalasa para contrarrestarlo; complementariamente y al respecto existen reportes relacionados con el mecanismo basal de defensa en la relación planta-patógeno como el de Foster *et al.* (2003), donde mediante la delección del *TPS1* del hongo *Magnaporthe grisea*, agente causal de la roya del arroz se correlacionó directamente con una disminución en su capacidad infectiva; la reducción en la patogenicidad se atribuyó a la falta de suficiente trehalosa al inicio de la infección para generar la presión osmótica necesaria de los apresorios para penetrar la pared celular.

Este hecho señala la importancia que el disacárido cumple en el proceso de infección y a la par expone la acción de la trehalasa que produce la planta para contrarrestar el ataque del hongo.

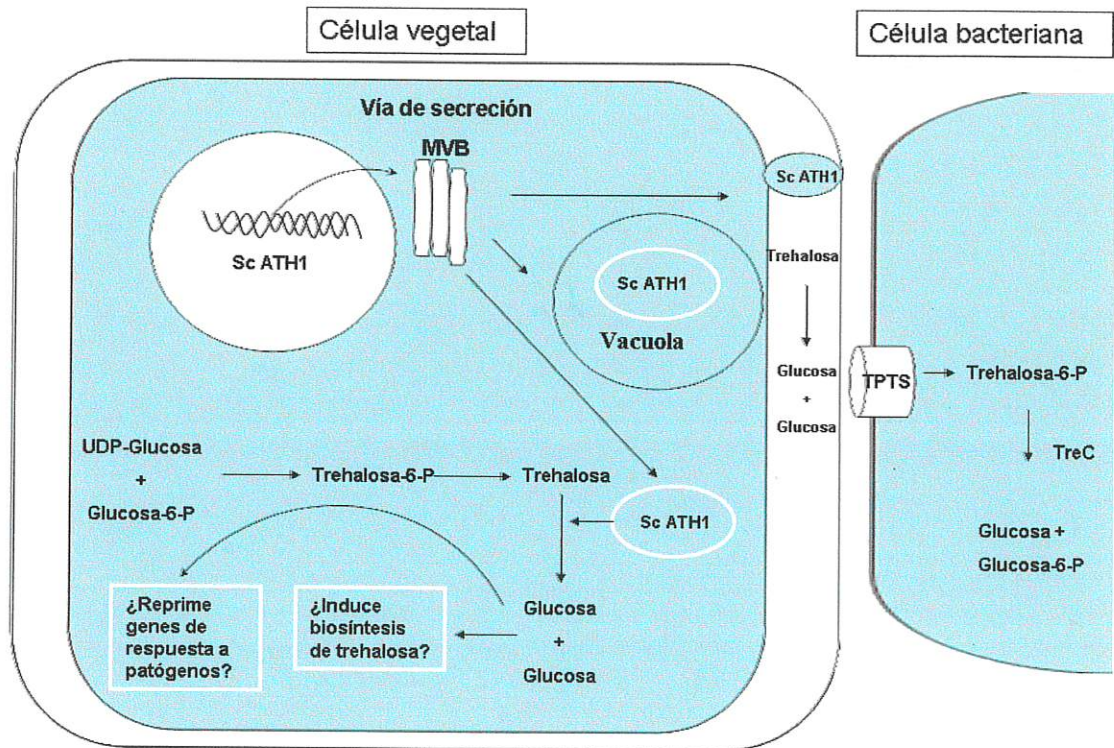
Para entender como la invasión de la bacteria fitopatógena podía verse afectada mediante la modificación de las vías de síntesis de trehalosa en las plantas transgénicas, era necesario conocer si esta bacteria podía o no sintetizar este disacárido. Ante esto es importante mencionar trabajos como el de Avonce *et al.* (2006), quienes hacen mención a que la biosíntesis de trehalosa se encuentra presente en casi todos los grupos taxonómicos (eubacterias, arqueobacterias, hongos, metazoa y plantas), siendo la excepción los vertebrados, que sin embargo poseen la capacidad para degradar a este azúcar mediante la trehalasa. Los mismos autores hacen referencia a que se han identificado cinco diferentes vías de biosíntesis: 1) la vía TPS/TPP; 2) la vía TreS; 3) la vía TreY/TreZ; 4) la vía TreP; y 5) la vía TreT. Un dato relevante de estrecha relación con esta investigación fue saber que mientras que hongos, insectos y plantas sólo cuentan con la vía TPS/TPP, en las bacterias no es raro encontrar más de una vía de biosíntesis de trehalosa, incluyendo la TPS/TPP.

Ante los datos reportados por Avonce *et al.* (2006), se consideró necesario averiguar si *Pectobacterium carotovorum* contaba con alguna de las vías de biosíntesis de trehalosa, lo que hizo necesario llevar a cabo una búsqueda en el GenBank, mediante el programa bioinformático BLAST; donde el análisis se llevó a cabo en la especie relacionada *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, esto por presentar la gran ventaja de haber sido completamente secuenciada (Bell *et al.*, 2004) y por ser una especie estrechamente

relacionada con *P. carotovorum*. Al realizar el análisis no se encontró ninguna de las cinco vías de biosíntesis, aunque si la capacidad para utilizar trehalosa; ya que al igual que *E. coli*, esta bacteria puede utilizar como fuente de carbono a la trehalosa, la cual es internalizada y transformada en trehalosa 6-fosfato por TreB/TreP, y posteriormente hidrolizada por efecto de la trehalasa TreC para formar glucosa y glucosa 6-fosfato (Uhland *et al.*, 2000). El hecho de no encontrar vías de biosíntesis de trehalosa en *E. carotovora* subsp *atroseptica*, motivó a que se llevara a cabo una búsqueda de otros casos similares en la literatura, encontrando que *Erwinia chrysanthemi* cepa 3937 no posee ninguna vía de biosíntesis para este azúcar y que además utiliza como osmolitos predominantes a la glutamina, glutamato y α -glucosilglicerato. Es conveniente resaltar sin embargo, que otras cepas de *E. chrysanthemi*, como la ECC y la SR237 si pueden sintetizar trehalosa (Goude *et al.*, 2004).

La información obtenida de que *P. carotovorum* no puede sintetizar trehalosa, por lo menos mediante las cinco vías conocidas, pero que si puede utilizar trehalosa como fuente de carbono (Uhland *et al.*, 2000), permitió plantear un modelo hipotético que podría explicar la susceptibilidad de las plantas transgénicas *ScATH1* frente al ataque de la bacteria. En este modelo (Figura 44) se representa la acción de la proteína heteróloga (Trehalasa ácida) donde la mayor parte es secretada por la vía *MVB* (Multi Vesicular Body) (Huang *et al.*, 2007), hacia la vacuola y hacia afuera del citoplasma donde hidroliza la trehalosa presente en el espacio periplasmático y/o en la pared de la célula, descomponiéndola en dos moléculas de glucosa. Este modelo además plantea la posibilidad de que la misma condición heteróloga provoque que una pequeña fracción de

esta enzima permanezca en el citoplasma, hidrolizando parte de la trehalosa citoplasmática, descomponiéndola en sus dos moléculas de glucosa, el incremento en la cantidad de glucosa en el citoplasma, podría ocasionar la activación de algunos genes, dentro de ellos probablemente los involucrados en la biosíntesis de trehalosa. A la par se estaría presentando un fenómeno de represión catabólica por glucosa de algunos genes de respuesta a patógenos, permitiendo de esta manera que la bacteria no encuentre obstáculos para llevar a cabo su invasión en el tejido vegetal. Este modelo contempla la posibilidad de que la enzima en su carácter extracelular pueda actuar sobre alguna cantidad de trehalosa presente en la pared celular degradándola e inherentemente aumentando la cantidad de glucosa, misma que la bacteria pudiera utilizar como fuente de carbono para aumentar su capacidad infectiva. En ambos casos un aumento en la cantidad de trehalosa, producto de la inducción de genes involucrados en su biosíntesis por la presencia de glucosa (Prince *et al.*, 2004), establecería la posibilidad de que este disacárido fuera utilizado por la bacteria *P. carotovorum* como fuente de carbono, ya que la bacteria podría transformar esta trehalosa en trehalosa 6-fosfato por la acción de TreB/TreP hasta formar glucosa y glucosa 6-fosfato por la acción de la enzima TreC (Uhland *et al.*, 2000). De ser correcto este supuesto se conocería así la razón por la cual las líneas genéticamente modificadas con *ScATH1* cuyos niveles de trehalosa son elevados (4Tre y 9Tre), presentan una mayor susceptibilidad al ataque de la bacteria fitopatógena por la represión de algunos genes de defensa a patógenos en presencia de glucosa.



TPTS. Trehalosa fosfotransferasa.

MVB= Multivesicular bodies.

Figura 44. Modelo propuesto para explicar el efecto de la alteración en la biosíntesis de trehalosa mediante la inserción del gen *ScATH1* en plantas de tabaco sobre la respuesta al ataque de la bacteria fitopatógena *P. carotovorum*.

En el caso de las plantas transgénicas *ScTPS1-TPS2*, estas plantas solo tuvieron 4 semanas de desarrollo posteriores al proceso de aclimatación, la condición de plantas joven nos permitió observar en forma más evidente la respuesta después de la inoculación de *P. carotovorum*, ya que las tres líneas transgénicas (2BI, 9BI y 10BI) sobrevivieron al ataque de la bacteria, mientras que los testigos: una línea sin transformar (WT) y una de trehalasa (4Tre), esta última ya previamente identificada

como muy susceptible al ataque de esta bacteria fitopatógena, murieron. En términos generales la condición de transformadas con *ScTPS1-TPS2* le confirió a las plantas aclimatadas resistencia al ataque de *P. carotovorum*.

Cuando la prueba de patogenicidad se llevó a cabo en plántulas desarrolladas bajo condiciones *in vitro*; las líneas cuyos contenidos de trehalosa cuantificados por HPLC fueron elevados, considerando elevados a aquellos superiores a los reportados para el testigo sin transformar, es decir las líneas 9BI y 10BI estas presentaron un menor número de colonias desarrolladas en las placas de medio LB en una dilución 10^{-7} , mientras que las líneas con bajo contenido de trehalosa (1BI y 2BI) presentaron un número mayor de colonias a la misma dilución, pero este número de colonias fue muy cercano al que se obtuvo del tejido muestreado de las plantas sin transformar, lo que explica el porque visualmente se apreciaban síntomas similares entre ellas (Figuras 39 y 40).

Al igual que en el caso de las líneas *Sc ATH1* las respuestas parecen ser más evidentes a medida que aumenta la edad de las plantas, donde para las líneas transgénicas *Sc TPS1-TPS2* se traduce en un fenómeno de tolerancia al ataque de la bacteria empleada en esta investigación. Esta respuesta obligó inmediatamente a buscar referencias que ofrecieran alguna idea de los mecanismos de defensa que probablemente se estaban llevando a cabo en las líneas genéticamente modificadas; al respecto Reignault *et al.* (2001) mencionan que debido a la habilidad de los patógenos para desarrollar resistencia a la mayor parte de los pesticidas convencionales, se han intentado otras estrategias, como:

- a) utilizar moléculas no tóxicas que eliciten la respuesta de defensa de la planta que

provocan efectos como el fortalecimiento de la pared celular (mediante la deposición de calosa, lignina y suberina), o la síntesis de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas y proteínas PR; b) Otra segunda clase de moléculas, adicionalmente a la respuesta descrita antes, también pueden mimetizar la activación de la resistencia sistémica adquirida; de acuerdo a los autores el metabolismo secundario se presentan como un importante elemento en las reacciones de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos; los mismos autores reportan que aplicar en forma exógena trehalosa, ésta confirió resistencia de hasta 95 % en plantas de trigo frente al hongo *Blumeria graminis* DC) E.O. Speer (antes designado como *Erysiphe graminis* DC) f. sp. *tritici*. Los autores hacen hincapié en que parte de esta resistencia se atribuye a que la trehalosa induce genes que codifican enzimas implicadas en la defensa a patógenos, mismas que se encuentran relacionadas con el metabolismo secundario de la vía de fenilpropanoides, como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la peroxidasa (PO). Específicamente mencionan que la activación de PAL fue igual a dosis de 0.001, hasta 15 g L⁻¹, mientras que PO se activó más a 0.01 mg L⁻¹ al cabo de 55 horas. La actividad de la enzima cinnamil alcohol dehidrogenasa (CAD) la cual está implicada en la deposición de la pared celular no sufrió modificaciones por efecto de la trehalosa exógena (Reignault *et al.*, 2001).

En el mismo sentido, Schluepmann *et al.* (2004) analizaron mediante microarreglos, el comportamiento transcripcional de *Arabidopsis* al crecer las plántulas en presencia de trehalosa 100 mM, así como en plantas transgénicas que sobre expresaron *otsA* de *E. coli*. (homologo de TPS1), donde en ambos casos, se incrementó el contenido endógeno de trehalosa 6-fosfato; los autores mencionan que este intermediario parece ser el efector

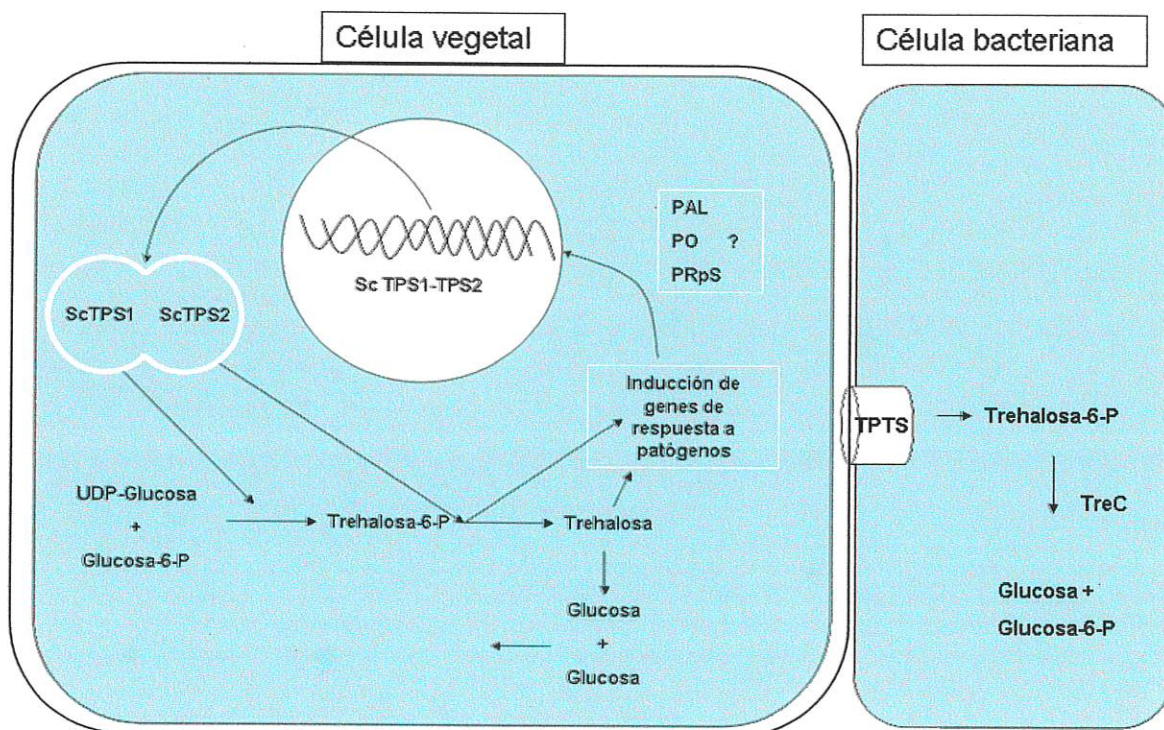
que induce algunos genes relevantes de respuesta a estrés, entre los cuales destacan algunos que podrían estar implicados en mecanismos moleculares de defensa a patógenos, como los que codifican para una cinasa 1 asociada a pared celular (At1g21250), una proteína relacionada con AIG2 (At3g28930), una proteína TIR relacionada con genes de resistencia (At1g72930), una peroxidasa (At4g21960), el citocromo P450 (At4g22690) y una isoflavona reductasa (At1g75280).

Tanto Reignault *et al.* (2001), como Schluepmann *et al.* (2004) dejan en claro que la presencia de trehalosa por lo menos en forma exógena afecta positivamente algunos mecanismos de defensa de las células vegetales, de la misma manera se sostiene que el efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los patógenos no está dado por la trehalosa por sí misma, sino por los genes que se activan en la planta por efecto de la trehalosa y/o del intermediario trehalosa 6-fosfato.

El conocimiento adquirido en cuanto a la función de la trehalosa y su relación con los mecanismos de defensa, teóricamente abrieron la posibilidad de extrapolar estas respuestas a las plantas de tabaco transformadas con la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* y dar una respuesta a su condición de tolerantes o resistentes al ataque de la bacteria al aumentar sus contenidos endógenos de trehalosa. El análisis de esta respuesta culminó en el desarrollo de una propuesta de modelo de resistencia a patógenos inducido por la trehalosa, mismo que se muestra en la Figura 45.

En este modelo se propone que la expresión de la proteína bifuncional *Sc TPS1-TPS2* actuarían en forma conjunta incrementando la actividad de las enzimas trehalosa-6-

fosfato sintasa (TPS1) responsable de la formación de trehalosa-6-fosfato (T-6-P) sintetizado a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, y de la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPS2) encargada de convertir T-6-P en trehalosa (Ramón y Rolland 2007), de manera que la condición heteróloga de la proteína podría incrementar los niveles tanto del intermediario (T-6-P), como de los niveles de trehalosa endógena, el incremento de los niveles tanto del intermediario como de trehalosa citoplasmática induciría genes de respuesta a patógenos, como la activación de PAL (Reignault *et al.*, 2001), PO (Reignault *et al.*, 2001, Schluepmann *et al.* 2004), PRPs (Reignault *et al.*, 2001), u otras que no se han reportado. La activación de estas enzimas de respuesta a ataque de patógenos estaría correlacionada de forma positiva cuando los niveles de trehalosa se incrementan por acción del gen bifuncional, ya que este actúa directamente sobre la vía de síntesis de trehalosa. De ser correcta esta aseveración se estaría dando respuesta al fenómeno de resistencia de las líneas transgénicas con alto contenido de trehalosa desarrolladas *in vitro* ya que estas impiden o reducen la invasión de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.



TPTS. Trehalosa fosfotransferasa.

Figura 45. Modelo propuesto para explicar el efecto de la alteración en la biosíntesis de trehalosa mediante la inserción del gen bifuncional *Sc TPS1-TPS2* en plantas de tabaco sobre la respuesta al ataque de la bacteria fitopatógena *P. carotovorum*.

Cabe señalar que el modelo propuesto es para el patosistema que se utilizó en esta investigación, en el cual la bacteria patógena es de las pocas especies que no sintetizan trehalosa. Se ha reportado que la sobre expresión de genes *otsA* en *Rhizobium etli* incrementó la capacidad infectiva de la bacteria, supuestamente porque la mayor producción de trehalosa 6-fosfato por la bacteria estaría induciendo genes de la planta que favorecen la interacción (Suarez *et al.*, 2007, datos sin publicar). Dentro de las bacterias fitopatógenas, las hay que sintetizan trehalosa a través de una o más vías de las cinco conocidas, mientras que al parecer todos los hongos y algunas bacterias

simbióticas o patógenas, pueden sintetizar trehalosa a través de la vía TPS/TPP y por lo tanto al intermediario trehalosa 6-fosfato cuya función como molécula señalizadora ha sido demostrada (Avonce *et al.*, 2006; Schluepman *et al.*, 2004).

6. CONCLUSIONES

1. Es posible transformar genéticamente plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), con el gen *ScATH1* de la levadura, sin que estas exhiban cambios en su morfología.
2. Es posible transformar genéticamente plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), con el gen quimérico *ScTPS1-TPS2* de la levadura, bajo el control del promotor constitutivo 35S; donde el resultado es un incremento en los niveles endógenos de trehalosa.
3. Las plantas genéticamente modificadas con el gen quimérico *ScTPS1-TPS2* exhiben cambios en su fenotipo tales como mayor altura, número de hojas y raíces a los casi dos meses de la evaluación, así como variaciones en la morfología de las hojas, floración prematura, senescencia prematura y formación de semillas viables.
4. Los resultados parecen indicar que la sobre expresión de la trehalasa (*ScATH1*) en tabaco vuelve más susceptibles a las plantas infectadas con *Pectobacterium carotovorum*.
5. Los resultados indican que la acumulación de trehalosa (por sobreexpresión de *ScTPS1-TPS2*) reduce la invasión y la severidad del daño causado por la bacteria

Pectobacterium carotovorum, lo cual es más evidente cuando la infección se lleva a cabo en plantas *ex vitro* de mayor edad.

6. La presencia de trehalosa en el medio de cultivo no puede ser utilizado como un agente selectivo positivo para la plantas de tabaco transformadas con el gen *ScATH1* creciendo en un medio con trehalosa como fuente de carbono.
7. Se ha demostrado de manera preliminar que el metabolismo de la trehalosa afecta la interacción planta-patógeno.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores, pero será necesario llevar a cabo análisis adicionales para caracterizar con mayor detalle el papel del metabolismo de la trehalosa en la interacción planta patógeno en las plantas transgénicas generadas:

1. Estos ensayos deberán llevarse a cabo preferentemente con plantas homocigotas para los transgenes transferidos, lo cual implicará obtener las generaciones T1 y T2 para identificar a las homocigotas y así fijar el genotipo de las líneas.
2. Para comprobar si la trehalosa o la trehalosa 6-fosfato están induciendo genes de resistencia a patógenos y para saber que tan específica es esta respuesta, se deberá monitorear la transcripción de genes que codifican enzimas como PAL y PO (y también la actividad enzimática), así como algunos genes que se han

reportado como inducidos por trehalosa exógena o por la sobre expresión de *otsA* en *Arabidopsis* y que tendrían relación con la respuesta a patógenos (una cinasa 1 asociada a pared celular, una proteína relacionada con AIG2, una proteína TIR relacionada con genes de resistencia, una peroxidasa, el citocromo P450 y una isoflavona reductasa).

3. También se podría retar las mismas plantas transgénicas homocigotas de tabaco generadas en esta investigación con el hongo “moho azul”, (*Peronospora tabacina*). Otros hongos fitopatógenos que afectan la parte aérea del tabaco y que por lo mismo también podrían utilizarse con el mismo fin son *Alternaria alternata*, *A. solani* y *Botrytis cinerea*, así como el hongo del suelo *Rhizoctonia solani*.
4. Hay otras posibles bacterias fitopatógenas que afectan al tabaco, como *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* que sintetiza trehalosa a través de las vías *TreY/TreZ* y la *TreS*. Adicionalmente se podrían llevar a cabo ensayos de agroinfección *in vitro* con *Agrobacterium tumefaciens*. Este patógeno cercano filogenéticamente con *Rhizobium sp*, sí cuenta con la vía TPS/TPP de biosíntesis de trehalosa. En este caso la selección *in vitro* deberá hacerse utilizando un gen de selección distinto a kanamicina, ya que las plantas transgénicas generadas ya son resistentes a este antibiótico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aeschbacher R. A., J. Muller, T. Boller and A. Wiemkem. 1999. Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. *GMTRE1* is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiol.* 119:489-495.
- Alizadeh, P. y D. J. Klionsky. 1996. Purification and biochemical characterization of the ATH1 gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 391(3):273-8.
- Amaral, F. C., P. Van Dijck, J. R. Nicoli and J. M. Thevelein. 1997. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces fragilis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Arch. Microbiol.* 167:202-208.
- Avonce, N., B. Leyman, J. O. Mascorro-Gallardo J.O., P. Van Dijck, J. M. Thevelein and G. Iturriaga. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P-synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid and stress signaling. *Plant Physiol.* 136:649-659.
- Avonce, N., A. Mendoza-Vargas, E. Morett y G. Iturriaga. 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 109.
- Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*. 276:726-733.
- Bell, K.S., M. Sebaihia, L. Pritchard, M.T.G. Holden. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11105-11110.
- Benfey, P. N., L. Ren, N. H. Chua. 1990. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* 6:1677-1684.

- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 22:8711-8721.
- Blázquez, M. A., E. Santos, C. L. Flores, J. M. Martínez-Zapater, J. Salinas, C. Gancedo. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13:685-689.
- Branca, C., S. Magazu, G. Maisano, P. Migliardo. 1999. Alpha, alpha-trehalose-water solutions 3. Vibrational dynamics studies by inelastic light scattering. *Journal of Physical Chemistry B.* 103 (8): 1347.
- Brodmann, E., A. Schuller, J. Ludwig-Müller, R. A. Aeschbacher, A. Wiemken, T. Boller, A. Wingler. 2002. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with trehalose-producing pathogen *Plasmidiophora brassicae*. *Mol. Plant. Micr. Inter.* 15: 693-700.
- Bundock, P., A. den Dulk-Ras, A. Beijersbergen. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium* to *Saccharomyces Cerevisiae*. *EMBO J.* 1995. 14(3):3206.
- Cervera, M., J. A. Piña, J. Juárez, L. Navarro y L. Peña. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 18 (3-4): 271-278.
- Chan, M. T., H. H. Chang, S. L. Ho. 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ α -glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.* 22: 491.

- Chen, F. y A. R. Kuehnle. 1996. Obtaining Transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolated internodes. Journal of the American Society for Horticultural Science. 121 (1): 47-51.
- Cheng, Y., J. Yang y S. Yeh. 1996. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya rigspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. Plant Cell Reports. 16 (3-4): 127-132.
- Cruz-Hernández, A., R. E. Witjaksono, M. Litz y L. Gómez. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Reports. 17(6-7): 497-503.
- Crowe, J.; L. Crowe, D. Chapman. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. Science. 223: 209-217.
- Dawes, E. A. y P. J. Senior. 1973. Energy reserve polymers in micro-organisms. Adv. Microbiol. Physiol. 10: 136-266.
- D'Enfert, C. y T. Fontaine. 1997. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. Mol. Microbiol. 24: 203-216.
- Dellaporta, S. L., J. Wood y J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

- Dengl, J., L. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411:826-833.
- De Virgilio, C., T. Hottiger, J. Domínguez, T. Boller. And C. Wiemken. 1994. The role of trehalose síntesis ofr the acquisition of thermotolerance in yeast I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem*. 219:179-186.
- Dickey, R. S., y A. Kelman. 1988. Diagnostic media y tests of *Erwinia carotovora*. *In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Schaad N. W. (ed). APS Press, St. Paul, Minnesota. p: 44-50.
- Eastmond, P.J., A.J.H van Dijken, M. Spielman, A. Kerr, A. F. Tissier, H. G. Dickinson, J. D. G. Jones, S. C. Smekeens, I. A. Graham. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first sep in trehalose síntesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J*. 29:225-235.
- Elbein, A. D. 1974. The metabolism of trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*. 30: 227-256.
- Elbein, A.D., Y. T. Pan, I. Pastuszak, D. Carrol. 2003. New insights on trehalose: amultifunctional molecule. *Glycobiol*. 13:17R-27R.
- Fluhr, R. 2001. Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiol*. 127:1367-74.
- Foster, A. J., J. M. Jenkinson, N. J. Talbot. 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J*. 22: 225- 235.

- Francois, J. and J. L. Parrou. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. 25(1):125-45.
- Fritzius, T., R. Aeschbacher, A. Wiemken, and A. Wingler. Induction of *ApL3* Expression by Trehalose Complements the Starch-Deficient Arabidopsis Mutant *adg2-1* Lacking ApL1, the Large Subunit of ADP-Glucose Pyrophosphorylase. Plant Physiology. June 2001.126:883-889.
- Fumiaki, K., R. Thilmony, and S. Y. He. 2002. The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book. 35 pp.
- Gómez-Escobedo A., J. L. Cabrera-Ponce, L. R. Herrera-Estrella, C. H. Luna, R. Montes de Oca-Luna. 2004. Mejora del crecimiento de plantas de tabaco mediante la inhibición del gen de la trehalasa. Ciencia UANL 7(4). Octubre-Diciembre.
- García, A. B., J. De Almeida-Engler, S. Iyer, T. Gerats, M. Van Montagu, A. B. Caplan. 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. Plant Physiol 115: 159-169.
- Garg, A.K., J. K. Kim, T. G. Owens, A. P. Ranwala, Y. D. Choi, L. V. Kochian, R. J. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc. Natl. Acad. Sci. 99:15898-15903.
- Garre-García, E., E. Matallana. 2003. Análisis de la expresión del gen *ATH1* y su posible implicación en la respuesta a estrés en *S. cerevisiae*. SEBBM. Ref. P11-011.

- Goddijn, O. J. M., T. C. Verwoerd, E. Voogd, R. W. H. H. Krutwagen, P.T.H.M. De Graaf, J. Poels, K. van Dun, A. S. Ponstein, B. Damm, J. Pen. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 113: 181–190.
- Goddijn, O. J. M.; K. van Dun. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 315-319.
- Goude, R., S. Renaud, S. Bonassie, T. Bernard and C. Blanco. 2004. Glutamine, glutamate, and α -glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3947. *Appl. Env. Microbiol.* 70: 6535-6541.
- Haldrup, A, S. G. Petersen, F. T. Okkels. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant. Mol. Biol.* 1998, 37:287-296.
- Haldrup, A., S. G. Petersen and F. T. Okkels. 1998a. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Rep.* 18:76–81.
- Hauben, L., E. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Sist. Appl. Microbiol.* 21:384-397.
- Holmstrom, K. O., E. Mantyla, B. Welin, A. Mandal, E. T. Palva, O. E. Tunnela, J. Londesborough. 1996. Drought tolerance in tobacco. *Nature.* 379: 683-684.
- Huang J., F. Reggiori, DJ. Klionsky. 2007. The transmembrane domain of acid trehalase mediates ubiquitin-independent multivesicular body pathway sorting. *Mol. Biol. Cell.* In press.

- Jang, I. C., S. J. Oh, L. S. Seo, W. B. Choi, S. I. Song, C. H. Kim, Y. S. Kim, H. S. Seo, Y. D. Choi, B. H. Nahm, J. K. Kim. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 2: 516-524.
- Jules, M., V. Ghillou, J. Francois, J. L. Parrou. 2004. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):2771-2778.
- Kopp, M., H. Müller, and H. Holzer. 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268 (7):4766-4774.
- Kucharek, T., J. Bartz. 2000. Bacterial Soft Rot of Vegetables and Agronomic Crops. *Plant Pathology Fact Sheet.* 2:12-18.
- Lalonde, S., E. Boles, H. Hellmann, L. Barker, J.W. Patrick, W.B. Frommer, and J. M. Ward. 1999. Membrane structure and function. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *The Plant Cell* 11: 707-726.
- Leyman, B., P. Van Dijck, J. M. Thevelein. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends plant Sci.* 6:510-513.
- Mascorro-Gallardo, J. O., N. Avonce, G. Iturriaga. 2005. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 193-202.

- Metz, T. D.; R. Dixit. y E. D. Earle. 1995. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var italica) and cabbage (*B. oleracea* var. capitata). Plant Cell Reports. 15 (3-4): 287-292.
- Miles, J. S. and J. R. Guest. 1984. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (mana) of *Escherichia coli*. Gene 32: 41-48.
- Miranda Ríos, José Antonio. 2006. Expresión de una proteína bifuncional con actividad trehalosa fosfato sintasa y fosfatasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 105 pp.
- Muerer, C.A.; R. D. Dinking and G. B. Collins. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Reports. 18(1-2) 180-186.
- Müeller, J., A. R. Aeschbacher, A. Wingler; T. Boller, A. Wiemken. 2001. Trehalosa y trehalase in *Arabidopsis*. Plant. Physiol. 125:1086-1093.
- Müller, J., T. Boller and A. Wiemken. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. Plant Sci. 112: 1-9.
- Nishibayashi, S., H. Kaneko. y T. Hayakawa. 1996. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. Plant Cell Reports. 15 (11):809-814.
- Norelli, J., J. Mills, y H. Aldwinckle. 1996. Leaf Wounding Increases Efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. HortScience. 31 (6): 1026-1027.

- Nwaka, S., M. Kopp, and H. Holzer. 1995. Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270(17):10193-8.
- Nwaka, S, B. Mechler, H. Holzer. 1996. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett* 386(2-3):235-8.
- Paul, M. J., Pellny T. K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54: 539-547.
- Paul, M.; T. K. Pellny, O. J. M. Goddijn. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci.* 6: 197-200.
- Pellny, T. K., Goddijn O. J. M, Paul M. J. 2002. Unravelling the role of trehalose-6-phosphate in metabolic signalling. Society for Experimental Biology Annual Main Meeting, Swansea. April.
- Peña, L., M. Cervera., J. Juárez., A. Navarro., J. A. Pina, N. Durán-Vila. y L. Navarro. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports.* 14 (10):616-619.
- Peña, L., M. Cervera., J. Juárez., A. Navarro, J. A. Pina y L. Navarro. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports.* 16 (11):731-737.
- Pérombelon, M., G. Salmond. 1995. Bacterial Soft Rots, Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Vol. 1, Prokaryotes, Oxford, Pergamon, Inglaterra, pp. 1-20.
- Pilon-Smits, E. A. H., N. Terry, T. Sears, H. Kim, A. Zayed, S. Hwang, K. Van Dun, E. Voogd, T. C. Verwoerd, R. W. H. H. Krutwagen, O. J. M. Goddijn. 1998.

- Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.* 152: 525-532.
- Prince, J., A. Laxmi, S. K. St. Martin and Jyan-Chy Jang. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 16:2128-2150.
- Ramon M., and F. Rolland. 2007. Plant development: introducing trehalose metabolism. *Trends Plant. Sci.* In press.
- Reignault, Ph., A. Cogan, J. Muchembled, A. L.-H. Sahraoui, R. Durand and M. Sancholle. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytol.* 149: 519-529.
- Rolland, F., B. Moore, and J. Sheen. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*. 14: 185-205.
- Romero, C.; J. M. Bellés, J. L. Vayá, R. Serrano. F. A. Culiáñezmacià. 1997. Expression of the yeast trehalose 6- phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*. 201: 293-297.
- Sambrook, J. E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual segunda edición*. Cold Spring Harbor Press. CHS, NY.
- San Miguel, P. F. y J. C. Argüelles. 1994. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio. chim. Biophys. Acta*. 1200: 155-160.
- Sheng, J. y V. Cotovsky. 1996. *Agrobacterium-plant* cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell*. 8 (10):1699-1710.

- Schick, I., D. Haltrich y K. D. Kulbe. 1995. Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. Appl. Microbiol. Biotech nol. 43:1088–1109.
- Schluepmann, H.; A. van Dijken; M. Aghdasi; B. Wobbes; M. Paul; S. Smeekeens. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. Plant Physiol. 135: 879-890.
- Staskawicz, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. D. G. Ellis. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. Science. 268: 661-667.
- Thevelein, J. M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev. 48:42-59.
- Thevelein, J. M. y S. Hohmann. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? Trends Bio. chem. Sci. 20:3–10.
- Toth, I., K. Bell, M. Choleva, P. Birch. 2003. Soft Rot Erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology 4:17-30, 2003.
- Trick, H. N. y J. J. Finan. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspensión culture tissue. Plant Cell Reports. 17 (6-7):482-488.
- Uhland, K., M. Mondigler, C. Spiess, W. Prinz and M. Ehrmann. 2000. Determinants of translocation and folding of TreF, a trehalase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 275: 23439-23445.

- Van Dijck, P., L. De Rop, K. Szlufcick, E. Van Ael, J. M. Thevelein J. M. 2002. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphatae phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Inf. Immun.* 70. 1772-1782. (a).
- Van Dijck, P., J. O. Mascorro-Gallardo, M. De Bus, K. Royackers, G. Iturriaga, J. M. Thevelein. 2002. Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem. J.* 366: 63-71.
- Van Dijken, A. J. H., H. Schluepmann, S. C. M. Smeekens. 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol.* 135: 969-977.
- Vuorio, O. E., N. Kalkki nen y J. Londes-borough, J. 1993. Cloning of two related genes encoding the 56 kDa and 123 kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Bio chem.* 216: 849-861.
- Wang, G. L., H. J. Fang. *Plant Genetic Engineering: Principle and Technique* (in Chinese), Beijing: Science Press, 1998.
- Weisburd, S. 1998. Death-defying dehydration. *Science News.* 133: 107-110.
- Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeu wen hoek.* 58: 209-217.

Wingler, A., T. Fritzius, A. Wiemken, T. Boller, R. A. Aesbacher. 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *Ap13* and starch synthesis in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 124: 105-114.

Wingler, A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. Phytochemistry. 60: 437-440.

Zahringer H.1997. Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein. FEBS Lett 412(3):615-20.

Zaragoza, O., M. A. Blázquez, and C. Gancedo. 1998. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. J. Bacteriol. 180: 3809-3815.

Zentella, R., J. O. Mascorro-Gallardo, P. Van Dijck, J. Folchmallol, B. Bonini, C. van Vaeck, R. Gaxiola, A. A. Covarrubias, J. Nieto-Sotelo, J. M. Thevelein, G. Iturriaga. 1999. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. Plant Physiol. 119: 1473-1482.

*http://www.isppweb.org/names_bacterial_pant2005.asp

8. ANEXOS

Cuadro 1A. Análisis de varianza para altura de las plantas *in vitro*, número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas a los 30 días de desarrollo en plantas transgénicas con *ScATH1* y WT (sin transformar).

FV	GL	APCS ^z	APSS ^z	NHCS ^z	NHSS ^z	NRCS ^z	NRSS ^z	APA ^z
Tratamiento	9	2.96 ^{NS}	0.25 ^{NS}	0.84 ^{NS}	0.72 ^{NS}	19.67 ^{NS}	20.91 ^{NS}	0.66 ^{NS}
Bloque	1	80.80*	0.03 ^{NS}	0.02 ^{NS}	4.05*	58.89 ^{NS}	64.80 ^{NS}	0.11 ^{NS}
Error	9	2.96	0.24	0.84	0.71	19.67	20.91	0.65
Total	19							
CV		12.92	22.51	4.15	15.25	8.56	254.05	19.39
$\bar{X}$		13.31	2.24	22.03	5.55	51.71	1.80	4.18

^zValores de cuadrados medios; FV: Fuentes de variación; GL: Grados de libertad; CV: Coeficiente de variación; $\bar{X}$: Media; ^{NS}, *, No significativo y significativo a una $P \leq 0.05$; APCS, APSS: Altura de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NHCS, NHSS: Número de hojas de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NRCS, NRSS: Número de raíces de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; APA: Altura de planta a los 30 días posteriores a su aclimatación.

Cuadro 2A. Prueba de comparación de medias de Tukey para altura de las plantas *in vitro*, número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas durante 30 días en plantas transgénicas con *ScATH1* y WT (sin transformar).

Líneas	APCS (cm)	APSS (cm)	NHCS	NHSS	NRCS	NRSS	APA (cm)
<i>ScATH1</i>	15.32 a ^z	2.28 a	22.07 a	5.10 a	53.43 a	22.37 a	4.10 a
WT	11.30 b	2.20 a	22.00 a	6.00 b	50.00 a	19.33 a	4.25 a
DMS *	1.74	0.51	0.93	0.86	4.47	4.63	0.82

^zValores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. *DMS: Diferencia mínima significativa. APCS, APSS: Altura de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NHCS, NHSS: Número de hojas de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NRCS, NRSS: Número de raíces de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; APA: Altura de planta a los 30 días posteriores a su aclimatación.

Cuadro 3A. Análisis de varianza para la variable número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos *in vitro*.

FV	GL	
Número de colonias bacterianas (dilución de 10^{-7}) ^z		
Tratamiento	5	172.67*
Error	30	9.06
Total	35	
CV		38.41
$\bar{X}$		7.83

^zValores de cuadrados medios; FV: Fuentes de variación; GL: Grados de libertad; CV: Coeficiente de variación; $\bar{X}$: Media; *, Significativo a una $P \leq 0.05$;

Cuadro 4A. Prueba de comparación de medias de Tukey para número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos *in vitro*.

Líneas	Número de colonias (dilución de 10^{-7})
9Tre	18.00 a ^z
4Tre	7.67 b
WT2A	7.33 bc
WTJ	6.83 bc
3Tre	4.83 bc
5Tre	2.33 c
DMS*	5.28

^zValores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. *DMS: Diferencia mínima significativa.

Cuadro 5A. Análisis de varianza para altura de las plantas *in vitro*, número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas a los 30 días de desarrollo en plantas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* y WT (sin transformar).

FV	GL	APCS ^z	APSS ^z	NHCS ^z	NHSS ^z	NRCS ^z	NRSS ^z	APA ^z
Tratamiento	9	3.91ns	0.00ns	0.61ns	0.02ns	19.50ns	0.00ns	6.62ns
Bloque	1	876.48*	36.45*	606.10*	197.19*	675.12*	1125.00*	70.88*
Error	9	3.91	0.00	0.61	0.02	19.50	0.00	6.62
Total	19							
CV		10.86	4.16 x 10 ⁻⁶	2.93	1.42	7.76	0	41.96
$\bar{X}$		18.22	1.35	26.71	3.16	56.91	7.50	6.13

^zValores de cuadrados medios; FV: Fuentes de variación; GL: Grados de libertad; CV: Coeficiente de variación; $\bar{X}$: Media; ^{ns},*,*,No significativo y significativo a una $P \leq 0.05$; APCS, APSS: Altura de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NHCS, NHSS: Número de hojas de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NRCS, NRSS: Número de raíces de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; APA: Altura de planta a los 30 días posteriores a su aclimatación.

Cuadro 6A. Prueba de comparación de medias de Tukey para altura de las plantas *in vitro*, número de hojas, número de raíces a los 56 días de desarrollo en medios de cultivo con y sin sacarosa, altura de plantas aclimatadas durante 30 días en plantas transgénicas con *ScTPS1-TPS2* y WT (sin transformar).

Líneas	APCS (cm)	APSS (cm)	NHCS	NHSS	NRCS	NRSS	APA (cm)
<i>ScTPS1-TPS2</i>	24.84 a ^z	0.00 a ^z	32.21 a ^z	0.02 a ^z	62.72 a ^z	0.00 a ^z	8.02 a ^z
WT	11.60 b	2.70 b	21.20 b	6.30 b	51.10 b	15.00 b	4.25 b
DMS*	2.00	0.00	0.79	0.05	4.47	0.00	2.60

^zValores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. *DMS: Diferencia mínima significativa. APCS, APSS: Altura de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NHCS, NHSS: Número de hojas de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; NRCS, NRSS: Número de raíces de planta en medio de cultivo con sacarosa y sin sacarosa respectivamente; APA: Altura de planta a los 30 días posteriores a su aclimatación.

Cuadro 7A. Análisis de varianza para la variable número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos *in vitro*.

FV	GL	
Número de colonias bacterianas (dilución de 10^{-7}) ^z		
Tratamiento	5	33.43*
Error	30	4.37
Total	35	
CV		34.06
$\bar{X}$		6.13

^zValores de cuadrados medios; FV: Fuentes de variación; GL: Grados de libertad; CV: Coeficiente de variación; $\bar{X}$: Media; *, Significativo a una $P \leq 0.05$;

Cuadro 8A. Prueba de comparación de medias de Tukey para número de colonias de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* a una dilución de 10^{-7} a las 32 horas de incubación a partir de tejidos *in vitro*.

Líneas	Número de colonias (dilución de 10^{-7})	
2BI	9.000	a ^z
WT2A	7.333	a
1BI	7.167	a
WTJ	6.833	ab
9BI	3.333	b
10BI	3.167	b
DMS*	3.6719	

^zValores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. *DMS: Diferencia mínima significativa.

Cuadro 13A. Composición del buffer de carga 6X.

Reactivo	Cantidad
Azul de bromofenol	0.25 %
Xylene cianol	0.25 %
Sacarosa	40 %
Solución en H ₂ O	
Se conserva a 4 ó -20 °C.	