UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA:
BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA
FACULTAD DE QUIMICOFARMACOLOGÍA

"TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRESA CON EL GEN DE SNAKINA (*PaSn*) DE AGUACATE NATIVO MEXICANO"

TESIS

Que presenta:

IBQ. SARAÍ SUÁREZ GARCÍA

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS
Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

CO-DIRECTOR DE TESIS
Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
D.C. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ

Morelia, Michoacán, México **Diciembre 2015**

DEDICATORIA

A mis padres

Martha García Victoria y Mario Suárez Colín por su ejemplo de lucha y honestidad. Por haberme forjado como la persona que soy y por sus consejos que han sabido guiarme para enfrentar la vida.

A mis hermanos

Quienes han estado a mi lado, por su cariño y comprensión, por ser ejemplos de capacidad y superación. Espero contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, principalmente al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas (PIMCB) y al CONACYT, por haber financiado mis estudios de maestría.

Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado.

En primer lugar agradezco de manera especial y sincera al D.C. *Rafael Salgado Garciglia* por aceptarme para realizar esta tesis bajo su asesoría. Le agradezco su orientación, paciencia, el haberme facilitado los medios para llevar a cabo las actividades que conforman este trabajo y compartir su experiencia y amplio conocimiento.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a mi co-asesor el D.C. *Rodolfo López Gómez* por su participación en el desarrollo de esta tesis. Debo de destacar por encima de todo su apoyo, orientación, disponibilidad y paciencia, lo cual ha sido un aporte invaluable. Gracias por compartir conmigo su experiencia y sobre todo gracias por haberme hecho sentir parte de su laboratorio en todo momento.

A los Dres., Joel Edmundo López Meza, Héctor Eduardo Martínez Flores y Marco Antonio Cortés Rodríguez, por sus aportes durante los seminarios de evaluación y en la revisión de la tesis.

Aprovecho para agradecer también al M.C. *Luis María Suárez Rodríguez* y a la M.C. *Alejandra Hernández García,* técnicos de los laboratorios de fisiología molecular de plantas y biotecnología vegetal, respectivamente, quienes colaboraron activamente durante el desarrollo de esta investigación. Para ambos, mi más sincero agradecimiento, por sus conocimientos, paciencia y experiencia profesional.

Para mis compañeros, la mayoría de ellos amigos, estén donde estén, tengo solo palabras de agradecimiento, ya que con ellos compartí incontables horas de trabajo y buenos ratos. Por todo el tiempo que me han dado, por el respaldo, generosidad y amistad, en especial a: Israel Baltazar, Christopher Cerriteño, Rosaura Villa, Salvador Castillo, Marco Antonio Hernández, Laura Suárez, Joel Ramírez, Juan Gómez, Manuel Méndez, Tere Correa, Noé Barajas, Fernando Sánchez, Rafael Torres y Huber León. GRACIAS.

También por su ayuda y puntos de vista agradezco a la M.C. *Elda Castro* y al D.C. *Ernesto García*.

Para aquellas amigas que a pesar la distancia han estado conmigo, gracias Tere Del Moral, Mari Cruz Hernández, Yaremi López y Tzitzijani Alcantar.

Y por supuesto el agradecimiento más profundo y sentido, va para mi familia especialmente por aquellos momentos en los que pude ser inferior a sus expectativas, ha sido un camino largo y duro en el que algunas veces el deseo de lograr tus objetivos te hace olvidar las cosas más importantes de la vida.

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE FIGURAS i

ÍNDICE DE CUADROS iv

RESUMEN v

ABSTRACT vi

I. INTRODUCCIÓN GENERAL 1

II. MARCO TEÓRICO 4

2.1. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS 4

2.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS 5

2.2.1. Péptidos antimicrobianos de plantas 9

2.2.2. Clasificación de péptidos antimicrobianos de plantas 11

2.3. SNAKINAS/GASA 13

2.3.1. Actividad antimicrobiana de la snakina-1 y snakina-2 18

2.3.2. Expresión heteróloga en sistemas vegetales de péptidos snakinas/GASA 20

2.3.3. Snakina de aguacate 21

2.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRESA CON GENES DE DEFENSA 23

V. OBJETIVOS 28

5.1. OBJETIVO GENERAL 28

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL 29

Página

VII. RESULTADOS 30

7.1. CLONACIÓN DEL cDNA DEL GEN *PaSn* EN EL VECTOR pCAMBIA2301 Y TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens p*GV2260 30

7.2. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE FRESA (*Fragaria* x *ananassa* cv. Aromas) CON EL GEN DE SNAKINA (*PaSn*) DE AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*)..... 47

VIII. DISCUSIÓN GENERAL..... 59

IX. CONCLUSIÓN..... 64

X. PERSPECTIVAS 65

XI. LITERATURA GENERAL..... 66

XII. ANEXOS..... 72

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estructura predicha y patrones disulfuro de la snakina-1. Comparación entre el modelo molecular final de la snakina-1 y las estructuras de la viscotoxina A3 (tionina) y el EcAMP1 (α- hairpina) (Porto y Franco 2013). 17

Figura 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de snakinas/GASA. Comparación de secuencias de aminoácidos de la subfamilia II (Grupo 1), subfamilia I (Grupo 2) y subfamilia III (Grupo 3). Los aminoácidos conservados a través de todos los miembros de la familia son marcados en negro. Los residuos que son altamente conservados relevantes para la clasificación de las subfamilias son marcados en gris (Berrocal-Lobo *et al*., 2002). 18

Figura 3. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del cDNA del gen *PaSn* de aguacate (snakina; GenBank accession: KC012806). El péptido señal (marcado en gris) es seguido por la secuencia de aminoácidos del péptido maduro (Guzmán-Rodríguez *et al*., 2013a). 22

Figura 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de snakinas/GASA de plantas. Los aminoácidos conservados se señalan con un asterisco. Los residuos de cisteínas están marcados en rojo. Las secuencias incluidas en la alineación son las siguientes: *StSN1* y *StSN2* de la papa; *MtGBRP1* y *MtGBRP2* de *Medicago truncatula*; *CaSN1* de *Capsicum annum*; *JcGAST1* y *JcLTRCOR12* de *Jatropha curcas*; *SlSNP1* de *Solanum lycopersicum*; *FaGAST1* de *Fragaria x ananassa* y *PaSn* de aguacate (Guzmán-Rodríguez *et al*., 2013a). 23

Figura 5. Análisis intersecuencia del cDNA de *PaSn* de aguacate nativo mexicano por NEBcutter (http://www.neb.com/rebase). 36

Figura 6. Secuencia de nucleótidos del cDNA de *PaSn* de aguacate. Los nucleótidos utilizados para el diseño de los oligonucleótidos están marcados en gris. 36

Figura 7. Extracción de ácidos nucleicos de aguacate A) ADN de hoja de aguacate. 1: Marcador de tamaño molecular 1Kb (Vivantis® VC 1kb DNA Ladder Cat. NL1409); 2 y 3: Muestras de hoja de aguacate. B) ARN de semilla de aguacate. 1–6 Muestras de semilla de aguacate. 37

Página

Figura 8. Amplificación por PCR del gen *PaSn* A) A partir de ADN de aguacate 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 3-6: Productos de PCR B) A partir de cDNA de aguacate 1: Marcador de tamaño molecular 100pb; 2: Control negativo; 3–5: Productos de PCR 38

Figura 9. Amplificación por PCR del gen *PaSn* del vector pTriplEx2-*PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2 y 3: Productos de PCR; 4 y 5: Productos de PCR purificados..... 39

Figura 10. Amplificación del gen *PaSn* por PCR en colonia de *E. coli*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 4: Producto de PCR. 40

Figura 11. Digestión de ADN plasmídico. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2 y 3: ADN de la construcción pBluescript-*PaSn* de la clona seleccionada. 40

Figura 12. Mapa del vector PUCpSS. (Incorporación del gen *PaSn* al vector PUCpSS). 41

Figura 13. Amplificación por PCR en colonia de *E. coli*. A) Amplificación del gen *PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 3-6: Productos de PCR. B) Amplificación del gen *uidA*. 1: Marca Marcador de tamaño molecular 100pb; 2: Control negativo; 3-6: Productos de PCR. 42

Figura 14. Células transformadas de *A. tumefaciens* pGV2260 en medio selectivo (YM/Cb/Rf/Kn). A) Control negativo; B) Células transformadas con el vector pCAMBIA-*PaSn*. 43

Figura 15. Amplificación por PCR en colonia de *A. tumefaciens*. A) Amplificación del gen *PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 3-14: Productos de PCR B) Amplificación del gen *uidA*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb; 2: Control negativo; 3-14: Productos de PCR. 43

Figura 16. Estructura de la región ADN-T de la construcción pCAMBIA-*PaSn*. BI: borde izquierdo; *nptII*: neomicina fosfotransferasa; *PaSn*: snakina de aguacate; *uidA* (*GUS*): β-glucuronidasa; BD: borde derecho. 44

Página

Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del cDNA del gen *PaSn* de aguacate identificada por secuenciación de la construcción pCAMBIA-*PaSn*..... 44

Figura 18. Brotes de fresa sin transformar en medio MIB con diferentes concentraciones de kanamicina: A) 0, B) 50, C) 100, y D) 200 mg/L. .. 52

Figura 19. Imágenes representativas del método de transformación genética de fresa por *A. tumefaciens*: A) Explantes de fresa durante el co-cultivo por 24h con *A. tumefaciens* (MS); B) Formación de brotes en explantes de fresa co-cultivados con *A. tumefaciens*, después de 30 días en MIB (MS + 0.5 mg/L de ANA + 0.1 mg/L BA + 500 mg/L cefotaxima); C) Brotes regenerados en segmentos de la corona de la raíz de plántulas de fresa (30 días de cultivo); D) Brotes de fresa resistentes a kanamicina (100 mg/L) (30 días de cultivo); E) Plántula de fresa resistente a kanamicina en medio MDP + kanamicina (30 días de cultivo); F) Plántula de fresa resistente a kanamicina en medio MDP + 1 mg/L de GA3 53

Figura 20. Expresión de la ß-glucuronidasa en plántulas de fresa transformadas. A) Segmento de hoja. B) Segmento de peciolo. 55

Figura 21. Amplificación por PCR directo del gen *PaSn* del ADN de plantas de fresa transformadas con *A. tumefaciens*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control positivo (ADN plasmídico pTriplEx2-*PaSn*); 3: Control negativo (Fresa no transformada); 4-7: Productos de PCR 55

Figura 22. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de snakina de aguacate (*PaSn*) y snakina de fresa (*FaGAST*). Los aminoácidos conservados se indican con un asterisco en la secuencia consenso. 63

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Clasificación de péptidos antimicrobianos de plantas (García-Olmedo *et al*., 2001; de Souza-Candido *et al*., 2014; Nawrot *et al*., 2014). 12

Cuadro 2. Miembros de la familia snakinas/GASA en plantas (Nahirñak *et al*., 2012). 13

Cuadro 3. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen *PaSn*..... 33

Cuadro 4. Mezclas de reacción, componentes y concentraciones para la síntesis de cDNA del gen *PaSn*..... 34

Cuadro 5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR del gen *PaSn*, en negritas los sitios de restricción incorporados. 37

RESUMEN

En la presente investigación la fresa se transformó genéticamente con el gen *PaSn* de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) vía *A. tumefaciens*. El cDNA del gen *PaSn* se aisló del vector pTriplEx2-*PaSn* por PCR. El producto amplificado fue clonado inicialmente en el vector pBluescript KS y posteriormente en el vector PUCpSS para integrar el doble promotor 35SCaMV. El cassette de expresión completo fue liberado e incorporado al vector pCAMBIA2301, la clonación del cDNA del gen *PaSn* fue confirmada por secuenciación. La cepa *p*GV2260 de *A. tumefaciens* se transformó con el vector pCAMBIA-*PaSn* y fue utilizada para realizar los eventos de transformación genética en fresa (*Fragaria* x *ananassa* cv. Aromas). Dicha transformación se realizó por co-cultivo con segmentos de corona de raíz (0.5 cm) de plántulas de fresa. Los explantes fueron cultivados en medio MS con 0.1 mg/L de ácido naftalenacético y 0.5 mg/L de benciladenina para la inducción de brotes y en medio MS con 0.05 mg/L de benciladenina para el desarrollo de plántulas adicionados con 500 mg/L de cefotaxima y/o el antibiótico de selección (100 mg/L de kanamicina) en condiciones *in vitro* a 25°C y 2000 lux a 16 h de fotoperiodo hasta lograr el desarrollo de plántulas resistentes a kanamicina las cuales fueron consideradas posibles transformantes. La transformación se verificó por la presencia del gen *PaSn* por PCR y la expresión de la ß-glucuronidasa con el ensayo de GUS. Los resultados indicaron que las plantas de fresa transformadas con *A. tumefaciens* (pCAMBIA-*PaSn*) expresaron los genes *nptII* y *uidA* involucrados en la transformación. Asimismo se confirmó que el gen *PaSn* de aguacate nativo mexicano, clonado en el vector binario pCAMBIA2301, fue trasferido al genoma de las plantas transformadas de fresa.

Palabras Clave: Aguacate, fresa, *PaSn*, snakina, transformación genética.

ABSTRACT

In the present investigation the strawberry was genetically transformed with the gene *PaSn* of native Mexican avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) via *A. tumefaciens*. The *PaSn* cDNA was isolated from the vector pTriplEx2-*PaSn* by PCR amplification. The amplified product was initially cloned in the vector pBluescript KS and subsequently in the vector PUCpSS to integrate the double CaMV35S promoter. The full expression cassette was released and incorporated into the vector pCAMBIA2301; the cDNA cloning *PaSn* gene was confirmed by sequencing. Strain pGV2260 of *A. tumefaciens* was transformed with the vector pCAMBIA-*PaSn* and was used to carry out the events of genetic transformation in strawberry (*Fragaria* x *ananassa* cv. Aromas). This transformation was realized by co-culture with root crown segments (0.5 cm) of strawberry plantlets. Explants were cultured to induce shoot proliferation in MS medium with 0.1 mg/L of naphtalenacetic acid and 0.5 mg/L of benzyladenine and for the development of seedlings in MS with 0.05 mg/L of benzyladenine added with 500 mg/L of cefatoxime and/or antibiotic selection (100 mg/L of kanamycin), in conditions *in vitro* at 25° C and 2000 lux at 16 h photoperiod until the development of kanamycin-resistant seedlings which were considered possible transformants. The transformation was verified by the presence of the gene *PaSn* by PCR and expression of the β-glucuronidase GUS assay. The results are indicative that the strawberry plants transformed with *A. tumefaciens* (pCAMBIA-*PaSn*) expressed genes *nptII* and *uidA* involved in the transformation. Also, it was confirmed that *PaSn* gene of native mexican avocado, cloned in the binary vector pCAMBIA2301, was transferred into the genome of the transformed plants of strawberry.

Key words: Avocado, strawberry, *PaSn*, snakin, genetic transformation.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los organismos vivos incluyendo las plantas, han desarrollado diversos mecanismos para protegerse contra la invasión por patógenos (Kovalskaya *et al*., 2011), estos mecanismos incluyen la síntesis de péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana. Numerosos péptidos antimicrobianos (PAs) han sido descubiertos en plantas y animales, participando como componentes clave de la defensa innata contra microorganismos patógenos (Balaji *et al*., 2012). Un gran número de familias de PAs de plantas han sido descritas, la mayoría de estos péptidos son ricos en cisteínas incluyendo principalmente a las defensinas, proteínas de transferencia de lípidos (LTP), péptidos de tipo heveína y de tipo knotina y la familia snakinas/GASA que son péptidos de 12-cisteínas, que han sido aislados originalmente de papa (García-Olmedo *et al*., 2001).

Recientemente los PAs han sido sujeto de interés como candidatos primarios para la protección en plantas, ya que presentan un amplio rango de actividad contra bacterias, hongos, virus y protozoos provocando un daño celular rápido. Estas características resaltan el uso potencial de los PAs en el mejoramiento de plantas para el desarrollo de tolerancia a patógenos en los cultivos vegetales (Kovalskaya *et al*., 2011.) Mediante la transformación genética de plantas se han insertado genes que codifican para este tipo de péptidos obteniendo plantas transgénicas con tolerancia a diversos microorganismos patógenos (García-Olmedo *et al*., 2001). La disminución de la susceptibilidad a la infección por patógenos como resultado de la producción de PAs en plantas transgénicas, ha sido reportada para las tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, defensinas, snakinas y otras proteínas antimicrobianas que han sido aisladas de diferentes plantas como *Vigna unguiculata, Arabidopsis thaliana, Medicago sativa, Raphanus sativus, Solanum tuberosum* y *Leonurus japonicus* (Molina y García-Olmedo 1997; *Segura et al*., 1999*;* Gao *et al*., 2000; Saitoh *et al*., 2001; Berrocal-Lobo *et al*., 2002; Yuan-Li *et al*., 2005; Franco *et al*., 2006).

Diversos genes de PAs han sido expresados en plantas transgénicas de solanáceas como *Solanum tuberosum, S. lycopersicum, Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*. Las propiedades antimicrobianas de estas proteínas recombinantes se han evaluado contra un amplio rango de bacterias y hongos fitopatógenos en ensayos *in vitro* e *in vivo*, demostrando su actividad antimicrobiana (Gao *et al*., 2000; Berrocal-Lobo *et al*., 2002; Franco *et al*., 2006; Kovalskaya *et al.,* 2009).

En la papa (*Solanum tuberosum*) se han identificado y aislado PAs, entre ellos defensinas y snakinas/GASA. Los péptidos snakina-1 (SN1) y snakina-2 (SN2) fueron aislados de tubérculos de papa y presentan actividad *in vitro* contra hongos y bacterias fitopatógenas (Segura *et al*., 1999; Berrocal-Lobo *et al*., 2002). Asimismo genes homólogos a estos péptidos se han identificado y caracterizado en un gran número de especies, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas (Furukawa *et al*., 2006). En particular se ha explorado la función biológica *in vivo* de la snakina-1 (*StSN1*) de papa y su uso potencial para el desarrollo de plantas transgénicas, con resistencia a un amplio espectro de fitopatógenos (Almasia *et al*., 2008). Tal es el caso de la sobreexpresión de *StSN1* en plantas transgénicas de papa (Almasia *et al.,* 2008) y trigo (Faccio *et al.,* 2011), donde se consiguió la tolerancia a *Rhizoctonia solani, Erwinia carotovora* y *Blumeria graminis*. Por lo tanto, estos PAs podrían ser utilizados potencialmente en la agricultura, para la protección de cultivos vegetales (Barbosa *et al*., 2011; Nawrot *et al*., 2014).

Diversas investigaciones han demostrado que en aguacate se sintetizan moléculas de defensa de diversa naturaleza química. Recientemente se han identificado algunos PAs tipo defensinas y snakinas/GASA que pueden estar formando parte de los mecanismos de defensa y ser los posibles responsables de la tolerancia a ciertos microorganismos patógenos de esta planta (Domergue *et al.,* 2000; Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013a; Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013b).

En nuestro grupo de investigación se han identificado genes de defensa en frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), uno de ellos es el gen *PaSn* expresado en la semilla de aguacate, que codifica un péptido antimicrobiano (PA) de la familia snakinas/GASA (GenBank: KC012806), el cual fue evaluado en un sistema heterólogo presentando actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, permaneciendo hasta ahora desconocida su actividad antifúngica (Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013a).

La expresión heteróloga es una herramienta con la que pueden generarse plantas tolerantes a hongos, conteniendo genes que codifican diversas proteínas antimicrobianas destacando las quitinasas, glucanasas y taumatinas (Selitrennikoff, 2001). Esta tecnología se presenta con un alto potencial para ser utilizada en plantas de alto valor agronómico, susceptibles a enfermedades fúngicas. Tal es el caso de fresa y otras frutillas, que presentan susceptibilidad al ataque del hongo *Botrytis cinerea*, causante del moho gris, el cual afecta los cultivos durante las etapas de cosecha y poscosecha, afectando significativamente los niveles de producción. Convirtiéndose en una necesidad obtener plantas que muestren resistencia genética a este tipo de patógenos (Schestibratov y Dolgov 2005).

Por lo anterior en la presente investigación se planteó realizar la transformación genética de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Cv. Aromas) mediante *Agrobacterium tumefaciens*, con el gen de la snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

Las plantas y los animales están en contacto con una amplia diversidad de bacterias y hongos, pero solo en ciertos casos esta asociación resulta en el desarrollo de enfermedades, esto se debe a la existencia de los sistemas de defensa (Segura *et al*., 1999). El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa en las plantas (Ordeñana-Madriz*,* 2002). Estos mecanismos son complejos y se pueden clasificar, de acuerdo al momento de su expresión, en constitutivos, si están presentes durante todo el ciclo de vida de la planta; e inducidos, si su expresión se evidencia en mayor proporción ante la presencia de un patógeno. A su vez, estas barreras pueden ser físicas o químicas (García-Olmedo *et al*., 2001; Rojas-Arias *et al*., 2010).

Los mecanismos de resistencia constitutivos físicos incluyen capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras entre otros. Los mecanismos constitutivos químicos son compuestos tóxicos que se acumulan en las células. En conjunto estas barreras constitutivas, también denominadas preformadas, componen la primera línea de defensa de la planta y pueden prevenir eficientemente la invasión de muchos microorganismos en donde generalmente no se involucra una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno. Por otra parte los mecanismos inducidos de defensa, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno. La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno. Una vez que el patógeno ha sido reconocido se activan una serie de mecanismos mediante cascadas de señales que aún no han sido completamente caracterizadas (Ordeñana-Madriz*,* 2002; Rojas-Arias *et al*., 2010).

Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los principales responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance de patógenos. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible, producción de especies reactivas de oxígeno, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (fitoalexinas), producción de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno. La aparición de una respuesta hipersensible no solamente restringe el crecimiento del patógeno sino también precede, y puede ser la causa directa de la activación de un proceso de señalización, que conduce a la expresión sistémica de una colección de genes PR y una resistencia no específica, reforzada y duradera contra un amplio rango de patógenos, conocida como respuesta sistémica adquirida (SAR) (Ordeñana-Madriz, 2002; Rojas-Arias *et al*., 2010). Existe un número elevado de proteínas que han sido descritas como parte de los mecanismos de defensa vegetal, agrupadas como proteínas PR de las cuales se conocen unos 17 grupos, entre ellos las glucanasas y quitinasas (Cortés-Rodríguez *et al*., 2010). Recientemente se ha indicado que animales y plantas comparten algunas características en sus estrategias de defensa como la existencia de una amplia variedad de pequeños péptidos antimicrobianos que se piensa que son moléculas efectoras de inmunidad no específica o innata (Segura *et al*., 1999; Rivas-Santiago *et al*., 2006).

2.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los PAs están ampliamente distribuidos en la naturaleza, desempeñando una función de protección importante en los seres vivos. Son un grupo abundante y diverso de moléculas que se producen por muchos tejidos y tipos de células en una variedad de invertebrados, especies de plantas y animales (Brogden, 2005).

Los PAs son producidos por los organismos como parte de la primera línea de defensa (eucariotes) o como primera estrategia para competir por nutrientes y espacio (procariotes), representan uno de los elementos de la inmunidad innata que tiene un papel crucial para combatir las infecciones (López-Meza *et al*., 2011). Son péptidos de bajo peso molecular codificados en el genoma. Estas moléculas son usualmente péptidos cortos (12-100 residuos de aminoácidos), tienen una carga positiva (+2 a +9) aunque también hay neutros y cargados negativamente. Son anfipáticos lo que les concede estabilidad en ambientes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos y han sido aislados de bacterias, plantas y animales. Pueden presentar modificaciones post-traduccionales como glicosilación, circularización, amidación de los extremos y modificación de aminoácidos incluyendo D-aminoácidos (Montaño-Pérez y Vargas-Albores 2002; Powers y Hancock, 2003; López-Meza *et al*., 2011; de Souza-Candido *et al*., 2014).

Se expresan de forma constitutiva o inducida dependiendo del tipo de organismo y tejido en el que estén presentes al momento de la infección y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, protozoos, e incluso en algunos casos antiviral y anticancerígena (Montaño-Pérez y Vargas-Albores 2002; Powers y Hancock, 2003; Diamond *et al*., 2009).

A pesar de que el carácter catiónico de los PAs asociado con su tendencia a ser anfipáticos facilite su interacción e inserción en las paredes celulares y membranas de fosfolípidos de los microorganismos, se han propuesto varios mecanismos que explican su modo de acción (Rojas-Arias *et al.,* 2010). El mecanismo general por el que los PAs dañan la membrana plasmática es considerado universal y está basado en interacciones electrostáticas constituyendo el primer paso de acción. Una vez que los péptidos están en contacto con la célula bacteriana deben pasar a través de los lipopolisacáridos o ácidos teicoico y lipoteicoico para interaccionar con la membrana.

El segundo paso es la permeabilización de la membrana llevada a cabo por diversos mecanismos basados en la formación de poros debido a interacciones y arreglos de los PAs, esto conduce a una lisis celular por choque osmótico. Estos mecanismos pueden variar dependiendo de los diferentes tipos de PAs, su concentración y el organismo con el que interactúan (López-Meza *et al*., 2011).

Los principales mecanismos de permeabilización de la membrana descritos son los modelos de barril, de alfombra y de poro toroidal. Además se han propuesto algunos otros como la electroporación molecular y perforación de balsas lipídicas (Brogden, 2005; Bechinger y Lohner 2006; Dawson y Liu 2008; Téllez y Castaño 2010; Barbosa *et al*., 2011; López-Meza *et al*., 2011). A continuación se describen los modelos de acción de los PAs.

1. Modelo de barril: Este modelo propone que inicialmente un grupo de moléculas de PAs catiónicos con estructuras hélice-α interactúan uno con otro en la superficie de la membrana para formar un complejo. Posteriormente los péptidos son orientados perpendicularmente a la membrana permitiendo que la región hidrofóbica de los péptidos interactué con la región hidrofóbica de la bicapa, mientras la superficie hidrofílica de los péptidos es orientada al interior formando un canal hidrofílico a lo largo de la membrana, comportándose como un poro insertado en la misma. La formación de estos canales causa una alteración en el potencial de la membrana, provoca la salida de solutos y eventualmente resulta en la lisis celular.

2. Modelo de alfombra: En este modelo se propone que los PAs catiónicos se unen a los fosfolípidos de la membrana, cubriendo la bicapa como alfombra pero sin insertarse en ella. Al comienzo de esta interacción los péptidos se reorientan en paralelo a la membrana, cuando los péptidos alcanzan una concentración crítica, los monómeros rotan y se reorientan al núcleo hidrofóbico de la membrana causando la formación de micelas y el colapso de la membrana. Este modelo explica el mecanismo de acción de péptidos con tamaño pequeño que van de 23 a 24 residuos de aminoácidos que no cruzan la membrana plasmática y cuyo mecanismo de acción no puede ser explicado por el modelo de barril.

3. Modelo de poro toroidal: Este modelo explica el mecanismo de acción de péptidos catiónicos con estructura hélice-α y de los que forman enlaces disulfuro. Inicialmente el péptido se orienta paralelamente a la membrana y se une a la región polar de los fosfolípidos en un estado inicialmente inactivo. Cuando la relación molar péptido-lípido es excedida los péptidos son reorientados perpendicularmente al plano de la bicapa, en conjunto con varios lípidos se invierten al interior de la región hidrofóbica de la membrana. Estos forman un complejo péptido-lípido que causa la ruptura irreversible de la membrana. La transición entre la etapa inactiva y activa del péptido unido a la membrana depende de la concentración del PA y la composición de fosfolípidos de la bicapa.

4. Modelo de electroporación molecular: En este modelo, los PAs son asociados a la membrana bacteriana generando una diferencia de potencial. El poro es generado cuando la diferencia de potencial alcanza 0.2 V.

5. Modelo de perforación de balsa lipídica: Este modelo propone que la unión de un PA anfipático causa un desequilibrio de masa y por lo tanto un incremento en la curvatura de la membrana que provoca suficiente fuerza para translocarse a través de ella, hundiéndose y generando un poro en donde los péptidos podrían estar en ambos lados de la membrana.

Los péptidos que no actúan en las membranas lo hacen en otros sitios del citoplasma. Se ha propuesto que la translocación a través de la membrana ocurre por procesos relacionados a la agregación micelar donde la alteración es transitoria y no ocurre permeabilización (Powers y Hancock, 2003). Se ha demostrado que algunos PAs logran transportarse a través de la membrana acumulándose intracelularmente y de esta forma interfieren en procesos celulares esenciales que incluyen la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática y la síntesis de la pared celular los cuales inducen la muerte celular (Brogden, 2005). Algunos PAs, como la buforina II no tienen su función sobre la membrana y son capaces de traspasarla, acumularse internamente y unirse al ADN (Powers y Hancock, 2003). Otros péptidos como PR-39, dermaseptina, pleurocidina y péptido-1 son capaces de alterar la síntesis proteica, al interrumpir la incorporación de histidinas y alterar las enzimas involucradas en la síntesis proteica. Los péptidos pirrocoricina y drosocina actúan sobre el plegamiento de las proteínas mediante la inhibición de chaperonas específicas de las bacterias (Téllez y Castaño, 2010).

2.2.1. Péptidos antimicrobianos de plantas

Los PAs de plantas son diversos tanto en composición de aminoácidos como en estructura y presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, han sido aislados de raíces, semillas, flores, tallos y hojas, demostrando actividad hacia fitopatógenos y bacterias patógenas de humanos (Barbosa *et al*., 2011; Nawrot *et al*., 2014).

El primer PA aislado de una especie de planta fue una purotionina de trigo (Barbosa *et al*., 2011; Nawrot *et al*., 2014). Los PAs de plantas constituyen parte de los mecanismos de defensa y pueden ser expresados constitutivamente en ciertos tejidos (almacenamiento y reproducción) o pueden ser inducidos en respuesta al ataque de un patógeno, aunque carecen de la sofisticación de la inmunidad adaptativa de vertebrados ofrecen una rápida protección contra patógenos. Además se conocen algunos genes que se expresan constitutivamente produciendo suficiente proteína (LTP4 de cebada) y al mismo tiempo pueden ser inducidos por algunos patógenos (Segura *et al*., 1999).

Comparados con la producción y acción de metabolitos secundarios, los PAs son liberados inmediatamente después de que la infección es producida, son expresados por un solo gen y por lo tanto requiere menos biomasa y gasto de energía. Los PAs caracterizados en plantas tienen un peso molecular en el rango de 2 a 10 kDa, son básicos y contienen 4, 6, 8 y 12 cisteínas que forman puentes disulfuro, lo que les confiere estabilidad estructural y termodinámica (Thomma *et al*., 2002; Lay y Anderson 2005; López-Meza *et al*., 2011). La mayoría de los PAs estudiados son el producto de proteínas que contienen un péptido señal y una región correspondiente al péptido maduro. La presencia, longitud y posición relativa de estas regiones varía entre las diferentes familias. Solo el péptido maduro es el que interactúa con el microorganismo (Lay y Anderson 2005; López-Meza *et al*., 2011).

El principal papel de los PAs es el de proteger a las plantas de infecciones por patógenos, así que su actividad es directa y principalmente contra hongos y bacterias aunque en algunos casos han mostrado actuar contra depredadores animales. Cuando los PAs de diferentes familias son producidos por los mismos tejidos actúan sinérgicamente contra patógenos lo que contribuye a aumentar la defensa en un amplio rango de microorganismos (Padovan *et al*., 2010).

Los PAs de plantas son activos contra bacterias a bajas concentraciones. El péptido Pp-Tionina muestra actividad contra *Rhizobium meliloti, Xanthomonas campestris, Micrococcus luteus* y *Clavibacter michiganensis* a una IC_{50} <50µg/mL. Por otra parte los PAs Pp-AMP1 y Pp-AMP2 de *Phyllostachys pubescens* tienen actividad potencial contra varios fitopatógenos, incluyendo *Erwinia carotovora, Agrobacterium radiobacter, A. rhizogenes*, *C. michiganensis* y *Curtobacterium flacumfaciens* a concentraciones variables que van de 13 a 25 µg/mL. Además el ciclopsicótrido A de *Psychotria longipes* y las circulianas A y B de *Chassalia parviflora* muestran un efecto antibacteriano contra patógenos humanos como *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris* y *Klebsiella oxytoca* en concentraciones micromolares. Hasta ahora son pocos los reportes sobre el mecanismo de acción de los PAs de plantas sin embargo estas moléculas tienen algunas características importantes responsables de su actividad antimicrobiana incluyendo su estructura anfipática, su plegamiento y carga catiónica a pH fisiológico. En general estos PAs actúan por la formación de poros resultando en fugas de iones o metabolitos, despolarización e interrupción del proceso de respiración, síntesis de biopolímeros y muerte celular. Además algunos estudios han mostrado que los PAs de plantas pueden actuar en blancos específicos (Barbosa *et al*., 2011).

2.2.2. Clasificación de péptidos antimicrobianos de plantas

Numerosas familias de PAs han sido descritas y clasificadas en plantas basándose en la homología de su estructura primaria y el patrón de puentes disulfuro (Cuadro 1). Las tioninas fueron las primeras cuya actividad contra patógenos de plantas fue demostrada *in vitro*. Posteriormente varias familias de péptidos ricos en cisteínas han sido caracterizados incluyendo las defensinas, proteínas de transferencia de lípidos (LTP), péptidos de tipo heveína y de tipo knotina, así como péptidos MBP-1 y un grupo de péptidos (Ib-AMP) aislados de las semillas de *Impatiens balsamina* (García-Olmedo *et al*., 2001).

Cuadro 1. Clasificación de péptidos antimicrobianos de plantas (García-Olmedo *et al*., 2001; de Souza-Candido *et al*., 2014; Nawrot *et al*., 2014).

FAMILIA	NÚMERO DE RESIDUOS	NÚMERO DE PUENTES DISULFURO	TIPOS/ SUBFAMILIAS	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
LTPs	90-95	3-4	I – II	Bacterias y hongos
Snakinas/GASA	61-70	6	I – III	Bacterias y hongos
Defensinas	45-54	4	I – IV	Bacterias y hongos
Tioninas	45-47	3-4		Bacterias y hongos
Tipo heveína	43	4	I	Bacterias Gram (+) y hongos
Tipo knotina	36-37	3	I	Bacterias Gram (+) y hongos
Seferdinas	28-38	0 (lineal)	I – II	Bacterias y hongos
MBP-1(α - hairpinas)	33	2	I	Bacterias y hongos
Péptidos macrocíclicos	29-31	3	I – III	Bacterias Gram (+)
Ib-AMPs	20	2	I	Bacterias Gram (+) y hongos
2S Albúminas		4	I	Bacterias y hongos
Puroindolinas		5	I – II	Bacterias y hongos
GRP			I – III	Bacterias y hongos
α ß-Trumpet	38	2	I	Hongos

Otros PAs de plantas incluyen a la familia snakinas/GASA que son péptidos de 12-cisteínas aislados de papa; las seferdinas, que son péptidos lineales ricos en glicina e histidina aislados de *Capsella bursa-pastoris*; los péptidos macrocíclicos que han sido purificados de diferentes plantas de la familia *Rubiaceae* en una selección de compuestos anti-VIH (García-Olmedo *et al*., 2001). Algunos otros PAs recientemente reportados son las puroindolinas aisladas de endospermo de trigo; las 2S albúminas ricas en glutamina; las proteínas ricas en glicina GRP que comúnmente se encuentran en las familias *Brassicaceae*, *Solanaceae* y *Panicoideae*; y α ß-Trumpet (Ps-AFP1) un nuevo péptido aislado de *Pisum sativum* (de Souza-Candido *et al*., 2014; Nawrot *et al*., 2014).

2.3. SNAKINAS/GASA

Las snakinas constituyen una familia de PAs que muestran similitud con miembros de proteínas de la familia GAST (gibberellic acid stimulated transcript) y GASA (gibberellic acid stimulated in *Arabidopsis*), por lo que han sido clasificados como miembros de una nueva familia nombrada snakinas/GASA (Padovan *et al.,* 2010). Aunque comparten ciertos motivos o dominios con venenos hemotóxicos de víboras (desintegrinas) carecen del motivo “RGD” que es el responsable de la actividad de éstos (Berrocal-Lobo *et al.,* 2002). Diversos miembros de proteínas snakinas/GASA han sido identificados en un amplio rango de especies (Cuadro 2) La identificación de estos genes en especies relativamente alejadas filogenéticamente destaca la importancia de las snakinas/GASA, sugiriendo que cumplen funciones esenciales en la planta (Nahirñak *et al*., 2012).

Cuadro 2. Miembros de la familia snakinas/GASA en plantas (Nahirñak *et al*., 2012).

NOMBRE COMÚN	GÉNERO Y ESPECIE	GENES
Tomate	*Solanum lycopersicum*	*GAST1,RSI-1*
Petunia	*Petunia hybrida*	*GIP1-5*
Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	*GASA 1-15*
Papa	*Solanum tuberosum*	*StSN1-2*
Frijol	*Phaseolus vulgaris*	*FBCBP*
Arroz	*Oryza sativa*	*OsGASR1-2,OsGSR1*
Gerbera	*Gerbera hybrida*	*GEG*
Fresa	*Fragaria ananassa*	*FaGAST*
Hayuco	*Fagus sylvatica*	*FsGASA4*
Maíz	*Zea mays*	*ZmGSL1-10*
Soya	*Glicine soja*	*GSGASA1*
Pimiento	*Capsicum annuum*	*CaSn*
Alfalfa	*Medicago sativa*	*MsSN1*

Los genes de las snakinas/GASA codifican pequeñas proteínas en donde tres dominios pueden ser definidos. 1) Un péptido señal de 18-29 residuos, 2) Una región variable divergente en composición y longitud de secuencia y 3) Una región C-terminal de aproximadamente 60 aminoácidos conteniendo 12 residuos de cisteínas en posiciones conservadas nombrada dominio GASA (Nahirñak *et al*., 2012). A pesar de sus características en común sus funciones no son completamente definidas y se conoce poco sobre su modo de acción, pero en contraste con otros PAs de plantas, ellos no interactúan con membranas lipídicas artificiales (Caveiro *et al.,* 1997; Segura *et al.,* 1999; Berrocal-Lobo *et al.,* 2002). Ninguna de las secuencias de las snakinas posee dominios o sitios activos y aunque muchos estudios han intentado determinar sus funciones en numerosas especies de plantas, su actividad bioquímica aún no es totalmente entendida. El hecho de que el número y posición de las cisteínas permanece igual a lo largo de la evolución sugiere que estos residuos juegan un papel central y son importantes para determinar su función estructural bioquímica (Nahirñak *et al*., 2012).

La mayoría de los genes de snakinas/GASA son regulados por fitohormonas y participan en rutas de señalización modulando respuestas y niveles hormonales. El gen *GAST1* fue el primer miembro identificado de esta familia mostrando ser inducido por ácido giberélico (AG3). Desde entonces numerosos genes de snakinas/GASA han sido descritos y muchos de estos son reportados transcripcionalmente regulados por esta fitohormona. La aplicación exógena de AG3 ha mostrado incrementar el nivel de transcripción en 6 de los 15 genes GASA, en los genes *OsGSR1* y *FaGAST* así como en los genes GEG, genes GIP y genes *OsGASR*. La regulación de genes por AG3 fue inicialmente considerada una característica definitiva de toda la familia sin embargo esta regulación no pudo ser probada para todos los miembros ya que en contraste, la expresión de otros genes es inhibida por esta fitohormona (*GASA5*, *GASA9* y *GASA 11* así como *SN2*) o incluso no es afectada (*StSN1*, *GASA10*, *GASA12*, *GASA14* y *GASA15*) (Nahirñak *et al*., 2012).

Igualmente la respuesta a ácido abscísico (ABA), ha sido reportada en varios de los genes de snakinas/GASA. La expresión de los genes *GASA 2, 3* y *14* es inducida después de tratamientos con ABA y no es afectada por AG3 mientras la expresión del gen *GASA9* es inhibida por AG3 y ABA. El ABA actúa como un antagonista en la expresión de los genes *GAST1*, *GIP1*, *GASA 4-7* y *StSN2*. De acuerdo con estos reportes los análisis de promotores GASA han revelado un alto número de elementos *cis* relacionados al AG3 y ABA. La participación de otras fitohormonas en la modulación de la expresión de ciertos genes de snakinas/GASA, revela un patrón de regulación aún más complejo para estos genes. En conjunto, estos resultados sugieren que proteínas tipo snakinas participan en la interacción entre diferentes rutas de señalización hormonal y además están involucradas en el desarrollo de la planta y respuestas al ambiente (Nahirñak *et al*., 2012).

La expresión de los genes snakinas/GASA ha sido descrita en diferentes órganos de la planta, lo cual se relaciona a ciertas etapas de desarrollo. Cada miembro de la familia es altamente específico y restringido para definir tejidos, cada uno muestra un patrón de expresión distinto. Todos correlacionan con tejidos jóvenes y órganos de crecimiento activos, sugiriendo que están involucrados en procesos celulares como elongación o división celular. Por ejemplo en fresa, la expresión del gen *FaGAST* es alta en frutos y raíces, pero muy baja en hojas y estolones y dentro del fruto, esta expresión ha sido detectada en el receptáculo y no en aquenios, mientras en raíces se limita a las células del final de la zona de elongación. En Arabidopsis, la expresión de los genes *GASA8* y *GASA10* fue detectada en todos los órganos analizados. Las funciones asignadas de estos genes han sido principalmente basadas en análisis de perfil de expresión, secuencia variable N-terminal y la caracterización fenotípica de plantas mutantes y transgénicas (Nahirñak *et al*., 2012).

Por otra parte se ha demostrado que estos PAs juegan papeles importantes en etapas de desarrollo incluyendo la formación de la raíz, el crecimiento del tallo, el tiempo de floración y la maduración del fruto. Además, los miembros de esta familia han sido involucrados en respuesta a estrés biótico y abiótico como la defensa contra patógenos, la tolerancia a estrés por calor y estrés salino y oxidativo (Nahirñak *et al*., 2012).

En general las snakinas/GASA podrían actuar como integradores de señales internas y ambientales participando en la homeostasis hormonal para modular el desarrollo de plantas y la tolerancia a estrés. Se ha sugerido que participan en respuesta a estrés regulando la homeostasis redox a través de su dominio conservado de cisteínas ya que se ha demostrado que en algunos casos actúan como antioxidantes, permaneciendo aún desconocido como esta actividad antioxidante puede afectar las respuestas fisiológicas y de desarrollo (Nahirñak *et al*., 2012).

A pesar de la presencia de un péptido señal y la falta de otras señales de orientación, no todas las proteínas snakinas son dirigidas a la pared celular y/o matriz extracelular. Es posible que las modificaciones post-traduccionales, interacciones electrostáticas, enlaces covalentes para lípidos de membrana o interacción con otras proteínas sean responsables de su localización. Por otra parte el dominio C-terminal altamente conservado es esencial para su actividad bioquímica y probable responsable de su estructura proteica y/o interacciones proteicas (Nahirñak *et al*., 2012).

Entre los PAs de plantas que son estabilizados por cisteínas, las snakinas/GASA no tienen una caracterización estructural. Por lo tanto no hay información sobre su estructura tridimensional o sus patrones de unión de las cisteínas. El péptido snakina-1 ha sido seleccionado como un prototipo para describir la predicción *in silico* de la estructura tridimensional de esta familia (Porto y Franco 2013).

El modelo tridimensional generado por la snakina-1 fue una proteína compuesta de una -hélice 3_{10} y dos largas hélices-α conectadas por loops y estabilizadas por seis puentes disulfuro (Figura 1) (Porto y Franco 2013). Hay dos clases de PAs de plantas con una estructura compuesta de dos largas hélices-α las tioninas y las α-hairpinas. Este grado de similitud estructural con las tioninas refuerza la idea de que algunas clases de PAs de plantas ricos en cisteína podrían tener un ancestro en común. A pesar de la similitud estructural con las tioninas, los mecanismos de acción de las snakinas todavía no están claros. Las tioninas parecen ser capaces de agregar e inducir fugas en vesículas cargadas negativamente; mientras las snakinas son capaces de agregar vesículas de manera similar pero no pudieron causar fugas citoplasmáticas (Porto y Franco 2013).

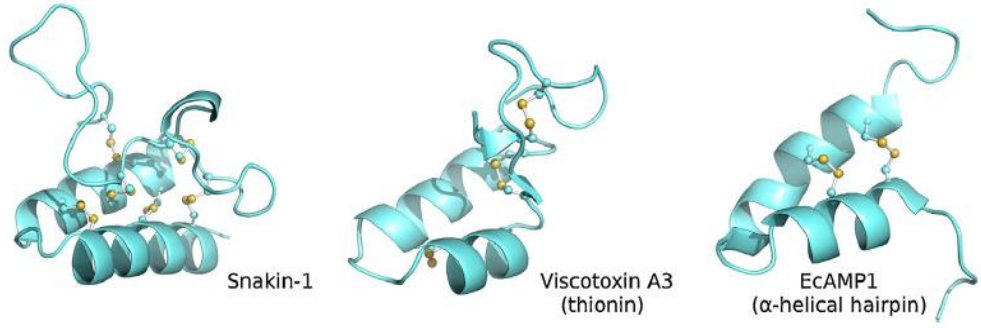


Figura 1. Estructura predicha y patrones disulfuro de la snakina-1. Comparación entre el modelo molecular final de la snakina-1 y las estructuras de la viscotoxina A3 (tionina) y el EcAMP1 (α- hairpina) (Porto y Franco 2013).

La familia de snakinas/GASA puede ser clasificada en tres subfamilias (I-III) en base a los alineamientos de secuencias de aminoácidos (Figura 2). Un número de motivos son los que definen cada una de las tres subfamilias. La SN1 y SN2 son los únicos miembros purificados, que representan la subfamilia I y II respectivamente, mientras que miembros de la subfamilia III no han sido aislados (Berrocal-Lobo *et al.,* 2002).

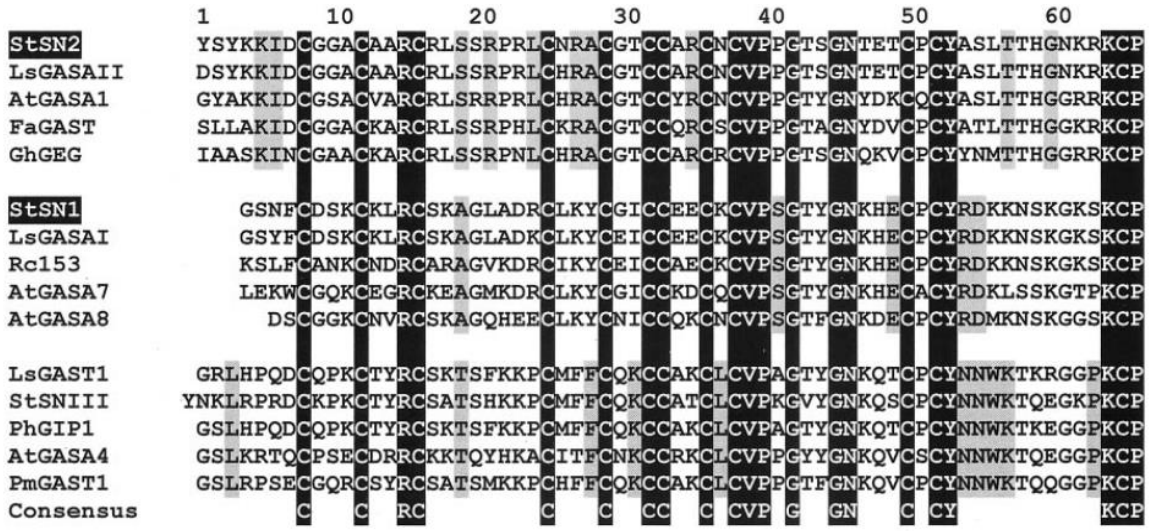


Figura 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de snakinas/GASA. Comparación de secuencias de aminoácidos de la subfamilia II (Grupo 1), subfamilia I (Grupo 2) y subfamilia III (Grupo 3). Los aminoácidos conservados a través de todos los miembros de la familia son marcados en negro. Los residuos que son altamente conservados relevantes para la clasificación de las subfamilias son marcados en gris (Berrocal-Lobo *et al*., 2002).

2.3.1. Actividad antimicrobiana de la snakina-1 y snakina-2

Las primeras snakinas/GASA de origen vegetal fueron caracterizadas en papa (*S. tuberosum*) (Kovalskaya y Hammond, 2009), éstas comprenden a la snakina-1 (SN1) y la snakina-2 (SN2) cuyos péptidos están asociados a la pared celular (Nawrot *et al*., 2014). La SN1 fue aislada de tubérculos de papa (*S. tuberosum* cv. Desireé) y es activa en concentraciones < 10µM contra hongos y bacterias patógenas de papa y otras especies de plantas. La SN1 causa agregación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Este péptido contiene 63 aminoácidos de los cuales 12 son cisteínas. Los patrones de expresión del gen *StSN1* sugieren que la proteína SN1 puede ser un componente de la barrera de defensa constitutiva, ya que su expresión es especialmente en los órganos de almacenamiento y reproducción (tubérculos, tallos, brotes axilares, brotes florales jóvenes, pétalos y carpelos) (Segura *et al*., 1999).

El gen *StSN1* no responde a estímulos bióticos ni abióticos incluyendo AG3, esto no excluye la posibilidad de que otros miembros de esta familia en la papa respondan fuertemente a alguno de estos estímulos. La SN1 ha sido probada como efectiva contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, Fusarium solani, Bipolaris maydis* y *Colletotrichum lagenarium* (Segura *et al*., 1999) así como *C. coccoides* y *Botrytis cinerea* (Kovalskaya y Hammond, 2009).

Asimismo la SN2, fue aislada de tubérculos de papa (*S. tuberosum* cv. Jaerla), es activa contra hongos y bacterias patógenas de plantas y causa una agregación rápida de bacterias Gram positivas y Gram negativas. El gen *StSN2* es expresado en tubérculos desarrollados, tallos, flores, ápices y hojas, pero no en raíces o estolones y es regulado localmente por heridas y por tratamientos con ABA. La expresión de este gen es regulada después de la infección de tubérculos de papa con hongos y bacterias. Estas observaciones sugieren que el gen *StSN2* es un componente de barreras de defensa constitutiva e inducida. La SN2 ha sido probada como efectiva contra *C. michiganensis, R. meliloti*, *B. cinerea*, *A. flavus*, *B. maydis*, *C. lagenarium*, *C. graminicola*, *F. solani, F. culmorum, F. oxysporum f. sp. conglutinans* y *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Berrocal-Lobo *et al.,* 2002).

Aunque los genes *StSN1* y *StSN2* muestran solo un 38% de similitud en su secuencia de aminoácidos tienen un espectro de actividad antimicrobiana similar (Berrocal-Lobo *et al.,* 2002). La capacidad para agregar bacterias Gram positivas y Gram negativas, no está correlacionada con la actividad antimicrobiana de estos péptidos (Segura *et al*., 1999; Berrocal-Lobo *et al.,* 2002).

El sinergismo entre las snakinas/GASA y otros tipos de péptidos como las defensinas sugiere que la acumulación de estos péptidos en un tejido dado puede representar una barrera constitutiva efectiva y de amplio espectro contra bacterias y hongos patógenos (Berrocal-Lobo *et al.,* 2002; Padovan-Lara *et al.,* 2010).

Se ha reportado que la acción *in vitro* de la SN1 y la defensina PTH1 (*StPTH1*) de papa es sinérgica contra *C. michiganensis* además de tener actividad contra el hogo *B. cinerea* (Segura *et al*., 1999). La proteína SAP es una proteína hibrida que está conformada por los PAs SN1 y PTH1 de la papa, la proteína fue producida en *E. coli* y evaluada *in vitro* contra organismos fitopatógenos, presentando una alta actividad antimicrobiana contra *C. michiganensis* y *C. coccoides* con una completa inhibición del crecimiento celular y germinación de esporas respectivamente (6µM). La proteína SAP mostró una mayor actividad inhibitoria contra *P. syringae* pv. *syringae, P. syringae* pv. *yabaci* y *C. coccoides* comparada con la actividad individual de SN1 y PTH1, mientras su efecto en *C. michiganensis* subsp *sepedonicus* fue comparado al de la PTH1 individual (Kovalskaya *et al*., 2009; Kovalskaya *et al*., 2011).

2.3.2. Expresión heteróloga en sistemas vegetales de péptidos snakinas/GASA

Los PAs SN1 y SN2 aislados de *S. tuberosum* muestran actividad *in vitro* contra importantes patógenos, por lo que han sido utilizados en el desarrollo de plantas transgénicas para evaluar su función biológica *in vivo*. En particular la SN1 ha presentado niveles de tolerancia a una variedad de hongos y bacterias patógenas en plantas transgénicas (Almasia *et al*., 2008; Faccio *et al*., 2011).

Tal es el caso de plantas de papa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Kennebec) transformadas vía *A. tumefaciens* con el gen *StSN1* de *S. chacoense*, bajo la regulación del promotor 35SCaMV. Las líneas transgénicas fueron caracterizadas molecularmente y retadas con *R. solani* y *E. carotovora*, analizando si la sobreexpresión constitutiva *in vivo* producía tolerancia a la enfermedad concluyendo que solo las líneas transgénicas que acumularon niveles altos de ARNm de SN1 presentaron una reducción significativa de síntomas de la enfermedad (Almasia *et al*., 2008).

Por otra parte la evaluación de la expresión de *StSN1* de *S. chacoense* en plantas de trigo transformadas por co-bombardeo con los genes *bar* y *StSN1* contenidos en los vectores pDM302 y pUBI-cSN1 respectivamente, presentó resultados similares, ya que las líneas transgénicas de trigo que expresaron constitutivamente el gen *StSN1* fueron desafiadas con *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* mostrando un retraso y una reducción en el desarrollo de la enfermedad, comparado con la variedad tipo silvestre, además de presentar una asociación entre la tolerancia elevada al patógeno y niveles altos del transcrito SN1. Este trabajo es el primer reporte de expresión de la SN1 en gramíneas (Faccio *et al*., 2011).

Además de lo mencionado anteriormente, se reportó la actividad antimicrobiana de la proteína híbrida SAP contra *C. coccoides* y *C. michiganensis* subsp *sepedonicus*, la cual fusionó los genes *StSN1* y *PTH1* de snakina y defensina, respectivamente. Esta proteína fue evaluada en plantas de *N. benthamiana* y *S. tuberosum*, ambas plantas fueron significativamente más tolerantes a la infección que las plantas control (Kovalskaya *et al*., 2011). Otras snakinas/GASA han sido evaluadas por sobreexpresión en plantas de alfalfa y tomate transgénicos. La expresión del gen *MsSN1* de *M. sativa* L. en plantas transgénicas de alfalfa incrementó la actividad antimicrobiana contra cepas fúngicas de la planta y la *SN2* de *S. lycopersicum* cv. Mountain, confirió tolerancia a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate transgénico (Balaji y Smart, 2012; García *et al*., 2014).

2.3.3. Snakina de aguacate

Recientemente se han identificado en aguacate nativo mexicano (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) diversos genes homólogos a péptidos reportados como antimicrobianos, entre ellos el gen *PaSn*, que expresa una proteína de la familia snakinas/GASA (Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013a).

En base a un análisis de secuencias expresadas (ESTs) de semilla de aguacate se identificó una secuencia única de cDNA para una snakina que codifica un péptido de 105 aminoácidos. Esta molécula comprende un péptido señal de 26 aminoácidos y un péptido maduro de 79 aminoácidos (Figura 3). El gen *PaSn* de aguacate conserva los 12 residuos de cisteínas característicos de la familia snakinas/GASA (Figura 4).

Figura 3. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del cDNA del gen *PaSn* de aguacate (snakina; GenBank accession: KC012806). El péptido señal (marcado en gris) es seguido por la secuencia de aminoácidos del péptido maduro (Guzmán-Rodríguez *et al*., 2013a).

El gen *PaSn* se expresó en el sistema heterólogo BVE-E6E7 (línea celular endotelial bovina) y se evaluó la actividad de las células transfectadas contra cepas de *E. coli* y *S. aureus*, patógenas de humanos y animales. La proteína total del medio condicionado inhibió la viabilidad de *E. coli* y *S. aureus* en un 90.7% y 89.8% respectivamente (100µg/mL). Estos resultados son consistentes con los reportados para la SN1 y SN2 de papa que demuestran una actividad inhibitoria en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013a).

Por lo tanto el gen de snakina de aguacate nativo mexicano podría estar involucrado en la defensa de la planta de manera similar a los genes *StSN1* y *StSN2* en papa, sugiriendo que podría conferir tolerancia a hongos fitopatógenos

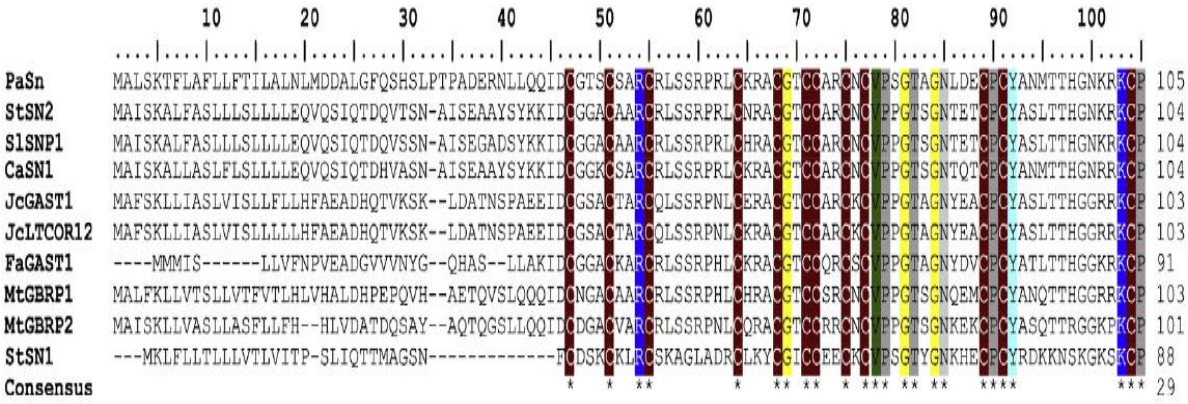


Figura 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de snakinas/GASA de plantas. Los aminoácidos conservados se señalan con un asterisco. Los residuos de cisteínas están marcados en rojo. Las secuencias incluidas en la alineación son las siguientes: *StSN1* y *StSN2* de la papa; *MtGBRP1* y *MtGBRP2* de *Medicago truncatula*; *CaSN1* de *Capsicum annum*; *JcGAST1* y *JcLTRCOR12* de *Jatropha curcas*; *SlSNP1* de *Solanum lycopersicum*; *FaGAST1* de *Fragaria x ananassa* y *PaSn* de aguacate (Guzmán-Rodríguez *et al*., 2013a).

2.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE FRESA CON GENES DE DEFENSA

La planta de fresa es octaploide (8n), un híbrido obtenido en la década de los 70's, de una hibridación accidental entre las especies *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis* (de la Fuente *et al*., 2006). Produce uno de los frutos más importantes cultivados en todo el mundo, considerado componente de la dieta de millones de personas, con una producción anual que se incrementa notablemente. Sin embargo, todavía hay muchos factores que limitan el rendimiento significativo de la planta, uno de ellos es la susceptibilidad al ataque de insectos, hongos, bacterias y virus fitopatógenos (Chalavi *et al*., 2003; Schestibratov y Dolgov 2005; de la Fuente *et al*., 2006).

Entre estos patógenos, los hongos son la causa más importante de los rendimientos bajos (Chalavi *et al*., 2003), los hongos que son considerados el mayor obstáculo para mantener o incrementar la producción de la fresa, incluyen *Colletotrichum spp.* y *B. cinerea* (Hammerschlag, 2004).

El moho gris o pudrición de la fruta, causado por *B. cinerea*, es una de las enfermedades más destructivas de la fresa, responsable de rendimientos bajos significativos, antes y después de la cosecha. Este hongo necrotrófico ataca diferentes órganos como raíces, hojas, flores y frutos. Por esta razón la estrategia más común usada para el control de la infección y la propagación de *B. cinerea* es la aplicación regular de fungicidas durante la floración. Sin embargo, este procedimiento provoca muchos problemas que contribuyen negativamente al efectivo tratamiento de esta enfermedad (Schestibratov y Dolgov 2005; Vellicce *et al*., 2006). Otra dificultad encontrada en la lucha contra esta enfermedad, es la falta de resistencia natural para el moho gris en el germoplasma de fresa, haciendo ineficaces todos los intentos para incorporar en líneas de fresa tolerancia a esta enfermedad. Por esta razón, la expresión de genes de otras especies de plantas en la fresa mediante la transformación genética, es una metodología atractiva para introducir resistencia a *B. cinerea* (Vellicce *et al*., 2006).

La transformación genética ha sido descrita en diferentes cultivares de fresa sin embargo, hay pocos estudios de fresa transgénica con resistencia a enfermedades fúngicas debido a la sobreexpresión constitutiva de proteínas de defensa (Schestibratov y Dolgov 2005). Tal es el caso del gen de la taumatina II que se incorporó vía *Agrobacterium* bajo el promotor 35SCaMV, obteniendo líneas transgénicas de fresa que acumularon un alto nivel de proteína (taumatina II). Estas líneas se evaluaron contra el moho gris por infección con una suspensión coloidal mostrando un nivel significativo de tolerancia comparado con las plantas control, según lo medido por lesiones necróticas y esporulación del patógeno (Schestibratov y Dolgov 2005).

Del mismo modo, el gen RCC2 (quitinasa) de arroz y el gen *pcht28* de *Lycopersicum chilense* (quitinasa), fueron introducidos en plantas de fresa bajo el promotor 35SCaMV usando *Agrobacterium*, resultando plantas transgénicas con un incremento en la tolerancia a *Sphaerotheca humuli* y *Verticillium dahliae* comparadas con las plantas control. Se han utilizado otros genes para la transformación genética de fresa, relacionados con la defensa, (*ch5B*, *gln2* y *ap24*) que codifican proteínas quitinasas, glucanasas y tipo taumatina. Pruebas fitopatológicas han mostrado que líneas transgénicas de fresa que expresan el gen *ch5B* (quitinasa) provoca altos niveles de resistencia a la enfermedad del moho gris, esta resistencia fue correlacionada con la presencia del gen foráneo y el incremento de la actividad quitinolítica (Vellicce *et al*., 2006). Estos resultados demuestran que la introducción de genes de quitinasa en fresa es efectiva para desarrollar resistencia contra enfermedades fúngicas jugando un papel importante en los mecanismos de defensa en fresa (Asao *et al*., 1997; Chalavi *et al*., 2003).

Recientemente se expresó el gen *AtNPR1* de *A. thaliana* en fresa, este gen es un regulador positivo de la resistencia de amplio espectro y de larga duración, por su efecto sobre la resistencia sistémica adquirida. Los resultados mostraron que este gen incrementa la resistencia a varias enfermedades en fresa como antracnosis, mildiú polvoso y mancha angular que son causadas por diferentes hongos y bacterias patógenas, generando resistencia de amplio espectro (Silva *et al*., 2015). Además de los genes de defensa se han reportado otros genes utilizados para transformación de fresa que confieren tolerancia a estrés salino, altas temperaturas y congelación usando transferencia genética por *A. tumefaciens* (Houde *et al*., 2004; Khammuang *et al*., 2005; Husaini y Abdin, 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

Los péptidos antimicrobianos como las snakinas presentan actividad antifúngica, se han aislado de diferentes plantas mostrando actividad *in vitro* contra importantes hongos fitopatógenos. Los genes que expresan estas proteínas, han sido utilizados en el desarrollo de plantas transgénicas para evaluar su función biológica *in vivo*, en particular la función antifúngica.

En aguacate nativo mexicano se determinó la presencia del gen *PaSn,* que expresa una snakina la cual presenta actividad antibacteriana *in vitro* y se desconoce si posee una función antifúngica. Para evaluar esta función biológica, en la presente investigación, como primera etapa se propone la transformación genética de fresa con el gen *PaSn* de aguacate nativo mexicano, vía *A. tumefaciens,* como una alternativa biotecnológica para la obtención de plantas de fresa tolerantes a hongos, principalmente a *B. cinerea.*

IV. HIPÓTESIS

Se obtendrán plantas transgénicas de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Cv. Aromas) con el PA snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) vía *Agrobacterium tumefaciens.*

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Generar plantas transgénicas de fresa con el gen de la snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*).

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

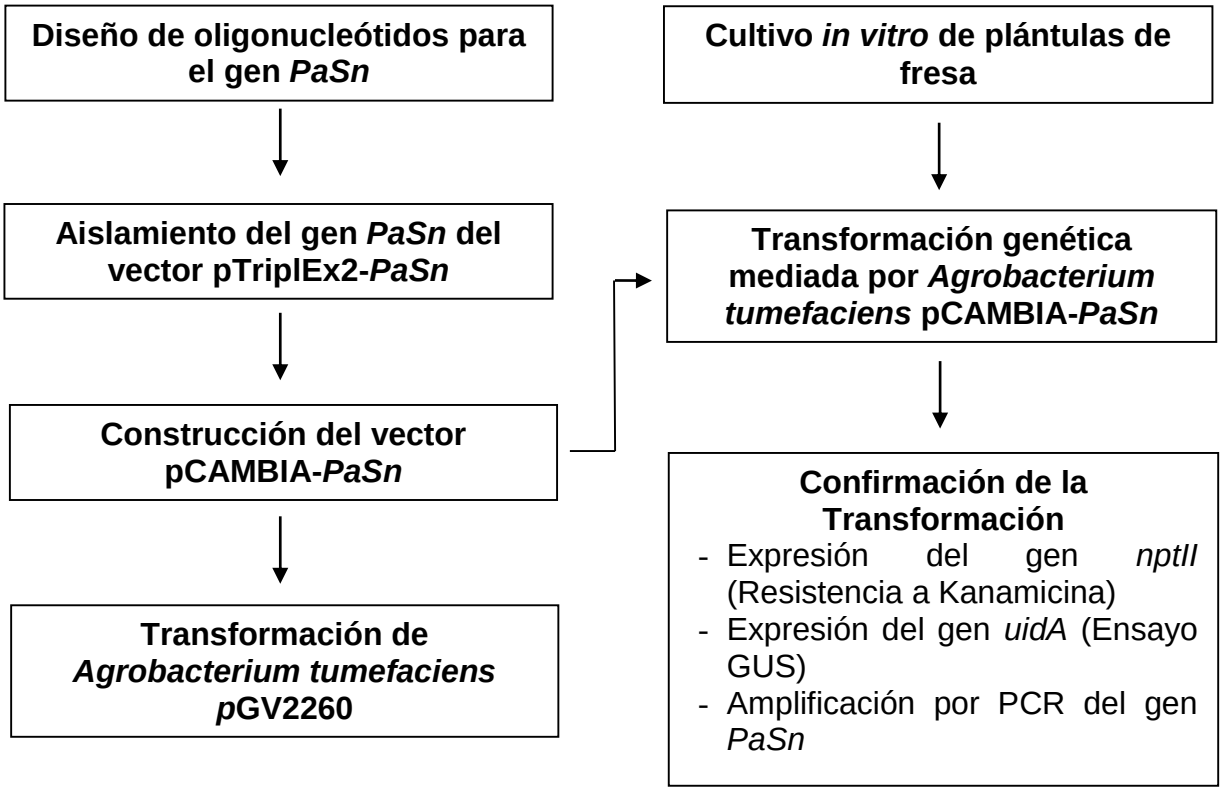
1. Aislar el cDNA del gen de la snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*).

2. Realizar la clonación del cDNA del gen *PaSn* en el vector pCAMBIA2301 y obtener la cepa transformante de *Agrobacterium tumefaciens.*

3. Establecer el sistema de transformación genética en fresa mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

4. Comprobar la transformación de plantas de fresa detectando la expresión del gen marcador (*nptII*) y reportero (*uidA*), así como la presencia del gen *PaSn* en tejidos de fresa transformados.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



VII. RESULTADOS

7.1. CLONACIÓN DEL cDNA DEL GEN *PaSn* EN EL VECTOR pCAMBIA2301 Y TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens p*GV2260

RESUMEN

El gen *PaSn* de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), un miembro de la familia de genes que codifican pequeñas proteínas tipo snakinas/GASA, fue clonado en el vector binario pCAMBIA2301. El cDNA de *PaSn* se aisló del vector pTriplEx2-*PaSn* por amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos que contenían los sitios de restricción para su manipulación. El producto amplificado fue clonado en el vector pBluescript KS y posteriormente en el vector PUCpSS para integrar el doble promotor 35SCaMV. El cassette de expresión completo se liberó y fue incorporado al vector pCAMBIA2301 que contiene el gen de selección *nptII*, que proporciona resistencia a kanamicina y el gen reportero *uidA*. La clonación del cDNA del gen *PaSn* al vector pCAMBIA2301 fue confirmada por secuenciación. Se transformó la cepa *pGV*2260 de *Agrobacterium tumefaciens* por choque eléctrico con la construcción pCAMBIA-*PaSn*. Esta cepa fue utilizada para realizar los eventos de transformación genética en fresa (*Fragaria* x *ananassa* cv. Aromas).

Palabras clave: Aguacate, clonación, *Agrobacterium tumefaciens*, snakina.

INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una variedad de compuestos como un mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos, incluyendo la síntesis de péptidos de bajo peso molecular con actividad antifúngica (Selitrennikoff, 2001). Numerosos péptidos antimicrobianos se han identificado en plantas y animales, formando parte de la defensa innata contra la invasión de microorganismos (López-Solanilla *et al*., 2003). La snakina-1 (SN1) y snakina-2 (SN2) son péptidos antimicrobianos aislados de *S. tuberosum* Cv. Desireé, con alta actividad *in vitro* contra importantes patógenos (Segura *et al*., 1999; Berrocal-Lobo *et al*., 2002). Se han identificado y caracterizado genes homólogos que expresan este tipo de péptidos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Kotilainen *et al*., 1999; Furukawa *et al.,* 2006), los resultados indican que estos genes están involucrados en diversos procesos biológicos, incluyendo: la división celular, elongación celular, transición a la floración, vías de señalización y defensa (Berrocal-Lobo *et al*., 2002; Ben-Nissan *et al*., 2004; de la Fuente *et al*., 2006; Furukawa *et al*., 2006; Roxrud *et al.,* 2007). Recientemente, se identificó y caracterizó el gen *PaSn* que codifica un péptido tipo snakina que fue aislado de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Únicamente se ha comprobado su actividad antibacteriana *in vitro* contra *E. coli* y *S. aureus* por ensayos de expresión heteróloga en una línea celular endotelial bovina (BVE-E6E7). La snakina de aguacate codifica un péptido de 105 aminoácidos que comprende un péptido señal de 26 aminoácidos y un péptido maduro de 79 aminoácidos (Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013a). Este tipo de péptidos han sido reportados con alta actividad antifúngica y se han expresado en plantas mediante transformación genética (Zhu *et al.,* 2007). El gen *StSN1* de papa han sido evaluado en plantas transgénicas confiriendo tolerancia a enfermedades causadas por bacterias y hongos (Almasia *et al.,* 2008).

La clonación del cDNA del gen de la snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano en el vector binario pCAMBIA2301 se requiere para transformar una cepa de *A. tumefaciens* para los eventos de transformación genética de fresa. En esta investigación se obtuvo el vector binario pCAMBIA-*PaSn*, misma que fue utilizada para transformar la cepa *p*GV2260 de *A. tumefaciens*

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico:

- Se utilizaron muestras de hoja y semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) de tres meses de desarrollo colectadas en la zona aguacatera de Tingambato, Michoacán.
- Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *A. tumefaciens pGV*2260 y *E. coli* TOP10 y XLBlue.

Extracción de ácidos nucleicos:

Las extracciones del material biológico se realizaron a partir de 100mg de muestra congeladas en nitrógeno líquido, para el caso del ADN se realizó mediante lisis celular con el buffer de extracción (100mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 2% SDS (w/v), 10% PVP) modificado y la metodología reportada por Lin *et al*. (2001). El ARN fue obtenido con el buffer de extracción (150mM Tris-Borato pH 7.5, 50mM EDTA pH 8, 2% SDS (w/v)) y la metodología reportada por López-Gómez y Gómez-Lim (1992).

Diseño de oligonucleótidos:

A partir de la secuencia codificante del gen *PaSn* (cDNA) reportada por Guzmán-Rodríguez *et al*. (2013a), se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación del gen de snakina de aguacate, incorporando los sitios de restricción de las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI para movilizar el gen en fase hasta el vector binario considerando la región del péptido señal.

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *para el* gen *PaSn*:

La PCR del gen *PaSn* se llevó a cabo con una mezcla de reacción y los componentes mostrados en el cuadro 3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5min a 94ºC, 30 ciclos (94ºC 45 s, 62ºC 30s, 72ºC 1min); 72ºC 7min; 4°C ∞, utilizando como templado ADN y cDNA de aguacate.

Cuadro 3. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen *PaSn*.

MEZCLA DE REACCIÓN	
COMPONENTES	**VOLUMEN**
dNTPs 10 mM	0.2 µL
Buffer 10x	1 µL
$MgCl_2$ 50mM	0.3 µL
Taq Polimerasa 5U/µl	0.2 µL
Oligonucleótido sentido 10 µM	1.5 µL
Oligonucleótido antisentido 10 µM	1.5 µL
ADN 50ng/µL	1 µL
H_2O Estéril	4.3 µL
Volumen final	**10 µL**

Síntesis de cDNA:

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit USB First Strand cDNA Synthesis (Affymetrix® No. Cat. 75780) cuyas mezclas de reacción y componentes se presentan en el cuadro 4. Las condiciones de síntesis fueron: para la primera cadena Paso1: 44° 60 min; Paso 2: 92°C 10 min; Paso 3: 4°C α; para la segunda cadena 2 min a 94ºC de desnaturalización inicial; seguido de 30 ciclos (94ºC 45 s, 55ºC 30s, 72ºC 1min); 72ºC 5min; 4°C α.

Obtención de ADN plasmídico:

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron por la técnica de lisis alcalina y la metodología descrita por Birnboim y Doly (1979).

Cuadro 4. Mezclas de reacción, componentes y concentraciones para la síntesis de cDNA del gen *PaSn*.

MEZCLAS DE REACCIÓN			
Síntesis : 1 cadena		**Síntesis : 2 cadena**	
Random Hexamers 75µM	2 µL	*Taq polimerasa* 5U/µl	2 µL
ARN 1 µg/µL	1 µL	Random primers 75µM	1 µL
Buffer RT 10x	2 µL	dNTPs 10 mM	1 µL
dNTPs 10 mM	1 µL	$MgCl_2$ 50mM	2 µL
RNase inhibidor 10U/µL	1 µL	cDNA 1 cadena	3 µL
M-MLV RT	1 µL	Buffer *Taq* 10x	20 µL
H_2O Estéril	12 µL	H_2O Estéril	21 µL

Reacciones de digestión:

Para la liberación de los fragmentos de interés se realizaron reacciones de digestión con las enzimas: *Bam*HI (Invitrogen® No. Cat. 15201-049), *Eco*RI (Invitrogen® No. Cat. 15202-039) y *Hind*III (Promega® No. Cat. R6041) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Reacciones de ligación:

Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen® No.Cat.15224-017) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Células termocompetentes de E. coli:

Se prepararon células termocompetentes en medio LB (Luria Broth) sin antibióticos de la cepa de preferencia a una densidad óptica OD_{600} entre 0.4-0.5. Las células se incubaron en hielo (20min) y se centrifugaron (4000 rpm/10min), posteriormente se resuspendieron en $CaCl_2$ 0.1 M y se incubaron en hielo. Finalmente se centrifugaron eliminando el sobrenadante para resuspender las células en $CaCl_2$ 0.1 M y glicerol al 15%.

Transformación de células termocompetentes (E. coli):

Las transformaciones se realizaron adicionando 5 µL de la ligación correspondiente, mediante choque térmico. Las células se recuperaron en medio LB líquido incubando a 37°C a 300 rpm durante 1 h, posteriormente se incubaron a 37°C por 24 h en medios de selección en placa para su observación.

Células electrocompetentes de A. tumefaciens:

Se prepararon células electrocompetentes de la cepa pGV2260 de *A. tumefaciens* en un medio bajo en sales a una densidad óptica OD_{600} de 0.5 y la metodología descrita en http://www.bio-protocol.org.

Transformación de células electrocompetentes (*A. tumefaciens*)*:*

La transformación se realizó con ≤ 1 µg de ADN mediante choque eléctrico en cubeta de electroporación con un pulso a un voltaje de 1800 V. Las células se recuperaron en medio YM (Yeast Mold) y se incubaron a 28°C a 300 rpm durante 4 h, posteriormente se incubaron a 28°C por 3 días en medios de selección en placa para su observación (http://www.bio-protocol.org).

Electroforesis en gel de agarosa:

Se llevó a cabo en una cámara de electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en buffer TBE 0.5X teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Diseño de oligonucleótidos:

La secuencia del cDNA del gen *PaSn* fue analizada con la herramienta NEBcutter (http://www.neb.com/rebase) de England BioLabs para conocer los sitios de restricción presentes dentro de la secuencia.

En la figura 5 se muestra el análisis de sitios de restricción intersecuencia observando la ausencia de los sitios para las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI dentro de la secuencia codificante lo que garantizó que no hubiera interferencias por el uso de estos sitios en el diseño de oligonucleótidos para los experimentos de clonación.

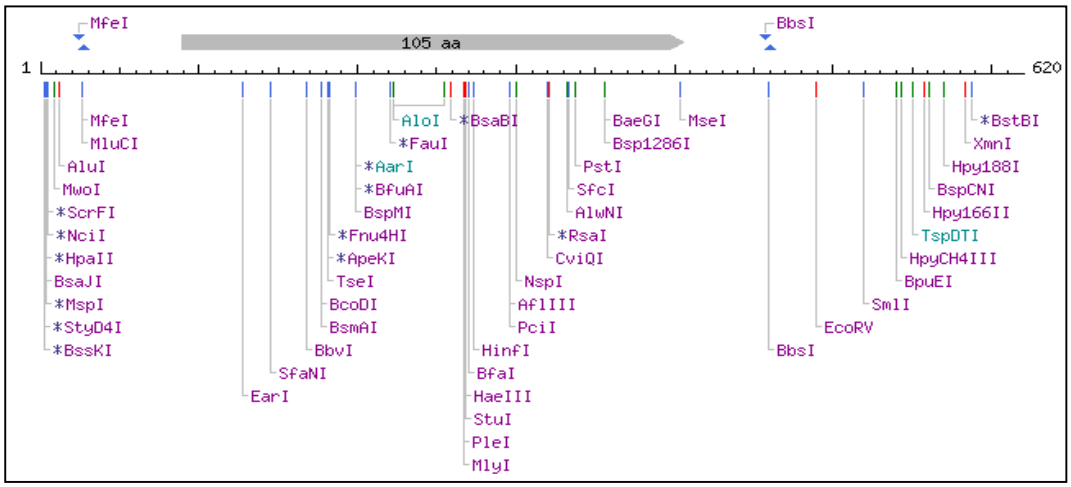


Figura 5. Análisis intersecuencia del cDNA de *PaSn* de aguacate nativo mexicano por NEBcutter (http://www.neb.com/rebase).

Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando la secuencia del cDNA de *PaSn* de aguacate (Figura 6) y los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI requeridos para la clonación del gen de la snakina en el vector pBluescript KS como se muestra en el cuadro 5.

5’ ATGGCTCTGTCAAAGACTTTCCTTGCTTTCCTTCTCTTCACTATC
CTTGCTCTCAATCTCATGGATGATGCTCTTGGATTTCAGTCTCATT
CGCTGCCTACACCTGCGGATGAGAGAAATCTCCTTCAACAAATAG
ATTGCGGGACATCTTGTTCTGCGAGGTGTCGATTGTCATCAAGGC
CTAGACTCTGCAAGAGGGCTTGTGGGACATGTTGTGCGAGGTGC
AACTGCGTACCATCAGGAACTGCAGGCAACTTAGACGAGTGCCC
TTGCTACGCCAACATGACTACTCATGGGAACAAACGCAAATGTCC
TTAA 3’

Figura 6. Secuencia de nucleótidos del cDNA de *PaSn* de aguacate. Los nucleótidos utilizados para el diseño de los oligonucleótidos están marcados en gris.

Cuadro 5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR del gen *PaSn*, en negritas los sitios de restricción incorporados.

Sentido	5'- **GAATTC**ATGGCTCTGTCAAAGACTTTCCTT -3'
Antisentido	5'- **GGATCC**TTAAGGACATTTGCGTTTGTTCCC -3'

Verificación de oligonucleótidos:

Se realizaron extracciones de ADN y ARN de hoja y semilla de aguacate respectivamente (Figura 7), el ARN fue empleado para la síntesis de cDNA. Para confirmar la funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados, se realizó una amplificación por PCR a partir del ADN resultando fragmentos de aproximadamente 500pb que corresponden a la secuencia genómica del gen y fragmentos de aproximadamente 318pb a partir de cDNA, que corresponde a la secuencia del mensajero reportada para este gen por Guzmán-Rodríguez *et al*. (2013a) (Figura 8). De esta forma se garantizó que los oligonucleótidos diseñados amplificaban el gen de la snakina (*PaSn*).

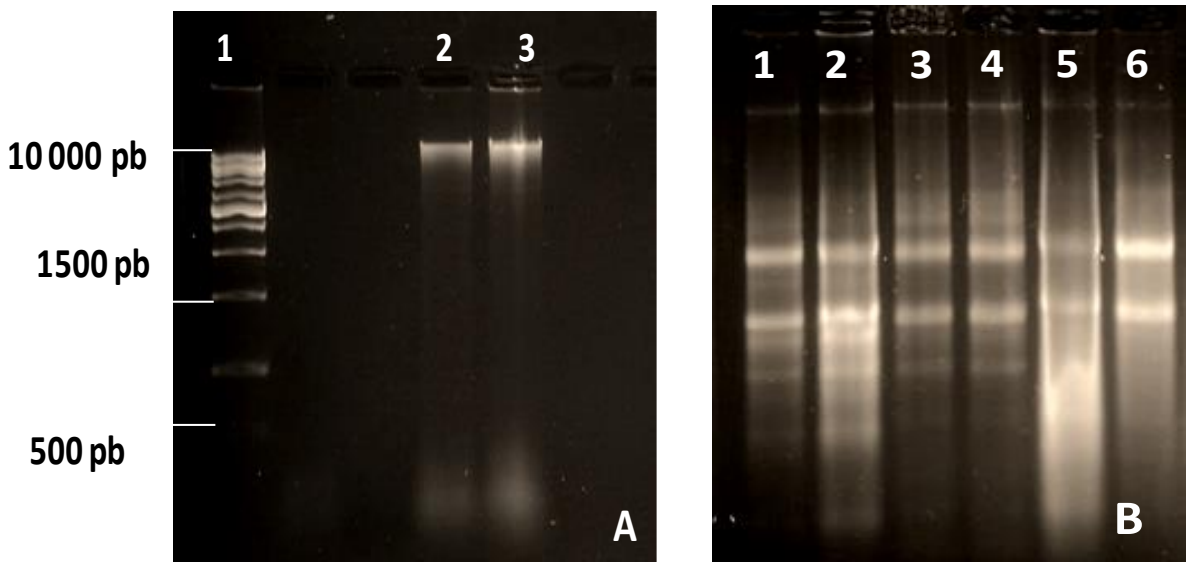


Figura 7. Extracción de ácidos nucleicos de aguacate **A)** ADN de hoja de aguacate. 1: Marcador de tamaño molecular 1Kb (Vivantis® VC 1kb DNA Ladder Cat. NL1409); 2 y 3: Muestras de hoja de aguacate. **B)** ARN de semilla de aguacate. 1–6 Muestras de semilla de aguacate.

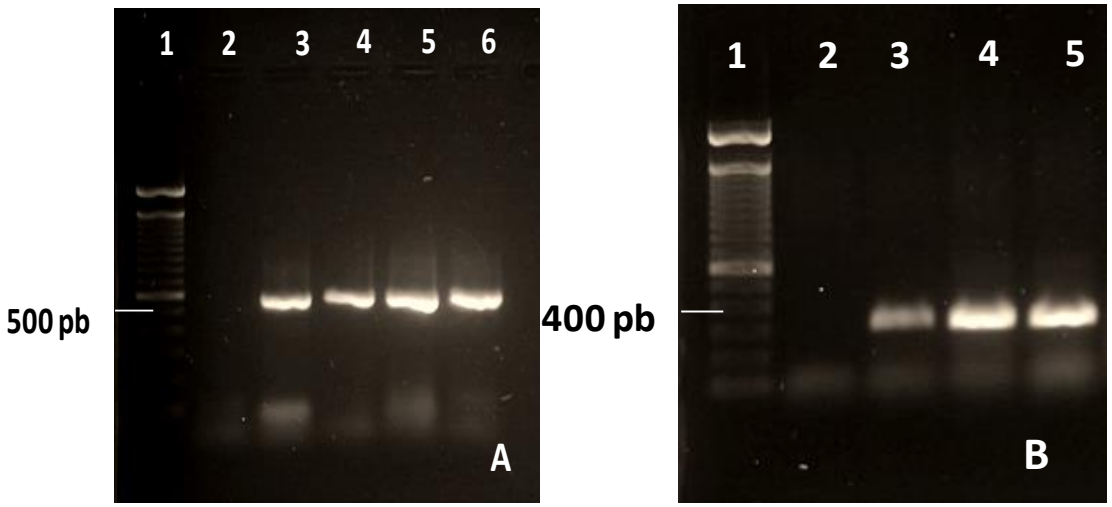


Figura 8. Amplificación por PCR del gen *PaSn* **A)** A partir de ADN de aguacate 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 3-6: Productos de PCR **B)** A partir de cDNA de aguacate 1: Marcador de tamaño molecular 100pb; 2: Control negativo; 3–5: Productos de PCR

Amplificación del gen PaSn:

El gen de la snakina de aguacate inicialmente se encontraba clonado en el vector pTriplEx2-*PaSn*. Con el fin de generar los nuevos sitios de restricción y clonar el gen se realizó una amplificación por PCR a partir de ADN plasmídico (pTriplEx2-*PaSn*), resultando fragmentos de aproximadamente 318pb que corresponden a la secuencia reportada para el cDNA del gen *PaSn* (Figura 9). Los productos de PCR fueron purificados con el kit Gel DNA Recovery (Zymoclean™ No. Cat. D4002) y se utilizaron para la clonación en el vector pBluescript KS.

Clonación del gen PaSn en el vector pBluescript KS*:*

La clonación del cDNA del gen *PaSn* aislado del vector pTriplEx2-*PaSn* se realizó en el sitio de clonación múltiple del vector pBluescript KS (Anexo I), por reacciones de digestión (*Bam*HI y *Eco*RI) y ligación al vector.

Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 con el vector pBluescript-*PaSn* y se evaluaron en medio selectivo (LB/Cb/X-Gal) con 100mg/L de carbenicilina (Cb) y escrutinio de colonias blancas y azules, lo que permitió la identificación directa de colonias positivas. Se seleccionó una colonia positiva y se analizó por PCR en colonia en donde se observó un fragmento de aproximadamente 318pb que corresponde a la secuencia de interés (Figura 10).

Construcción del cassette de expresión PUCpSS-*PaSn*:

Se realizó una digestión de ADN plasmídico de la construcción pBluescript-*PaSn* con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI de la clona seleccionada para liberar el fragmento de la snakina (Figura 11), el cual fue incorporado por ligación al vector PUCpSS con la finalidad de integrar las secuencias regulatorias del doble promotor 35SCaMV y el terminador PoliA CaMV (Figura 12).

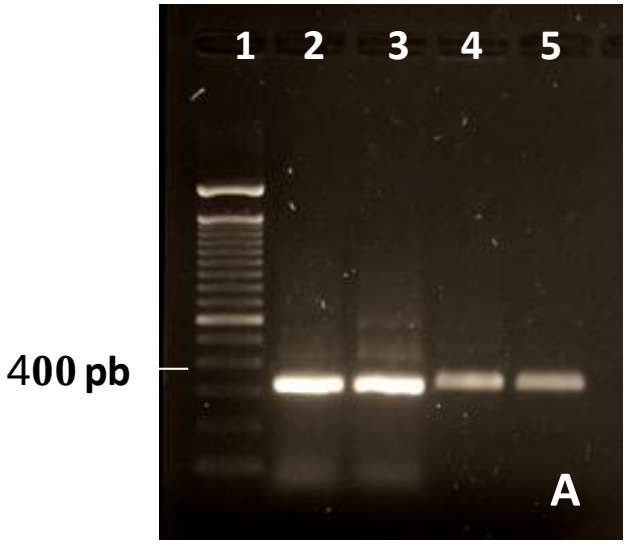


Figura 9. Amplificación por PCR del gen *PaSn* del vector pTriplEx2-*PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2 y 3: Productos de PCR; 4 y 5: Productos de PCR purificados.

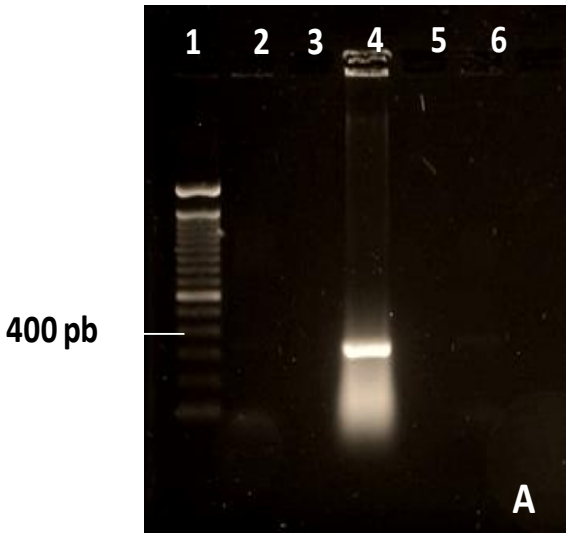


Figura 10. Amplificación del gen *PaSn* por PCR en colonia de *E. coli*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 4: Producto de PCR.

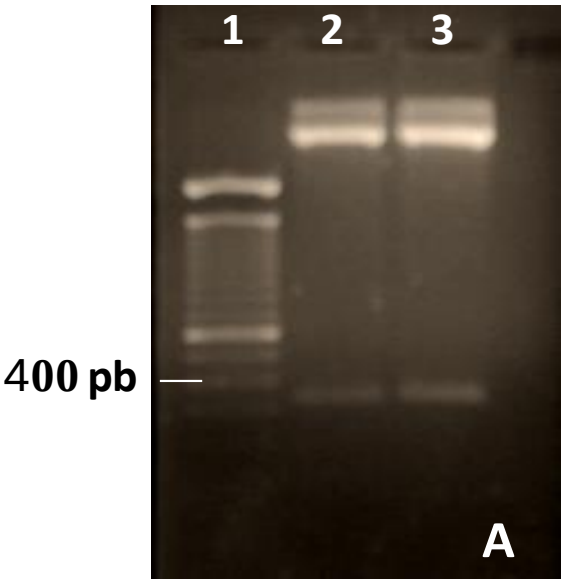


Figura 11. Digestión de ADN plasmídico. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2 y 3: ADN de la construcción pBluescript-*PaSn* de la clona seleccionada.

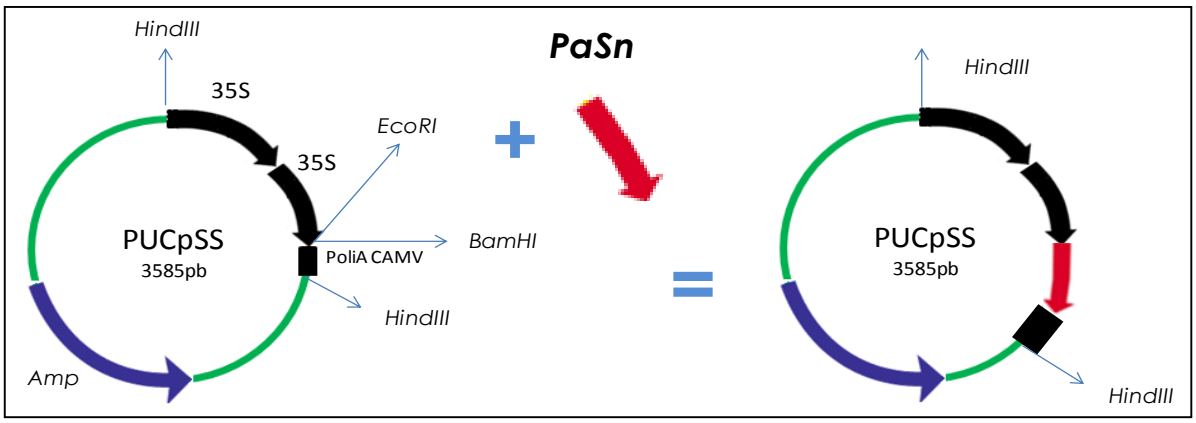


Figura 12. Mapa del vector PUCpSS. (Incorporación del gen *PaSn* al vector PUCpSS).

Construcción del vector pCAMBIA- *PaSn:*

Se realizó una digestión de DNA plasmídico de la construcción PUCpSS-*PaSn* con la enzima *Hind*III, liberando el cassette completo, que se incorporó por ligación al sitio de clonación múltiple del vector binario pCAMBIA2301(Anexo II), portador del gen *uidA* que codifica la proteína ß-glucuronidasa y el gen de selección *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina (Kan).

Se transformaron células competentes de *E. coli* XLBlue con la construcción pCAMBIA-*PaSn* y se evaluaron en medio selectivo (LB/Kan/X-Gal) con 50 mg/L de Kan y escrutinio de colonias blancas y azules, lo que permitió la identificación directa de colonias positivas Se analizaron cuatro colonias positivas por PCR en colonia para los genes *PaSn* y *uidA*. En la figura 13 se puede observar que solo una de las colonias analizadas amplificó dos fragmentos de aproximadamente 318 y 900 pb que corresponden a las secuencias de los genes *PaSn* y *uidA* respectivamente. Se aisló esta clona para realizar una extracción de ADN plasmídico de la construcción pCAMBIA-*PaSn* para la transformación de la cepa de *A. tumefaciens.*

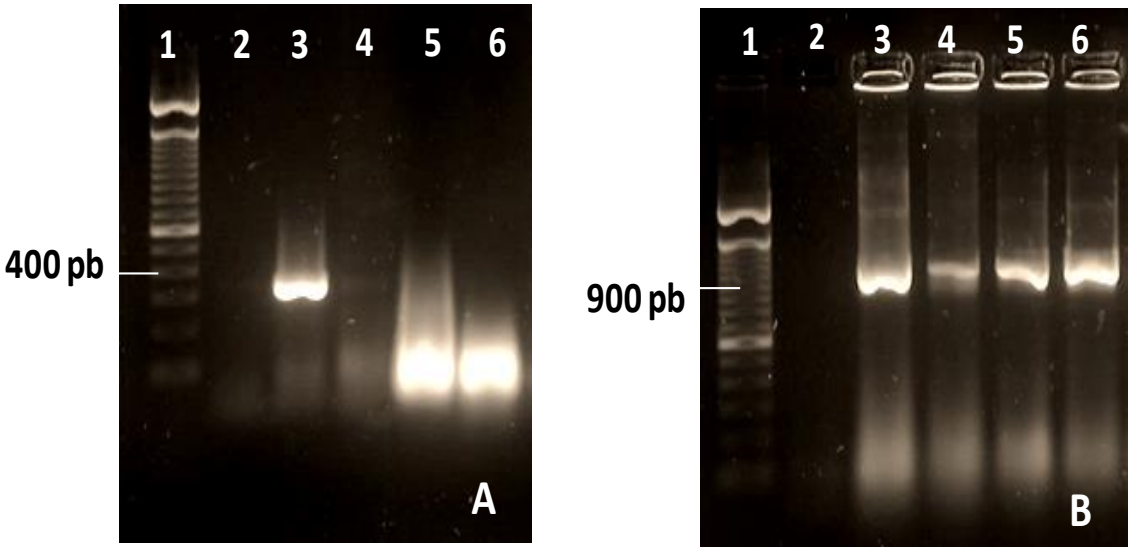


Figura 13. Amplificación por PCR en colonia de *E. coli*. **A)** Amplificación del gen *PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 3-6: Productos de PCR. **B)** Amplificación del gen *uidA*. 1: Marca Marcador de tamaño molecular 100pb; 2: Control negativo; 3-6: Productos de PCR.

Transformación de A. tumefaciens con el vector pCAMBIA-*PaSn:*

Se transformaron células competentes de *A. tumefaciens p*GV2260 con la construcción pCAMBIA-*PaSn* y se evaluaron en medio selectivo (YM/Cb/Rf/Kan) con 50 mg/L de Kan, 100 mg/L de Cb y 100 mg/L de rifampicina (Rf) lo que permitió el crecimiento de colonias positivas (Figura 14). Se analizaron todas las colonias positivas (3-14) por PCR en colonia para los genes *PaSn* y *uidA c*on el fin de seleccionar aquella que llevará integro el vector pCAMBIA-*PaSn*. En la figura 15 se puede observar que cuatro de las colonias analizadas amplificaron dos fragmentos de aproximadamente 318 y 900 pb que corresponden a las secuencias de los genes *PaSn* y *uidA* respectivamente. Se aisló una de las clonas que resultaron positivas para ambos genes (12). Asegurando de esta forma la presencia del gen de interés y el gen reportero y con ello la transformación de *A. tumefaciens* con el vector binario. La representación de la región ADN-T del vector pCAMBIA-*PaSn* se muestra en la figura 16.

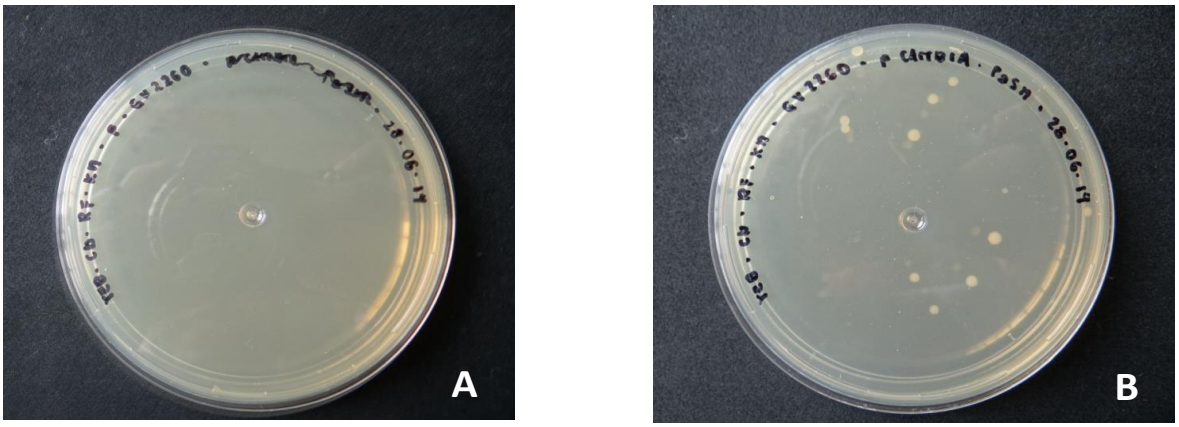


Figura 14. Células transformadas de *A. tumefaciens* pGV2260 en medio selectivo (YM/Cb/Rf/Kn). **A)** Control negativo; **B)** Células transformadas con el vector pCAMBIA-*PaSn*.

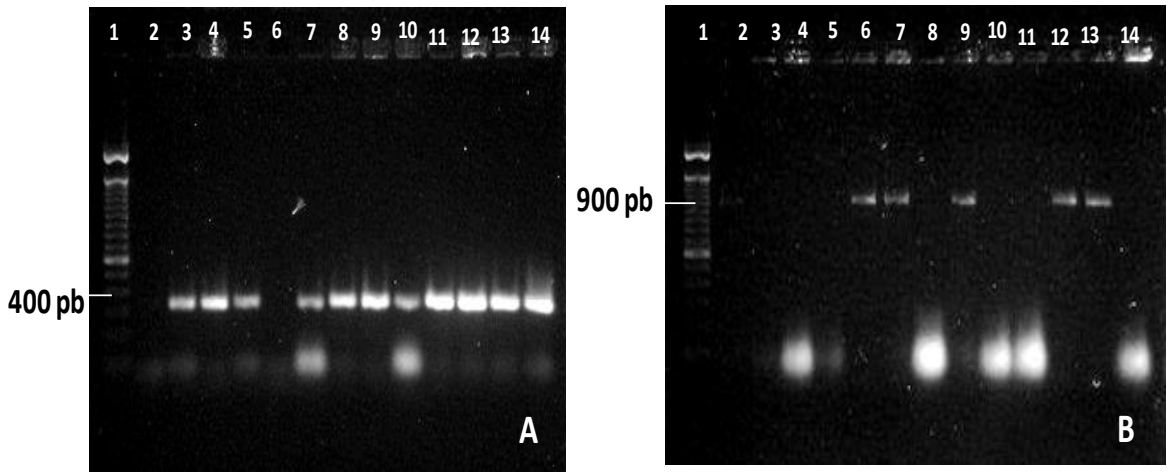


Figura 15. Amplificación por PCR en colonia de *A. tumefaciens*. **A)** Amplificación del gen *PaSn*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® TrackIt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control negativo; 3-14: Productos de PCR **B)** Amplificación del gen *uidA*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb; 2: Control negativo; 3-14: Productos de PCR.

Secuenciación:

La clonación del gen *PaSn* en el vector pCAMBIA2301 se confirmó por secuenciación de la construcción pCAMBIA-*Pa*Sn realizada por los servicios genómicos del LANGEBIO (CINVESTAV *Campus Guanajuato*) por el método Sanger a partir de ADN plasmídico purificado con el kit ZR ADN Sequencing Clean-up (Zymo Research ™ No. Cat. D4050S). En los resultados proporcionados se identificó la secuencia del gen de la snakina de aguacate (Figura 17) confirmando de esta manera su clonación.

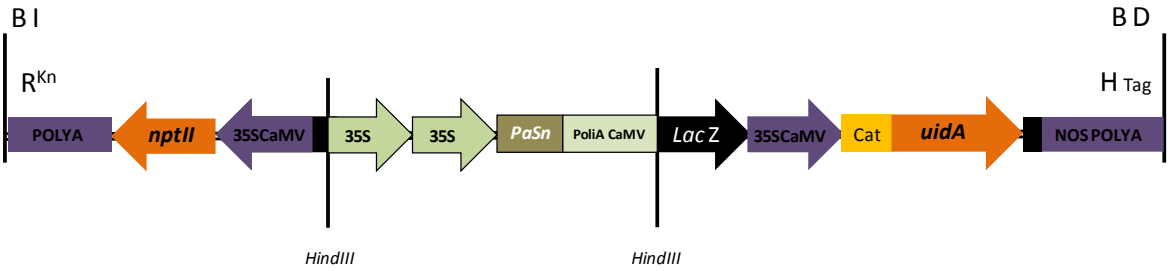


Figura 16. Estructura de la región ADN-T de la construcción pCAMBIA-*PaSn*. BI: borde izquierdo; *nptII*: neomicina fosfotransferasa; *PaSn*: snakina de aguacate; *uidA* (*GUS*): β-glucuronidasa; BD: borde derecho.

```
      1                        M  V  E  H  D  T  L  V  Y  S  K  N  I
      1 AAGCAAGTGGATTGATGTGATACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATA
     21   K  D  T  V  S  E  D  Q  R  A  I  E  T  F  Q  Q  R  V  I  S
     61 TCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAGAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATAT
     41   G  N  L  L  G  F  H  C  P  A  I  C  H  F  I  E  R  T  V  E
    121 CGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAG
     61   K  E  D  G  F  Y  K  C  H  H  C  D  K  G  K  A  I  V  Q  D
    181 AAAAGGAAGATGGCTTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAG
     81   A  S  T  D  S  G  P  K  D  G  P  P  P  T  R  N  I  V  E  K
    241 ATGCCTCTACCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAACATCGTGGAAA
    101   E  D  V  P  T  T  S  S  K  Q  V  D  *
    301 AAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACG
    361 TAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTT
    421 CATTTCATTTGGAGAGGACCTCGAGAATTCGCCCTTGAATCATGGCTCTGTCAAAGACTT
```

Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del cDNA del gen *PaSn* de aguacate identificada por secuenciación de la construcción pCAMBIA-*PaSn*.

CONCLUSIÓN

Se clonó el cDNA del gen *PaSn* de aguacate nativo mexicano en el vector pCAMBIA2301, consiguiendo la construcción pCAMBIA-*PaSn* utilizada para la transformación de la cepa *p*GV2260 de *A. tumefaciens,* la cual fue utilizada para los eventos de transformación genética de fresa.

LITERATURA CITADA

Almasia, N. I., Bazzini A.A., Hopp H.E. y Vazquez-Rover, C. 2008. Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. Molecular Plant Pathology, 9(3):329-338.

Ben-Nissan, G., Lee, J.-Y., Borohov, A. y Weiss, D. **2004.** GIP, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering. The Plant Journal, 37(2):229–238.

Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F. y Molina, A. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. Plant physiology, 128(3):951-961.

Birnboim, H.C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, 7(6):1513-1523.

de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Hogg, J.T., Miller, D.S., Naranjo, V., Almazán, C., Anderson, N. y Kocan, K.M. **2006**. Genetic characterization of *Anaplasma ovis* strains from bighorn sheep in Montana. Journal of wildlife diseases, 42(2): 381-385.

Furukawa, T., Sakaguchi N. y Shimada, H. 2006. Two OsGASR genes, rice GAST homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles. Genes & genetic systems, 81(3):171-180.

Guzmán-Rodríguez, J.J., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Ochoa-Zarzosa, A., Suárez-Rodríguez, L.M., Rodríguez-Zapata, L.C., Salgado-Garciglia, R., Jiménez-Moraila, B., López-Meza, J.E. y López-Gómez, R. a. **2013a**. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reveals abundant expression of the gene encoding the antimicrobial peptide snakin. Plant Physiology and Biochemistry, 70:318-324.

Kotilainen, M., Helariutta, Y., Mehto, M., Pollanen, E., Albert, V.A., Elomaa, P. y Teeri, T.H. 1999. GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*. The Plant Cell, 11(6):1093-1104.

Lin, R.-C., Ding, Z.-S, Li, L.-B y Kuang, T.-Y. 2001. A rapid and efficient DNA minipreparation suitable for screening transgenic plants. Plant Molecular Biology Reporter, 19(4):379a-379e.

López-Gómez, R. y Gómez-Lim, M.A. **1992**. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. Hort Science, 27(5):440-442.

Lopez-Solanilla, E., Gonzalez-Zorn, B., Novella, S., Vazquez-Boland, J.A. y Rodriguez-Palenzuela, P. 2003. Susceptibility of *Listeria* monocytogenes to antimicrobial peptides. FEMS Microbiology Letters, 226(1):101-105.

Roxrud, I., Lid S.E., Fletcher, J.C., Schmidt, E.D. y Opsahl-Sorteberg, H.G. 2007. GASA4, one of the 14-member Arabidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. Plant and Cell Physiology, 48(3):471-483.

Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A. y García-Olmedo, F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. Molecular Plant Microbe Interactions, 12(1):16-23.

Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. Appl. Environ. Microbiol, 67(7): 2883-2894.

Zhu, Q., Zheng, X., Luo, J., Gaut, B.S. y Ge, S. 2007. Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: severe bottleneck during domestication of rice. Molecular Biology and Evolution, 24(3):875-888.

7.2. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE FRESA (*Fragaria* x *ananassa* cv. Aromas) CON EL GEN DE SNAKINA (*PaSn*) DE AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*).

RESUMEN

Las plantas de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Cv. Aromas) fueron transformadas con el cDNA del gen de snakina de aguacate (*PaSn*) bajo el control de un doble promotor 35SCaMV utilizando el método de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens.* La infección se realizó con la cepa *p*GV2260 de *A. tumefaciens* con el vector binario pCAMBIA-*PaSn*. El co-cultivo se llevó a cabo con segmentos de corona de raíz (0.5 cm) de plántulas de fresa. Los explantes de fresa se regeneraron bajo cultivo *in vitro* inicialmente en medio MS inductor de brotes (MIB) [0.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 0.1 mg/L de benciladenina (BA), 30 g/L de sacarosa y 4 g /L de phytagel] adicionado con 500 mg/L de cefotaxima, incubados a 25°C y 2000 lux a 16 h de fotoperiodo. Después de 30 días de cultivo, los brotes regenerados fueron individualizados y cultivados con el antibiótico de selección (100 mg/L de kanamicina). Los brotes resistentes fueron cultivados en medio MS para el desarrollo de plántulas (MDP) (0.05 mg/L de BA) con el antibiótico de selección, hasta lograr el desarrollo de plántulas resistentes. La transformación se verificó por la presencia del gen *PaSn* por PCR, obteniendo un fragmento específico de ADN correspondiente al gen *PaSn*, por otro lado se realizó el ensayo histoquímico de GUS donde se pudo observar la expresión de la ß-glucuronidasa. Con la medición indirecta de la expresión de los genes *nptII* y *uidA,* así como la determinación de la presencia del gen *PaSn,* se verificó la transformación genética de la fresa.

Palabras clave: Transformación genética, *Agrobacterium tumefaciens*, fresa.

INTRODUCCIÓN

La transformación genética es una estrategia que actualmente se utiliza en la mayoría de los programas de fitomejoramiento, ya que tiene la capacidad de introducir y expresar genes en plantas logrando producir plantas transgénicas con características comerciales importantes. Las plantas transgénicas han sido muy útiles para el estudio de la sobreexpresión de genes de defensa en la planta, evaluación de promotores inducibles por patógenos, bioensayos de hipersensibilidad para facilitar la clonación y análisis funcional de nuevos genes (Chávez-Camacho *et al*., 2002; Valderrama Fonseca *et al.,* 2005). Recientemente se han identificado y clonado numerosos genes involucrados en la respuesta de defensa de las plantas ante la infección por hongos, éstos incluyen genes que expresan enzimas hidrolíticas, proteínas antifúngicas y péptidos antimicrobianos que son tóxicos para los patógenos o que reducen su crecimiento *in situ* (Punja, 2001). Por medio de la transformación genética se han generado plantas resistentes a hongos, incorporando genes que codifican enzimas como las quitinasas y glucanasas (Grover y Gowthaman 2003). Dicha actividad se ha podido observar en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*, *Agrostis palustris*, *Saintpaulia ionantha*, *Triticum aestivum* y *Oriza* sativa, con genes que codifican para estas enzimas (Zhu *et al*., 1994; Anand *et al*., 2003; Ram y Mohandas 2003; Wang *et al*., 2003; Sridevi *et al*., 2008). En fresa también se ha logrado incorporar estos y otros tipos de genes que confieren resistencia a hongos fitopatógenos importantes como *Sphaerotheca humuli, Verticillium dahliae, Colletotrichum* y *Botrytis cinerea* (Asao *et al*., 1997; Chalavi y Tabaeizadeh 2003; Schestibratov y Dolgov 2005; Vellicce *et al*., 2006; Silva *et al*., 2015). El incremento de la tolerancia en plantas a enfermedades ocasionadas por hongos se ha logrado siguiendo la introducción de genes que codifican PAs como las defensinas, proteínas de transferencia de lípidos, tioninas y snakinas (Grover y Gowthaman 2003; Hammerschlag, 2004; Faccio *et al.,* 2011; García *et al.,* 2014).

En esta investigación se logró obtener plantas de fresa transformadas con el cDNA de snakina de aguacate (*PaSn*) vía *A. tumefaciens* (pCAMBIA-*PaSn*). La confirmación de la transformación se hizo mediante la selección de plantas resistentes a kanamicina, la determinación de la actividad de la ß-glucuronidasa y la validación de la presencia del gen *PaSn.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico:

- Se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Cv. Aromas) establecidas bajo cultivo *in vitro*, las cuales previo a esta investigación se establecieron a partir de meristemos de estolones de plantas cultivadas en invernadero y mantenidas bajo subcultivos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), siguiendo el método reportado para inducción de brotes de fresa (Biswas *et al.,* 2010).

- Se utilizó la cepa de *A. tumefaciens p*GV2260 transformada con el plásmido pCAMBIA-*PaSn* que contiene la secuencia del cDNA de la snakina de aguacate (*PaSn*), además del gen reportero *uidA* y el gen de selección *nptII*, todos bajo el control del promotor 35SCaMV.

Medios y condiciones de cultivo in vitro del material vegetal:

- El medio para inducir la formación de brotes (MIB) en segmentos de la corona de la raíz de plántulas de fresa fue MS suplementado con 0.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 0.1 mg/L de benciladenina (BA), 30 g/L de sacarosa y 4 g/L de phytagel.

- El medio para el desarrollo de plántulas de fresa fue MS (MDP) suplementado con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), 30 g/L de sacarosa y 4 g/L de phytagel (Biswas *et al.,* 2010).

- Las condiciones de incubación para el cultivo *in vitro* de explantes, brotes y plántulas de fresa fueron las siguientes: 25°C y 2000 lux a 16 h de fotoperiodo.

Transformación genética mediada por A. tumefaciens:

- Cultivo bacteriano: La cepa de *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCAMBIA-*PaSn* se creció en medio YM líquido, adicionado con 50 mg/L de Kan, 100 mg/L de Rf y 100 mg/L de Cb a 28°C, en agitación a 210 rpm, hasta que la suspensión bacteriana alcanzó una densidad óptica (OD_{600}) de 0.5.

- Inoculación: Segmentos de la corona de la raíz de aproximadamente 0.5 cm de plántulas de fresa se inocularon en presencia de *A. tumefaciens* en condiciones de oscuridad en medio YM líquido, conteniendo 100 µM de acetosiringona. Los explantes se punzaron con un bisturí y se inocularon durante 1 h (Droste *et al*., 2000).

- Después de la inoculación con la bacteria, los explantes se colocaron en medio MS sólido en condiciones de oscuridad a 28°C sin enjuague previo, con el fin de permitir la interacción explante-bacteria por 24 h. Posteriormente los explantes se colocaron en el medio MIB, conteniendo 500 mg/L de cefotaxima para eliminar la bacteria, incubándose en condiciones de cultivo hasta conseguir la formación de brotes.

Selección de transformantes:

- Para la elección de la concentración letal del antibiótico de selección, se cultivaron explantes de la corona de la raíz de plantas de fresa no transformada, por 30 días en el medio MIB con diferentes dosis de kanamicina (0, 50, 100 y 200 mg/L). Se determinó el porcentaje de mortalidad y síntomas del efecto del antibiótico de selección.

- Los brotes desarrollados en los explantes infectados con *A. tumefaciens* fueron individualizados y cultivados por 30 días en el medio MDP, conteniendo la concentración letal de kanamicina y 500 mg/L de cefatoxima, para seleccionar brotes o plántulas. De las plántulas sobrevivientes se obtuvo el tejido para la verificación de la transformación genética.

Ensayo histoquímico GUS (ensayo de la ß-glucuronidasa):

Para detectar la actividad del gen *uidA* se realizó un ensayo histoquímico basado en el método de Jefferson (1987). Se utilizaron diferentes explantes (hoja y peciolo) de las plantas de fresa resistentes a kanamicina en 500 µl de solución de tinción con el sustrato X-Gluc y se incubaron durante toda la noche a 37°C. La reacción se evaluó con ayuda de un microscopio.

PCR para determinar la presencia del transgen:

La detección del cDNA del gen *PaSn* que codifica para la snakina de aguacate, se realizó por PCR a partir de ADN de las plantas de fresa resistentes a kanamicina que resultaron positivas en el ensayo de GUS con el kit REDExtract-N-Amp-Plant PCR (Sigma Aldrich®). Las condiciones y oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen son las mencionadas en materiales y métodos del apartado anterior (7.1).

RESULTADOS

Elección de la concentración letal de kanamicina:

La determinación de la concentración del antibiótico para la selección de brotes se realizó a partir de brotes regenerados de la corona de la raíz de plántulas *in vitro* de fresa no transformadas, cultivados en MIB con diferentes concentraciones de kanamicina (0, 50, 100 y 200 mg/L). La supervivencia de los brotes de fresa se evaluó a los 30 días, determinando que a partir de la dosis de 50 mg/L, éstos mostraron clorosis pero menos del 50% de mortalidad a esta concentración. Sin embargo, los brotes cultivados en 100 mg/L de kanamicina, observaron un daño significativo del explante, presentando clorosis inicial a los 15 días de cultivo y necrosis generalizada a los 30 días, logrando un 100% de mortalidad en los explantes. Esta misma respuesta fue observada en la concentración de 200 mg/L por lo tanto se determinó que la concentración de 100 mg/L de kanamicina era la adecuada para la selección de las transformantes (Figura 18).

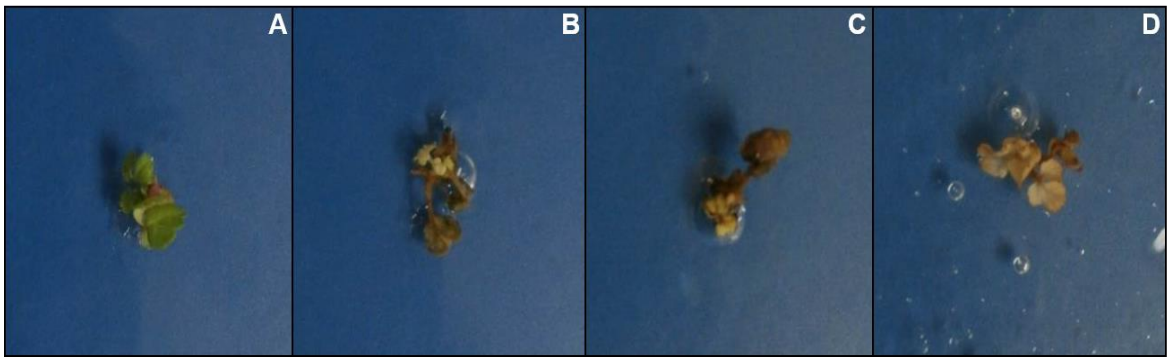


Figura 18. Brotes de fresa sin transformar en medio MIB con diferentes concentraciones de kanamicina: **A)** 0, **B)** 50, **C)** 100, y **D)** 200 mg/L.

Inducción de brotes:

Después de que los explantes de fresa estuvieron bajo el co-cultivo con *A. tumefaciens* incubados en medio MS por 24 h (Figura 19A) y cultivados en medio MIB con cefotaxima por 30 días, se observó la respuesta a la formación de brotes, sin el crecimiento de la bacteria (Figura 19B). En los explantes se produjeron en promedio 7.5 brotes, los cuales desarrollaron hojas a los 30 días de cultivo (Figura 19C). Se realizaron cuatro eventos de transformación con 50 explantes de fresa por cada evento, cultivando en el medio de selección un total de 200 explantes de fresa.

Selección de brotes de fresa transformados:

Después de 30 días de cultivo en MIB con 100 mg/mL de kanamicina, solamente un 10% de los explantes sobrevivieron, de éstos se formaron brotes en un promedio de 5 brotes/explante, los que fueron individualizados y subcultivados por 30 días más en medio MIB con 100 mg/L de kanamicina. En este periodo se seleccionaron 20 brotes resistentes al antibiótico de selección que no mostraron síntomas de clorosis o necrosis (Figura 19D).

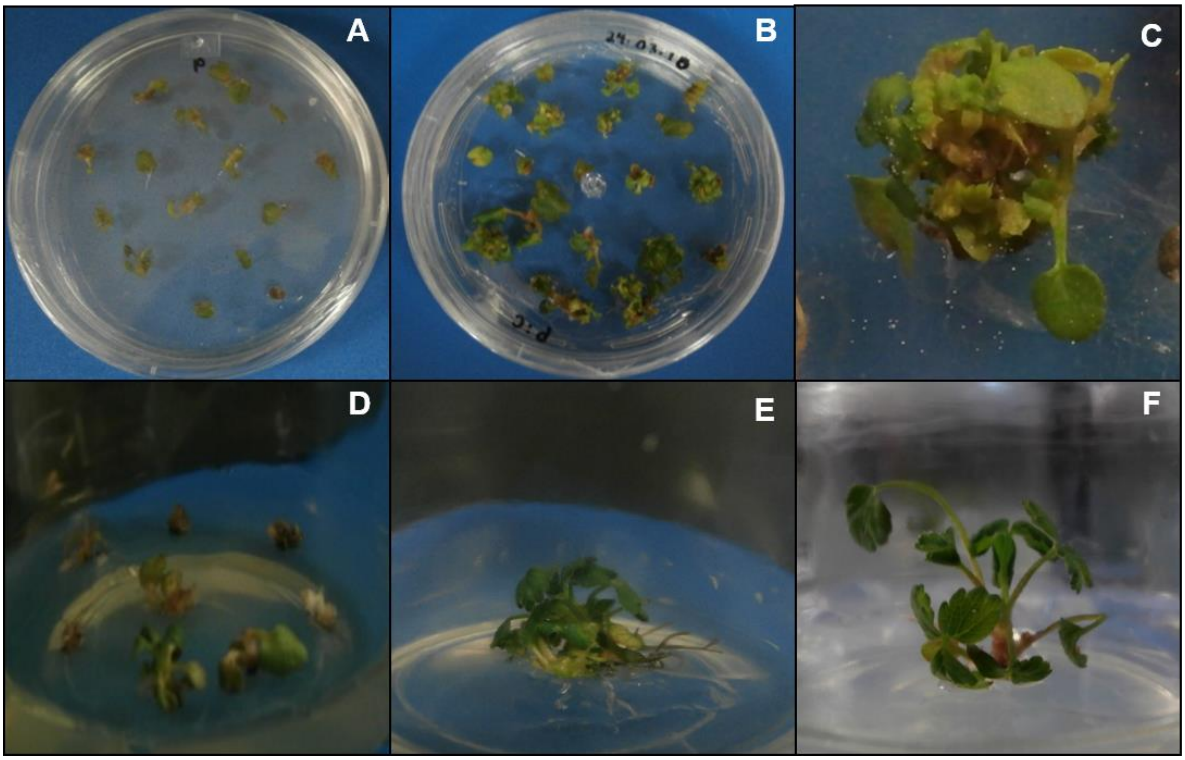


Figura 19. Imágenes representativas del método de transformación genética de fresa por *A. tumefaciens*: **A)** Explantes de fresa durante el co-cultivo por 24h con *A. tumefaciens* (MS); **B)** Formación de brotes en explantes de fresa co-cultivados con *A. tumefaciens*, después de 30 días en MIB (MS + 0.5 mg/L de ANA + 0.1 mg/L BA + 500 mg/L cefotaxima); **C)** Brotes regenerados en segmentos de la corona de la raíz de plántulas de fresa (30 días de cultivo); **D)** Brotes de fresa resistentes a kanamicina (100 mg/L) (30 días de cultivo); **E)** Plántula de fresa resistente a kanamicina en medio MDP + kanamicina (30 días de cultivo); **F)** Plántula de fresa resistente a kanamicina en medio MDP + 1 mg/L de GA3

Los brotes resistentes a kanamicina fueron cultivados en medio MDP con kanamicina por 30 días, consiguiendo la formación de raíces y el crecimiento de plántulas resistentes a kanamicina, obteniendo un total de 20 plántulas consideradas como transformantes. El crecimiento de éstas plántulas se observó disminuido hasta en un 50% comparándolas con las plántulas control no transformadas, presentando un diámetro de la roseta de 0.5 cm, con una alta proliferación de hojas, también de menor tamaño.

Cada plántula fue individualizada y mantenida hasta por 90 días en medio MDP con kanamicina observando un crecimiento reducido (Figura 19E). Con el propósito de obtener plántulas con un crecimiento y tamaño óptimos para las pruebas de verificación de la transformación, éstas fueron cultivadas en medio MDP adicionado con 0.1 mg/L de ácido giberélico (GA3), consiguiendo estimular el crecimiento de las plántulas hasta el tamaño de las plántulas control no transformadas, presentado un diámetro de la roseta de 4.5 cm y un óptimo número y tamaño de hojas y raíces a los 45 días de cultivo (Figura 19F). De estas plántulas se obtuvo el material para el ensayo histoquímico de GUS y la amplificación por PCR.

Verificación de la transformación genética en plántulas de fresa:

- *Ensayo histoquímico GUS*

Diferentes explantes (hoja y peciolo) de las plántulas de fresa seleccionadas que crecieron en 100 mg/mL de kanamicina fueron sometidos al ensayo histoquímico de GUS. En este ensayo se observó la coloración azul característica que indica la expresión del gen reportero. La tinción se observó principalmente en las células que rodean a los hidátodos de hojas de fresa (Figura 20A) y en células de peciolo (Figura 20B). De esta forma se determinó la actividad de la ß glucuronidasa expresada por el gen reportero *uidA*, sugiriendo el éxito de la transformación genética con *A. tumefaciens* pCAMBIA-*PaSn*.

- *Amplificación del gen PaSn por PCR*

La evaluación de la presencia del gen *PaSn* por PCR se llevó a cabo en cuatro plántulas de fresa de 120 días de cultivo en medio MDP, seleccionadas por resistencia a kanamicina y con expresión de la ß glucuronidasa. Esta evaluación mostró que tres de las cuatro plantas analizadas amplificaron un fragmento de aproximadamente 318pb que corresponden a la secuencia reportada para el cDNA del gen *PaSn* (Figura 21), confirmando que el gen *PaSn* fue trasferido al genoma de estas plantas de fresa.

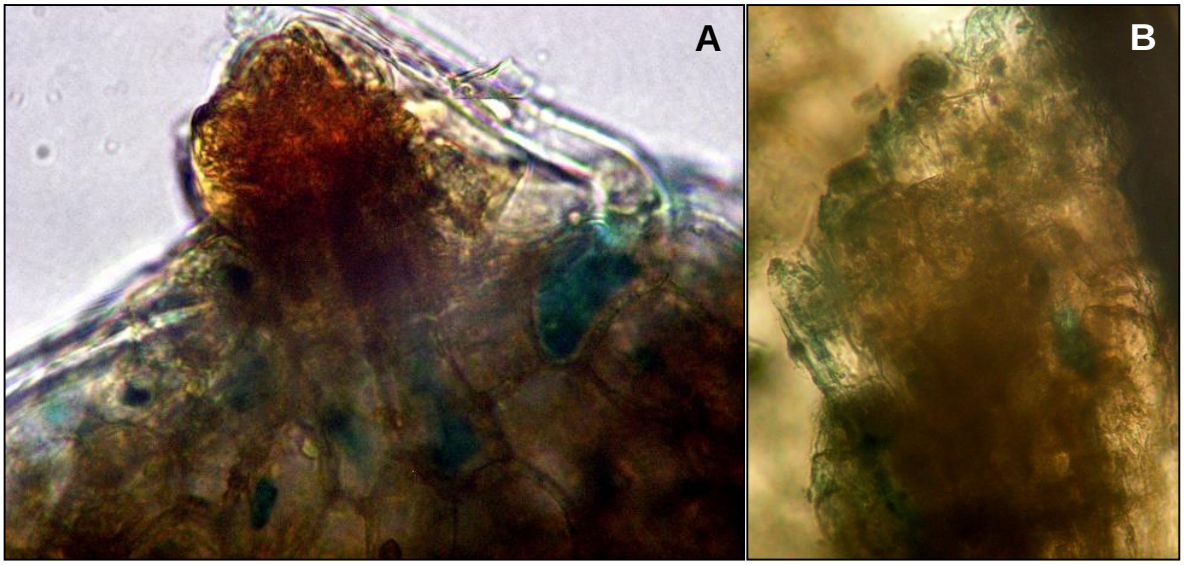


Figura 20. Expresión de la ß-glucuronidasa en plántulas de fresa transformadas. **A)** Segmento de hoja. **B)** Segmento de peciolo.

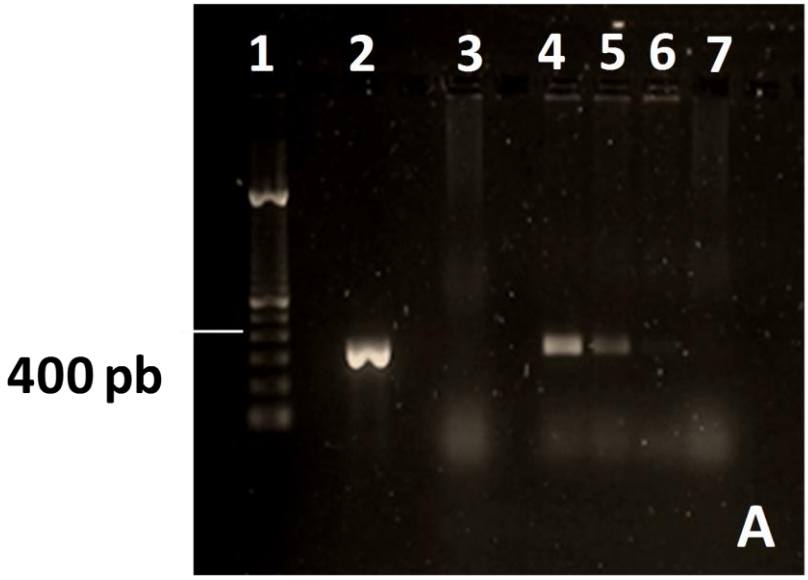


Figura 21. Amplificación por PCR directo del gen *PaSn* del ADN de plantas de fresa transformadas con *A. tumefaciens*. 1: Marcador de tamaño molecular 100pb (Invitrogen® Tracklt 100pb DNA Ladder Cat. 10488-058); 2: Control positivo (ADN plasmídico pTriplEx2-*PaSn*); 3: Control negativo (Fresa no transformada); 4-7: Productos de PCR

CONCLUSIÓN

Se obtuvieron plantas de fresa transformantes vía *A. tumefaciens*. La transformación fue confirmada mediante la selección de plantas resistentes a kanamicina, la determinación de la actividad de la ß-glucuronidasa y la validación de la presencia del gen *PaSn.*

LITERATURA CITADA

Anand, A., Zhou, T., Trick, H. N., Gill, B. S., Bockus, W. W., y Muthukrishnan, S. 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. Journal of Experimental Botany, 54(384):1101-1111.

Asao, H., Nishizawa, Y., Arai, S., Sato, T., Hirai, M., Yoshida, K., Atsuhiko Shinmyo A. y Hibi, T. 1997. Enhanced Resistance against a Fungal Pathogen *Sphaerotheca humuli* in Transgenic Strawberry Expressing a Rice Chitinase Gene. Plant Biotechnology, 14(3):145-149.

Biswas, M.K., Roy U.K., Islam R. y Hossain M. 2010. Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria* sp.) clones. Turk Journal Biology, 34:75-80.

Chalavi, V., Tabaeizadeh, Z., y Thibodeau, P. 2003. Enhanced resistance to Verticillium dahliae in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene. Journal of the american society for horticultural science, 128(5):747-753.

Chávez-Camacho, M., Valadez-Moctezuma, E., Carrillo-Castañeda, G., y Lozoya-Gloria, E. 2002. Expresión transitoria del gen de la β-glucuronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrathema grandiflorum*).Revista Chapingo Serie Horticultura, 8(1):107-121.

Droste, A., Pasquali, G., y Bodanese-Zanettini, M. H. 2000. Integrated bombardment and Agrobacterium transformation system: An alternative method for soybean transformation. Plant Molecular Biology Reporter, 18(1): 51-59.

Faccio, P., Vazquez-Rovere, C., Hopp, E., González G., Décima-Oneto, C., Favret, E., Díaz-Paleo, A. y Franzone, P. 2011. Increased tolerance to wheat powdery mildew by heterologous constitutive expression of the *Solanum chacoense* snakin-1 gene. In Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47:S135–S141.

Fonseca, A. M. V., Isaza, R. A., y Kafuri, L. A. 2005. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada". Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 58(1):2569-2585.

García, A.N., Ayub, N. D., Fox, A.R., Gómez, M.C., Diéguez, M.J., Pagano, E.M., Berini, C.A., Muschietti, J.P. y Soto, G. 2014. Alfalfa snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia. Plant biology, 14 (1):248.

Grover, A., y Gowthaman, R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Current Science, 84(3):330-340.

Hammerschlag, F. A. 2004. In Vitro Inhibitory Activity of Antimicrobial Peptides Cecropin, α-Thionin DB4, and γ-Thionin RsAFP1 Against Several Pathogens of Strawberry and Highbush Blueberry. HortScience, 39(5):1053-1055.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant molecular biology reporter, 5(4):387-405

Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3):473-497.

Punja, Z. K. 2001. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens a review of progress and future prospects. Canadian Journal of Plant Pathology, 23(3):216-235.

Ram, M. N., y Mohandas, S. 2003. Transformation of African violet (*Saintpaulia ionantha*) with glucanase-chitinase genes using *Agrobacterium tumefaciens*. Acta horticulturae, 624:471-478.

Schestibratov, K. A., y Dolgov, S. V. 2005. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. Scientia Horticulturae, 106(2):177-189.

Silva, K. J. P., Brunings, A., Peres, N. A., Mou, Z., & Folta, K. M. 2015. The Arabidopsis NPR1 gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry. Transgenic research, 24(4):693-704.

Sridevi, G., Parameswari, C., Sabapathi, N., Raghupathy, V., y Veluthambi, K. 2008. Combined expression of chitinase and β-1, 3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. Plant science, 175(3):283-290.

Vellicce, G. R., Ricci, J. C. D., Hernández, L., y Castagnaro, A. P. 2006. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. Transgenic research, 15(1):57-68.

Wang, Y., Kausch, A. P., Chandlee, J. M., Luo, H., Ruemmele, B. A., Browning, M., y Goldsmith, M. R. 2003. Co-transfer and expression of chitinase, glucanase, and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. Plant Science, 165(3):497-506.

Zhu, Q., Maher'fl, E. A., Sameer Masoud, R. A., y Lamb, C. J. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Bio/technology, 12:807-812.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

La transformación genética es un método útil para producir nuevos materiales ya que puede hacer uso de genes aislados de un gran número de especies (Schestibratov y Dolgov, 2005), constituyendo así una herramienta para estudios básicos que permiten conocer y/o profundizar acerca de la estructura y función de genes específicos.

En la presente investigación se obtuvieron plantas transgénicas de fresa transformadas con la secuencia del gen de snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano, bajo el control de un doble promotor 35S vía *Agrobacterium tumefaciens*. Este gen es un miembro de la familia snakina/GASA aislado de aguacate nativo mexicano que ha sido previamente implicado en resistencia a enfermedades bacterianas (Guzmán-Rodríguez *et al.,* 2013a).

La transformación genética mediada por *A. tumefaciens* ha sido extensamente usada como vehículo para transferir genes en un amplio rango de plantas dicotiledóneas (Nehra *et al.,* 1990) y el éxito con la producción de plantas transgénicas usando transferencia de genes por este método depende principalmente de la disponibilidad de regeneración de brotes a partir de un tejido especifico, la susceptibilidad del cultivo a *A. tumefaciens* y la sensibilidad de los tejidos a los antibióticos utilizados para la selección.

Por lo tanto la disponibilidad de sistemas de regeneración y propagación junto con la susceptibilidad a la infección por *A. tumefaciens* hace que la fresa sea adecuada para estudios de transformación genética, además de que la propagación clonal de fresa proporciona una ventaja adicional para la transferencia estable de genes asociados con rasgos agronómicos deseables para genotipos importantes comercialmente (Vellicce *et al*., 2003), por lo que el desarrollo de técnicas de transformación para fresa ya ha sido reportado (James *et al.,* 1990; Nehra *et al.,* 1990; Jimenez-Bermudez *et al.,* 2002; Agius *et al.,* 2003).

Regeneración in vitro de plantas de fresa

La regeneración de brotes de fresa (*F.* x *ananassa* Cv. Aromas) fue posible a través del uso de explantes de corona de raíz y no de discos de hoja como en la mayoría de los reportes de transformación en fresa. En el medio MS adicionado con 0.1 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BA, se indujo a la formación de brotes a los 30 días del cultivo, obteniendo en promedio 7.5 brotes/explante. Lo anterior confirmó lo reportado por Biswas *et al.,* (2010), quienes establecieron estas concentraciones de auxina y citocinina como óptima en la producción de brotes de fresa. La formación de raíces en los brotes micropropagados de fresa fue obtenida, al cultivarlos en MS con 0.05 mg/L de BA, desarrollando plántulas de 4.5 cm de diámetro de la roseta, con un óptimo número y tamaño de hojas y raíces a los 45 días del cultivo.

Con el establecimiento de este protocolo de la micropropagación de fresa Cv. Aromas, a partir de segmentos de coronas de raíz, se aseguró la regeneración de brotes y formación de plántulas transformadas, siguiendo el método de transformación genética con *A. tumefaciens,* sometiendo los explantes a la infección con la técnica de co-cultivo.

Obtención de la CL de kanamicina para plántulas de fresa

Para la selección positiva de plantas transgénicas durante el periodo de regeneración de brotes y desarrollo de plántulas, es necesario el uso de una concentración letal (CL) del antibiótico de selección, que en esta investigación es kanamicina. Con la expresión del gen *nptII*, el gen marcador del vector binario pCAMBIA-*PaSn* utilizado en esta investigación, las células transformadas sintetizan la enzima neomicín fosfotransferasa, la cual inactiva al antibiótico y las plántulas transgénicas pueden sobrevivir en el medio de cultivo con kanamicina (Vega *et al.,* 1999).

Las plántulas sin transformar de fresa Cv. Aromas presentaron un 100% de mortalidad desde la concentración de 100 mg/L de kanamicina, por lo tanto esta concentración fue utilizada en el medio de selección de transfomantes. Esta concentración de antibiótico se encuentra dentro del rango reportado para la selección de plantas de fresa transformadas, que está entre 50 y 450 mg/L de kanamicina (López y Chaparro, 2007).

Obtención de plantas de transgénicas de fresa

Una vez que se realizó la construcción del vector binario con el gen de la snakina (*PaSn*) y se obtuvo la cepa de *A. tumefaciens* (*p*GV2260 con el vector binario pCAMBIA-*PaSn*) para la transformación de fresa, los explantes de fresa fueron infectados con el método de co-cultivo, los cuales posteriormente fueron cultivados en el medio inductor de brotes con kanamicina para las selección de líneas transformadas. Del total de explantes de segmentos de corona de raíz de fresa, tratados con *A. tumefaciens,* un 22% de los brotes regenerados fueron resistentes a kanamicina, indicativo de la inserción del plásmido pCAMBIA-*PaSn,* que como ya se mencionó se debe a la presencia del gen *nptII.*

Cada línea resistente a kanamicina fue micropropagada para obtener un mayor número de plántulas, las que fueron sometidas al análisis de confirmación de la transformación genética.

Confirmación de la transformación genética en plantas de fresa

Primeramente, las líneas seleccionadas en el medio con kanamicina, fueron sometidas al ensayo histoquímico GUS que refleja la expresión de la ß-glucuronidasa, indicativo de la expresión del gen reportero *uidA,* que también se encuentra en el vector de transformación. Los tejidos ensayados dieron la prueba positiva (coloración azul), observando que al menos un 75% de las líneas mostraron la expresión del gen correspondiente.

Aunque la expresión está regulada por el doble promotor 35S (expresión constitutiva), en los ensayos de GUS solamente pudo observarse la coloración azul en cierto tipo células, como las que rodean los hidátodos (en la periferia de las hojas), en la base de la hoja y de forma más generaliza en los peciolos. Solo los tejidos de una de las líneas seleccionadas mostraron la expresión fuerte, Las diferencias en los niveles de expresión se puede deber a la manera aleatoria en la que es insertado al genoma el fragmento de T-DNA que a su vez contiene el cDNA. Esto podría explicar porque la actividad de β-glucuronidasa fue diferencial dependiente de las líneas seleccionadas (García-Reyes *et al.,* 2010).

La presencia del transgen (*PaSn*) se comprobó por PCR en las líneas resistentes a kanamicina y que dieron positiva la expresión del gene *uidA,* lo que indica que la transformación genética con la construcción obtenida vía *A. tumefaciens,* fue exitosa al menos en algunas de las líneas transformadas de fresa Cv. Aromas.

Debido a que el gen *FaGAST* (miembro de la familia snakinas/GASA) está reportado en el genoma de fresa (de la Fuente *et al*., 2006), se realizó un estudio para comprobar que la amplificación del transgen *PaSn* fuera específica. La homología de este gen con otras proteínas de la misma familia se encuentra en un rango entre 51% a 62% de similitud a nivel de aminoácidos. Sin embargo cuando solo la región C terminal es comparada, la similitud incrementa de un 80 a 75% (de la Fuente *et al*., 2006) como lo observado en el alineamiento de secuencias de aminoácidos de este gen con el de *PaSn* (Figura 22). En dicho alineamiento también se puede observar que se carece de homología o similitud en la región N terminal (péptido señal) de ambos genes, fundamentando de esta forma que la posibilidad de una amplificación de *FaGAST* con los oligonucleótidos diseñados para *PaSn* no puede ser posible. Para descartar esta posibilidad se hizo una amplificación por PCR en ADN y ADNc de fresa control, en donde no hubo ningún producto amplificado como resultado (datos no mostrados), quedando descartada la idea de una amplificación de *FaGAST* en las líneas resistentes a kanamicina consideradas transformantes.

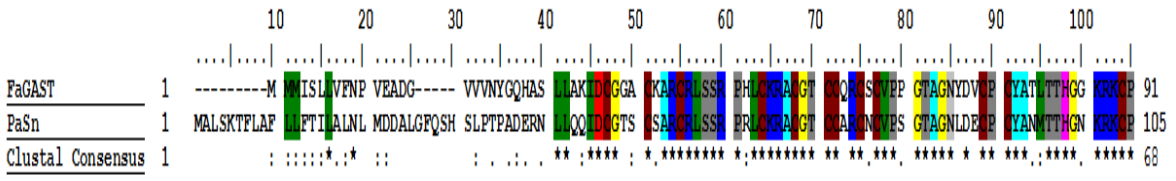


Figura 22. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de snakina de aguacate (*PaSn*) y snakina de fresa (*FaGAST*). Los aminoácidos conservados se indican con un asterisco en la secuencia consenso.

Cabe destacar que es importante el seguimiento de la caracterización molecular para conocer el número de copias del transgen y revelar los niveles de expresión. Además, otro aspecto importante a considerar es evaluación del genotipo mostrado de las líneas transgénicas ya que Almasia *et al.* (2008) sugieren que la expresión constitutiva de snakina-1 no parece alterar la fisiología de plantas transgénicas de papa ya que no mostraron genotipos diferentes al tipo silvestre en condiciones de invernadero y contrario a esto la expresión de *FaGAST* causó en *Fragaria vesca* transgénica un retraso en el crecimiento de la planta y una reducción del tamaño en el fruto en comparación con las plantas control respondiendo a la aplicación exógena de giberelina, incrementando los niveles de transcripción en frutos de fresa a diferencia de lo reportado para snakina-1 y snakina-2 que no responden a estímulos por giberelinas (de la Fuente *et al.* 2006). Las plantas transgénicas de fresa Cv. Aromas con el gen *PaSn* mostraron un comportamiento similar a la de *Fragaria vesca,* presentando un retraso en el crecimiento de las plántulas *in vitro,* el cual fue revertido con la aplicación de ácido giberélico (0.1 mg/L GA3), lo cual sugiere que este gen responde a estímulos por giberelinas.

La generación de plantas transformadas de fresa Cv. Aromas con el gen de la snakina (*PaSn*) de aguacate nativo mexicano, es la primera etapa para continuar con los estudios de expresión de este péptido antimicrobiano y confirmar su función antifúngica, determinando los niveles de expresión del gen y la tolerancia a *B. cinerea,* el principal hongo causante de pérdidas en la producción de fresa.

IX. CONCLUSIÓN

Se obtuvo la construcción pCAMBIA-*PaSn* por la clonación del gen *PaSn* de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), esta construcción fue transferida a la cepa *p*GV2260 de *A. tumefaciens.* Con esta cepa se transformaron las plantas de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Cv. Aromas) las cuales fueron analizadas mostrando la expresión de los genes *nptII* y *uidA,* así como la presencia del gen *PaSn.*

X. PERSPECTIVAS

Para evaluar la función antifúngica del gen *PaSn* en las plantas transgénicas de fresa, es recomendable la caracterización molecular de las transformantes analizando el número de copias y los niveles de expresión en las diferentes generaciones para asegurar la estabilidad del transgen. Posteriormente, éstas deben ser sometidas a ensayos de tolerancia *in vitro* contra hongos fitopatógenos como *B. cinerea.*

XI. LITERATURA GENERAL

Agius, F., Gonzalez-Lamothe L., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J., Botella M.A. y Valpuesta, V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. Nature Biotechnology, 21**,**177-181.

Almasia, N.L., Bazzini, A. A., Hopp, H. E. y Vazquez-Rovere, C. 2008. Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. Molecular Plant Pathology, 9(3), 329-338.

Asao, H., Nishizawa, Y., Arai, S., Sato, T., Hirai, M., Yoshida, K., Atsuhiko Shinmyo, A. y Hibi, T. 1997. Enhanced Resistance against a Fungal Pathogen *Sphaerotheca humuli* in Transgenic Strawberry Expressing a Rice Chitinase Gene. Plant Biotechnology, 14(3), 145-149.

Balaji, V. y Smart, C.D. 2012. Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). Transgenic Research, 21(1), 23-37.

Barbosa-Peligrini, P., del Sarto, R. P., Silva, O. N., Franco, O. L. y Grossi-de-Sa, M. F. 2011. Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. Biochemistry Research International, 2011, 250349.

Bechinger, B. y Lohner, K. 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1758(9),1529-1539.

Berrocal-Lobo, M. Segura, A., Moreno M., Lopez G., Garcia-Olmedo, F. y Molina, A. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. Plant Physiology, 128 (3), 951-961.

Biswas, M.K., Roy U.K., Islam R. y Hossain, M. 2010. Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria* sp.) clones. Turk Journal Biology, 34, 75-80.

Brogden, K. A. 2005.Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology, 3(3), 238-250.

Caaveiro, J. M. M., Molina, A., González-Mañas, J. M., Rodríguez-Palenzuela, P., García-Olmedo, F., y Goñi, F. M. 1997. Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. FEBS letters, 410(2), 338-342.

Chalavi, V., Tabaeizadeh, Z. y Thibodeau, P. 2003. Enhanced Resistance to *Verticillium dahliae* in Transgenic Strawberry Plants Expressing a *Lycopersicon chilense* Chitinase Gene. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128 (5), 747-753.

Chan, Y. L., Prasad, V., Chen, K. H., Liu, P. C., Chan, M. T., y Cheng, C. P. 2005. Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (*Thi2. 1*) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. Planta, 221(3), 386-393.

Cortés-Rodríguez, M. A., Hernández García, A., López Gómez, R., y Salgado Garciglia, R. 2013. La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 12(2), 143-150.

Dawson, R.M. y Liu, C. Q. 2008. Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. Critical Reviews in Microbiology, 34(2), 89-107.

de la Fuente, J.I., Amaya, **I., Castillejo, C., Sánchez-Sevilla, J.F., Quesada, M. A., Botella**, **M.A. y Valpuesta, V. 2006**. The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation. Journal of experimental botany, 57(10), 2401-2411.

de Souza Cândido, E., e Silva Cardoso, M.H., Sousa, D. A., Viana, J. C., de Oliveira-Júnior, N. G., Miranda, V., y Franco, O. L. 2014. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. Peptides, 55, 65-78.

Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. y Kisich, K.O. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. Current pharmaceutical design, 15 (21) 2377-92.

Domergue, F., Helms, G.L., Prusky, D. y Browse, J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. Phytochemistry, 54(2),183-189.

Faccio, P., Vazquez-Rovere, C., Hopp, E., González G., Décima-Oneto, C., Favret, E., Díaz-Paleo, A. y Franzone, P. 2011. Increased tolerance to wheat powdery mildew by heterologous constitutive expression of the Solanum chacoense snakin-1 gene. In Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47, S135–S141.

Franco, O. L., Murad, A. M., Leite, J. R., Mendes, P. A., Prates, M. V., y Bloch, C. 2006. Identification of a cowpea γ-thionin with bactericidal activity. FEBS Journal, 273(15), 3489-3497.

Furukawa, T., Sakaguchi, N. y Shimada, H. 2006. Two OsGASR genes, rice GAST homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different

expression patterns in developing panicles. Genes & genetic systems, 81(3),171-180.

Galindo-Tovar, M.E., Ogata-Aguilar, N. y Arzate-Fernández, A. M. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. Genetic Resources and Crop Evolution, 55 (3), 441-450.

Gao, A. G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D.M., Liang, J., y Rommens, C. M. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. Nature biotechnology, 18(12), 1307-1310.

García, A.N., Ayub, N. D., Fox, A.R., Gómez, M.C., Diéguez, M.J., Pagano, E.M., Berini, C.A., Muschietti, J.P. y Soto, G. 2014. Alfalfa snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia. Plant biology, 14 (1), 248.

García-Olmedo, F., Rodríguez – Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M. y Poza-Carrión, C. 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. FEBS Letters, 498 (2), 219-222.

García-Reyes, B., Montes-Horcasitas M.C., Ramos-Ramírez E.G., Ariza-Castolo A., Pérez-Vargas J., Gómez-Guzmán O. y Calva-Calva, G. 2010. Clonación del cDNA del gen de la insulina humana en raíces aéreas de *Brassica oleracea* var italica (brócoli). Revista CENIC Ciencias Biológicas, 41, 1-9.

Guzmán-Rodríguez, J.J., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Ochoa-Zarzosa, A., Suárez-Rodríguez, L.M., Rodríguez-Zapata, L.C., Salgado-Garciglia, R., Jimenez-Moraila, B., López-Meza, J.E. y López-Gómez, R. 2013a. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from avocado seed (Persea americana var. drymifolia) reveals abundant expression of the gene encoding the antimicrobial peptide snakin. Physiology and Biochemistry, 70, 318-324.

Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L.M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L.C., Ochoa-Zarzosa, A. y López-Meza, J.E. 2013b. Antibacterial Activity of Defensin *PaDef* from Avocado Fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) Expressed in Endothelial Cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 2013, 10.1155.

Hammerschlag, F.A. 2004. In Vitro Inhibitory Activity of Antimicrobial Peptides Cecropin, α-Thionin DB4, and γ-Thionin RsAFP1 Against Several Pathogens of Strawberry and Highbush Blueberry. HortScience, 39(5), 1053-1055.

Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D. y Sarhan, F. 2004. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. Plant Biotechnology Jounal, 2(5), 381-387.

Husaini, A. M., y Abdin, M. Z. 2008. Overexpression of tobacco osmotin gene leads to salt stress tolerance in strawberry (*Fragaria x ananassa Duch*.) plants. Indian J Biotechnol, 7, 465-472.

James, D.J., Passey A.J., Barbara, D.J. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria* x *anannassa* Duch) using disarmed binary vectors. Plant Sci., 69, 79–94.

Jimenes-Bermudez, S., Redondo-Nevado J., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L., Lopez-Aranda, J.M., Valpuesta V., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A. y Mercado, J.A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol.,128, 551-559.

Khammuang, S., Dheeranupattana, S., Hanmuangjai, P. y Wongroung, S. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of modified antifreeze protein gene in strawberry. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 27(4), 693-703.

Kovalskaya, N. y Hammond, R.W. 2009. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakin-1 and defensin recombinant proteins. Protein Expression and Purification, 63(1), 12-17.

Kovalskaya, N., Zhao, Y. y Hammond, R.W. 2011. Antibacterial and Antifungal Activity of a Snakin-Defensin Hybrid Protein Expressed in Tobacco and Potato Plants. The Open Plant Science Journal, 8 (5), 29-42.

Lay, F. T. y Anderson, M. A. 2005. Defensins - Components of the Innate Immune System in Plants. Current Protein and Peptide Science, 6 (1), 85-101.

López, A. y Chaparro, A. 2007. Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp andigena var. Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Agronomía Colombiana, 25(1), 16-25.

López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar, J. A. y Loeza-Lara, P. D. 2011. Antimicrobial peptides: diversity and perspectives for their biomedical application. Biomedical engineering, trends, research and technologies. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, 275-304.

Molina, A. y García-Olmedo, F. 1997. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. The Plant Journal, 12(3), 669-675.

Montaño-Pérez, K. y Vargas-Albores, F. 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. Interciencia. 27(1), 21-27.

Nahirñak, V., Almasia, N. I., Hopp, H. E., y Vazquez-Rovere, C. 2012. Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. Plant signaling & behavior, 7(8), 1004-1008.

Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W. y Goździcka-Józefiak, A. 2014. Plant antimicrobial peptides. Folia Microbiologica, 59(3),181-196.

Nehra, N.S, Chibbar R.N., Kartha K.K., Datla R.S.S., Crosby W.L. y Stushnoff, C. 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. Plant Cell Rep., 9, 293-298.

Ordeñana, K. M. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63,22-32.

Padovan, L., Scocchi, M. y Tossi, A. 2010. Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides. Current Protein and Peptide Science. 11(3), 210-219.

Porto, W. F., y Franco, O. L. 2013. Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. Peptides, 44, 163-167.

Powers, J. P. y Hancock, R.E. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides, 24 (11), 1681-91.

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R. y Tsutsumi, V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. Salud pública México, 48 (1), 62-71.

Rojas-Arias, A. C. y Zamora-Espitia, H.M. 2010. Plant Defensins and Their Potential Use as Pest Control in Agriculture. Acta Biológica Colombiana, 5 (3), 33-46.

Saitoh, H., Kiba, A., Nishihara, M., Yamamura, S., Suzuki, K., y Terauchi, R. 2001. Production of antimicrobial defensin in *Nicotiana benthamiana* with a potato virus X vector. Molecular plant-microbe interactions, 14(2), 111-115.

Schestibratov, K.A. y Dolgov, S.V. 2005. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. Scientia Horticulturae, 106 (2), 177-189.

Segura, A., Moreno, M., Madueño F., Molina, A. y García-Olmedo, F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions, 12(1), 16-23.

Selitrennikoff, C. P. 2001. Antifungal proteins. Applied and environmental microbiology, 67(7), 2883-2894.

Silva, K.J., Brunings, A., Peres, N.A., Mou, Z. y Folta, K.M. 2015. The Arabidopsis *NPR1* gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry. Transgenic Res. 24(4), 693-704.

Téllez, G.A. y Castaño, J.C. 2010. Péptidos antimicrobianos. Infectio, 4 (1), 55-67.

Thomma, B. P., Cammue, B. P. y Thevissen, K. 2002. Plant defensins. Planta, 216 (2), 193-202.

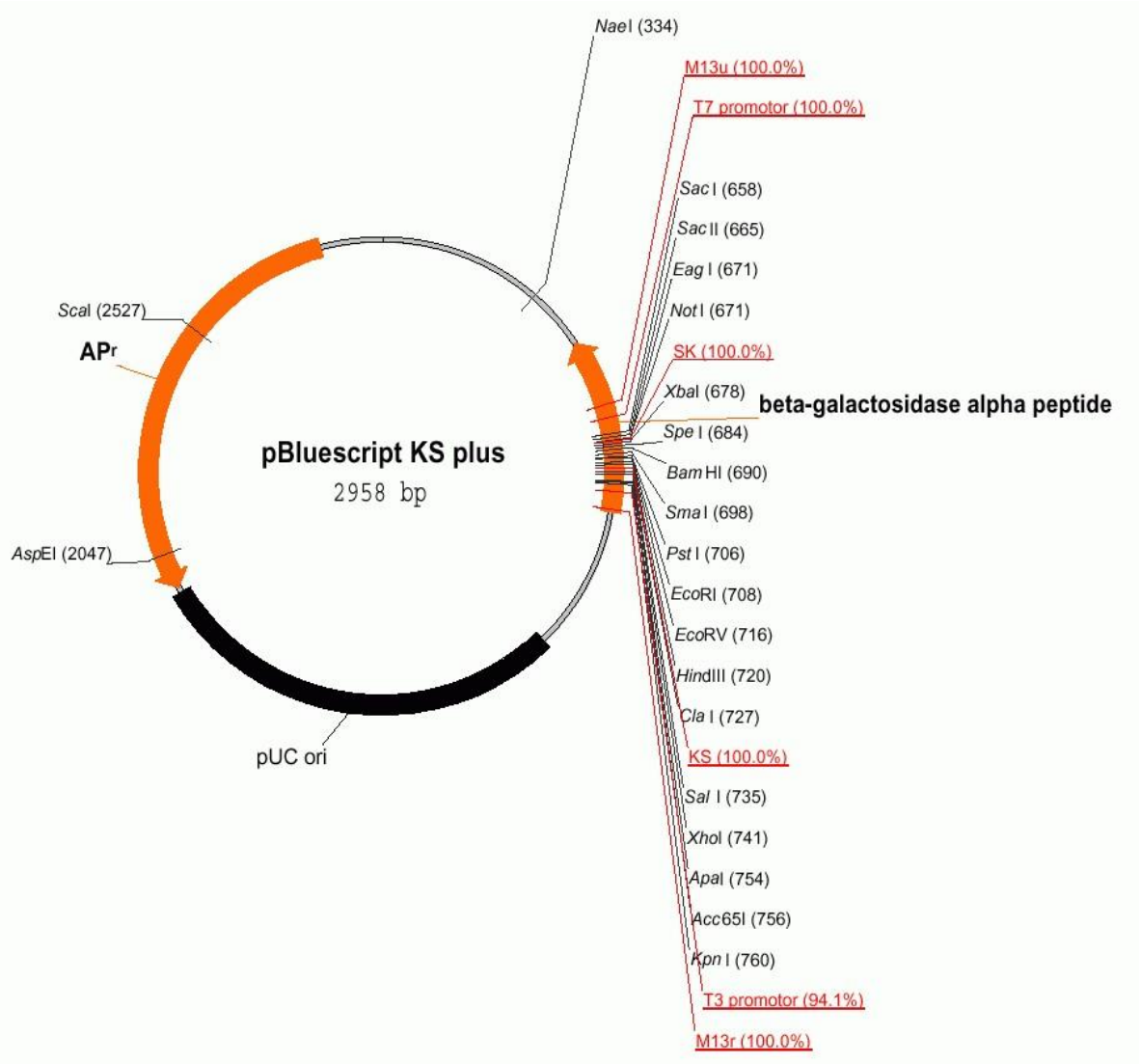
Vega, M., Bontoux L. y Llobell A. 1999. Biotecnología para una agricultura respetuosa con el medio ambiente. The IPTS Report, 31, 1-5.

Vellicce, G. R., Coll, Y., Castagnaro, A. y Ricci, J. C. D. 2003. Transformation of a strawberry cultivar using a modified regeneration medium.HortScience, 38(2), 277-280.

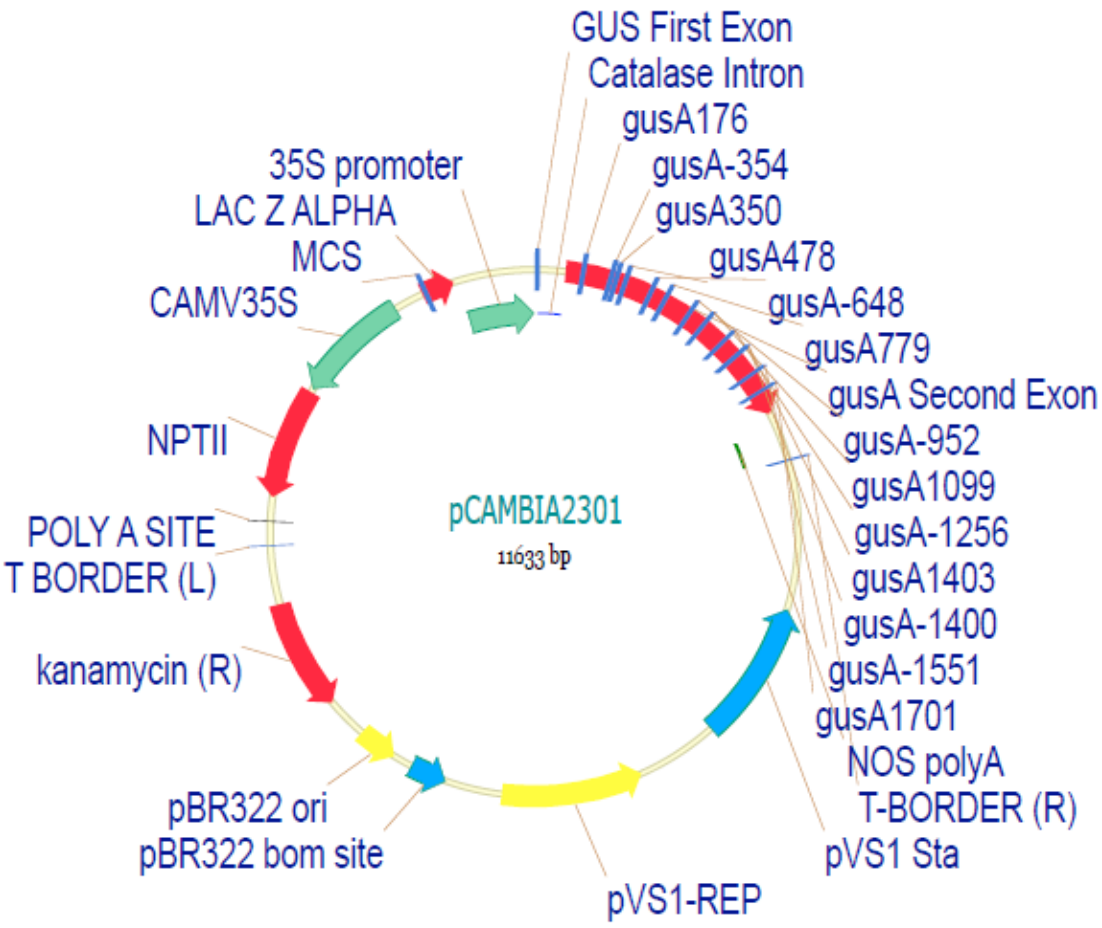
Vellicce, G.R., Ricci J.C.D., Hernández, **L. y Castagnaro, A.P. 2006**. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in strawberry. Transgenic Research, 15 (1), 57-68.

XII. ANEXOS

Anexo I. Vector pBluescript KS.



Anexo II. Vector binario p-CAMBIA2301.



Anexo III. Medios de cultivo y soluciones.

- Medio LB

	1 L
Tryptona	10 g
NaCl (cloruro de sodio)	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar bacteriológico	15 g

- Medio YM

	1 L
Manitol	10 g
$MgSO_4$-$7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado)	200 mg
K_2HPO_4-$3H_2O$ (fosfato de potasio dibásico trihidratado)	500 mg
Extracto de levadura	400 mg
NaCl (cloruro de sodio)	100 mg
Agar bacteriológico	15 g

- Solución de tinción (ensayo GUS)

	5 ml
Buffer 5X	1 ml
MeOH (metanol)	1 ml
H_2O	3 ml
X-Gluc	5 mg

Buffer 5X	**10 ml**
Buffer de fosfatos	9 ml
EDTA 0.5M	1 ml
K_4 $Fe(CN)_6$ (ferrocianuro potásico)	10.6 mg
K_3 $Fe(CN)_6$ (ferricianuro potásico)	8.2 mg

Buffer de fosfatos pH 7.0	**10 ml**
NaH_2PO_4 (fosfato monosódico)	3.9 ml
Na_2HPO_4 (fosfato disódico)	6.1 ml