



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA



EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES
RELACIONADOS CON FOTOSÍNTESIS Y
DEFENSA INDUCIDA POR MICORRIZACIÓN EN
TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

TESIS

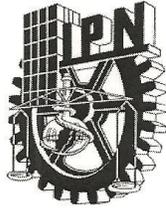
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

MARÍA ALEJANDRA GONZÁLEZ ORTIZ

GUASAVE, SINALOA; MÉXICO DICIEMBRE DE 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Guasave Sinaloa el día 7 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe María Alejandra González Ortiz alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE** con número de registro B091658, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Melina López Meyer y Dr. Sergio Medina Godoy y cede los derechos del trabajo intitulado Expresión diferencial de genes relacionados con fotosíntesis y defensa inducida por micorrización en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección mari_ale223@hotmail.com, mlopez@ipn.mx, smedinam@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

I. B. María Alejandra González Ortiz
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa a 6 de diciembre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión ordinaria No. 11 celebrada el día 3 del mes de noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

González	Ortiz	María Alejandra
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	6	5	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Expresión diferencial de genes relacionados con fotosíntesis y defensa inducida por micorrización en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Analizar la expresión de genes de proteínas diferencialmente acumuladas en hojas de tomate en respuesta a la colonización de *Rhizophagus intraradices* y a la posterior infección con el patógeno *X. campestris pv. vesicatoria* para determinar su importancia en la inducción de resistencia a patógenos foliares y su nivel de regulación.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Melina López Meyer y Dr. Sergio Medina Godoy

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CIIDIR - Sinaloa

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Melina López Meyer

Aspirante

María Alejandra González Ortiz

Dr. Sergio Medina Godoy

Presidente del Colegio



Dr. Jorge Montiel Montoya

CIIDIR - IPN
DIRECCIÓN

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología Agrícola, en el laboratorio de Interacción Microorganismo-Planta del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN), bajo la dirección de la Dra. Melina López Meyer y el Dr. Sergio Medina Godoy. Para la realización de este proyecto se recibió financiamiento por parte de CECYT-SINALOA (proyecto de investigación 2008-2009), del Proyecto SEP-CONACYT (reg. 102237). El autor agradece al CIIDIR-IPN por su apoyo e infraestructura prestados para la realización del presente trabajo de investigación, al CONACYT y al IPN por las becas otorgadas (Beca Institucional y Beca PIFI), así como a la COFAA-IPN por los apoyos para la asistencia a congresos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	V
GLOSARIO	VI
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	3
2.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	4
2.2.1 Importancia y síntomas de la enfermedad	4
2.2.2 Ciclo de vida de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	6
2.3 Hongos micorrízicos arbusculares (HMAs)	8
2.3.1 Clasificación y ciclo de vida	8
2.3.2 Beneficios que confiere los hongos micorrízicos arbusculares a las plantas	10
2.3.2.1 Nutricionales	10
2.3.2.2 Tolerancia a estrés abiótico y biótico	10
2.4 Regulación de la expresión de genes	12
2.4.1 Regulación molecular de la simbiosis micorrízica arbuscular	12
2.4.2 Cambio en los perfiles de expresión de genes en plantas colonizadas por HMAs	13
2.4.3 Cambio en el patrón de proteínas de las plantas colonizadas con HMAs	14
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo General	20
5.2 Objetivos Específicos	20
VI. METODOLOGÍA	21
6.1 Diseño experimental	21
6.2 Establecimiento de la simbiosis	23
6.2.1 Inóculo de <i>Rhizophagus intraradices</i> ((N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler 2010)	23
6.2.2 Obtención de plantas de tomate y colonización	24
6.2.3 Determinación de porcentajes de colonización	25
6.3 Infección y determinación de la severidad del patógeno (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)	25
6.4 Análisis de fosfato inorgánico en hojas de plantas de tomate	26
6.5 Medición de eficiencia del fotosistema II en hojas de plantas de tomate	27
6.6 Identificación y selección <i>in silico</i> de secuencias candidatas de genes de las proteínas en estudio	28

6.7 Extracción de RNA total y cuantificación	28
6.8 Transcripción reversa	29
6.9 Cuantificación de cDNA	30
6.10 Cuantificación de los niveles de expresión de genes mediante PCR en tiempo real (qPCR)	30
6.10.1 Método para determinación de los niveles de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$	31
VII. RESULTADOS	32
7.1 Concentración de fosfato inorgánico en hojas de tomate de tejido criopreservado del experimento 2008	32
7.2 Experimento 2011-A	32
7.2.1 Crecimiento de la planta y colonización del HMA	32
7.2.2 Concentración de fosfato inorgánico en hojas de tomate	34
7.2.3 Eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) en hojas de plantas de tomate	35
7.3 Experimento 2011-B	36
7.3.1 Crecimiento de la planta y colonización del HMA	37
7.3.2 Concentración de fosfato inorgánico en hojas de tomate	38
7.3.3 Infección con <i>X. campestris pv. vesicatoria</i>	39
7.4 Expresión diferencial de genes de proteínas reprimidas en hojas de plantas de tomate colonizadas con <i>R. intraradices</i> por qPCR	41
7.4.1 Especificidad de los oligonucleótidos diseñados	42
7.4.2 Genes de referencias (G3PDH y UBI)	42
7.4.3 Determinación de la eficiencia ($10^{-(1/\text{pendiente})}$)	45
7.4.4 Determinación de la expresión relativa de los genes en hojas de plantas micorrizadas con respecto a hojas de plantas no micorrizadas	45
7.4.5 Determinación de la expresión relativa de los genes en hojas de plantas micorrizadas con respecto a hojas de plantas no micorrizadas e infectadas con <i>X. campestris pv vesicatoria</i>	47
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
8.1 Crecimiento de la planta de los experimentos 2011-A y 2011-B y concentración de fosfato en hoja de los experimentos 2008, 2011-A y 2011-B	50
8.2 La colonización con <i>R. intraradices</i> aumenta la eficiencia máxima del fotosistema II en hoja de plantas de tomate	52
8.3 La micorrización induce resistencia contra el patógeno foliar <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> en tomate	54
8.4 La regulación de dos genes de fotosíntesis y cinco genes de defensa y/o estrés no son regulados a nivel de transcrito en las plantas de tomate colonizadas con <i>R. intraradices</i>	55
8.5 La regulación del polipéptido Cp29 y la proteína 14-3-3 no son reguladas a nivel de transcrito en las plantas de tomate colonizadas con <i>R. intraradices</i> e infectadas con <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> y están relacionadas con la defensa inducida por micorrización	58
	60

IX. CONCLUSIONES	
X. RECOMENDACIONES	61
XII. BIBLIOGRAFÍA	62
XIII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA No.

FIGURA 1	Sintomatología de <i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i> en hojas de tomate	5
FIGURA 2	Síntomas de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i> en plantas de tomate	6
FIGURA 3	Ciclo de vida de <i>X. campestris pv vesicatoria</i>	7
FIGURA 4	Proceso de colonización de los HMAs	9
FIGURA 5	Diseño del experimento 2011-A	21
FIGURA 6	Diseño del experimento 2011-B	22
FIGURA 7	FluorPen FP 100	27
FIGURA 8	Concentración de fosfato inorgánico (fi) por peso fresco en hojas de tomate de tejido criopreservado del experimento 2008	33
FIGURA 9	Crecimiento de las plantas del experimento 2011-A	34
FIGURA 10	Concentración de fosfato inorgánico (fi) por peso fresco en hojas de tomate del experimento 2011-A	35
FIGURA 11	Eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) en hojas de plantas de tomate adaptadas a oscuridad del experimento 2011-A	36
FIGURA 12	Concentración de fosfato inorgánico (fi) por peso fresco en hojas de tomate del experimento 2011-B	39
FIGURA 13	Colonias de <i>X. campestris pv vesicatoria</i> en medio agar nutritivo	40
FIGURA 14	Infección de <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> en folíolos de tomate expresada como número de manchas por cm ² de folíolo	40
FIGURA 15	Curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados	43
FIGURA 16	Curvas de amplificación de los oligonucleótidos diseñados	44

ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA No.

CUADRO 1	Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares	8
CUADRO 2	Identificación por espectrometría de masas de proteínas diferencialmente expresadas en hojas de plantas de tomate micorrizadas versus no micorrizadas (Peinado-Guevara, 2010)	15
CUADRO 3	Proteínas reprimidas en hojas de tomate micorrizadas (Peinado-Guevara, 2010)	17
CUADRO 4	Conteo de bacterias	26
CUADRO 5	Oligonucleótidos utilizados en qPCR para el análisis de expresión diferencial	29
CUADRO 6	Porcentaje de colonización de <i>R. intraradices</i> y peso fresco de hoja (g) y peso fresco de raíz (g) en plantas del experimento 2011-A	34
CUADRO 7	Porcentaje de colonización de <i>R. intraradices</i> y peso fresco de hoja (g) y peso fresco de raíz (g) en plantas del experimento 2011-B	38
CUADRO 8	Eficiencia relativa en las reacciones de qPCR para cada uno de los genes analizados	45
CUADRO 9	Expresión diferencial de genes (+Mic (día 0) vs. – Mic (día 0)) relacionados con fotosíntesis y defensa en hojas de plantas de tomate colonizadas con <i>R. intraradices</i>	46
CUADRO 10	Expresión diferencial de genes relacionados con fotosíntesis y defensa en hojas de plantas de tomate colonizadas con <i>R. intraradices</i> e infectadas con <i>X. campestris pv. vesicatoria</i>	48

GLOSARIO

ABIÓTICO. Carente de vida, o causado por un agente no vivo.

ABSORBANCIA. Cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra.

ADN (ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO). Es una molécula de ácido nucleico que consiste de largas cadenas de desoxiribonucleótidos polimerizados. Es una doble cadena de ADN, las dos hebras se mantienen unidas mediante enlaces puente de hidrógeno entre los pares de bases de nucleótidos complementarios.

ADN COMPLEMENTARIO (ADN_c). ADN sintetizado por la transcriptasa reversa a partir de una hebra o molde de ARN.

APRESORIO. Es la punta ensanchada de una hifa o tubo germinativo que facilita la fijación y penetración del hongo en un hospedero.

ARBÚSCULO. Una ramificación de una hifa dentro de la raíz de una planta, producida por algunos hongos.

ARN (ÁCIDO RIBONUCLEICO). Ácido nucleico involucrado en la síntesis de proteínas, también el ácido nucleico más común en los virus de plantas.

ARN_m (ARN mensajero). Una cadena de ribonucleótidos que codifica para una proteína específica.

CICLO DE CALVIN. Consiste en una serie de procesos bioquímicos que se realizan en el estroma de los cloroplastos de los organismos fotosintéticos. En el ciclo de Calvin se integran y convierten moléculas inorgánicas de dióxido de carbono en moléculas orgánicas sencillas a partir de las cuales se formará el resto de los compuestos bioquímicos que constituyen los seres vivos. Este proceso también se puede, por tanto, denominar como de asimilación del carbono.

COLONIZACIÓN. Es la capacidad de llegar a la superficie del huésped por una puerta de entrada, formar o establecerse y resistir la acción de los sistemas locales de defensa.

CONCENTRACIÓN. Proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente, donde el soluto es la sustancia que se disuelve, el disolvente la sustancia que disuelve al soluto, y la disolución es el resultado de

la mezcla homogénea de las dos anteriores. A menor proporción de soluto disuelto en el disolvente, menos concentrada está la disolución, y a mayor proporción más concentrada ésta.

CLOROFILA a. Pigmento verde de las plantas y de algunos microorganismos, que se encuentran en los cloroplastos, responsables de la fotosíntesis.

CLOROPLASTO. Orgánulo celular que en los organismos eucariontes fotosintetizadores se ocupan de la fotosíntesis.

(CT). El valor de ciclo de CT o umbral es el número del ciclo en el cual la fluorescencia generada dentro de una reacción cruza el umbral de fluorescencia, una señal fluorescente significativamente por encima de la fluorescencia de fondo. En el ciclo de umbral, se ha generado una cantidad detectable de producto de amplicón durante la primera fase exponencial de la reacción.

ENFERMEDAD. Condición fisiológica anormal y perjudicial producida por agentes vivos.

EFICIENCIA. Es la proporción a la que un amplicón de PCR se genera, normalmente expresado con un valor en porcentaje. Si un amplicón dobla la cantidad durante la fase logarítmica de su amplificación por PCR, el ensayo tiene 100% eficiencia.

ESPORA. El cuerpo reproductivo de los hongos y otras plantas bajas que contiene una o más células.

ESTRÉS. Es una reacción fisiológica del organismo en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada.

EXPRESIÓN RELATIVA. Número que indica las veces de expresión de un determinado gen en una condición biológica respecto a su expresión en otra condición distinta que sirve de control.

FERTILIZACIÓN. Proceso a través del cual se preparará a la tierra añadiéndole diversas sustancias que tienen el objetivo de hacerla más fértil y útil a la hora de la siembra y la plantación de semillas.

FOLIOLO. Pieza separada en que a veces se encuentra dividido el limbo de una hoja. Cuando el limbo foliar está formado por un solo foliolo, es decir no está dividido, se dice

que la hoja es una hoja simple. Cuando el limbo foliar está dividido en foliolos se dice que la hoja es compuesta.

FOTOSÍNTESIS. Conversión de materia inorgánica en materia orgánica gracias a la energía que aporta la luz. En este proceso la energía luminosa se transforma en energía química estable, siendo la adenosina trifosfato (ATP) la primera molécula en la que queda almacenada esa energía química. Con posterioridad, el ATP se usa para sintetizar moléculas orgánicas de mayor estabilidad.

FOTOSISTEMAS. Son los centros donde se agrupan los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, entre otros.

FOSFATOS. Son las sales o los ésteres del ácido fosfórico. Tienen en común un átomo de fósforo rodeado por cuatro átomos de oxígeno en forma tetrahédrica.

FLUORESCENCIA. Propiedad que tienen algunas sustancias de absorber energía y luego emitir parte de esa energía en forma de luz.

GEN. Porción lineal del cromosoma que determina o condiciona uno o más caracteres hereditarios. La unidad funcional más pequeña del material genético.

GEN CONSTITUTIVO. Aquel gen cuya expresión ocurre todo el tiempo, sin variar por ninguna forma de estímulo, condición fisiológica o condición externa.

HIDÁTODO. Un órgano secretorio foliar, un tipo de estoma inmóvil que secreta agua líquida por el proceso de gutación (del latín gutta, que significa gota).

HIFA. Una sola rama de un micelio.

HOJA. Órgano vegetativo y generalmente aplanado de las plantas vasculares, principalmente especializado para realizar la fotosíntesis.

INFECCIÓN. La condición que existe cuando el patógeno ha logrado invadir el tejido de la planta y se ha establecido como un parásito en la planta huésped.

MICELIO. La hifa o masa de hifas que conforman el cuerpo de un hongo.

MICORRIZA. Una asociación simbiótica de un hongo con las raíces de una planta.

NECROSIS. La muerte del tejido de la planta.

OLIGONUCLEÓTIDO. Secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos.

PATÓGENO. Organismo que causa enfermedad.

PCR EN TIEMPO REAL. Una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que generalmente se utiliza para cuantificar el producto de la amplificación, de manera simultánea a la amplificación.

PREACONDICIONAMIENTO (Priming). Condición fisiológica en las plantas que les permite desarrollar una respuesta de defensa más eficiente o más rápida ante estreses bióticos o abióticos. Generalmente asociada a un organismo benéfico y desarrollada previo al ataque de un patógeno.

PROTEÍNA. Biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan: estructural, inmunológica, enzimática, homeostática, transducción de señales, protectora o defensiva.

PROTEÓMICA COMPARATIVA. Se refiere a la identificación de los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociados a cambios en las condiciones del organismo.

REGULACIÓN GÉNÉTICA. Comprende todos aquellos procesos que afectan la acción de un gen a nivel de traducción o transcripción, regulando sus productos funcionales.

RESISTENCIA. Ciertas cualidades en la planta huésped que la hacen retardar la actividad de un patógeno.

SIMBIOSIS. Una asociación benéfica mutua para dos o más diferentes tipos de organismos.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA. Copia de un ARN en su ADN complementario, llevada a cabo por la enzima transcriptasa reversa.

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) establecen simbiosis con al menos el 80% de las plantas terrestre. El hongo proporciona nutrientes minerales (fosfato, nitrógeno y azufre, entre otros) a la planta, y ésta a cambio, le otorga fotosintatos. La colonización con HMAs confiere a las plantas resistencia a estreses abióticos y bióticos (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Por otra parte, los HMAs inducen cambios en el patrón de proteínas en hojas de tomate. Algunas proteínas relacionadas con fotosíntesis, estrés y defensa son reprimidas en hojas de plantas colonizadas con respecto a las no colonizadas (Peinado-Guevara, 2010).

El objetivo fue determinar la expresión diferencial de los genes de las proteínas encontradas reprimidas en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* con respecto a las no colonizadas para tratar de elucidar los posibles papeles que estos genes juegan en la inducción de resistencia por micorrización, así como su nivel de regulación ya sea a nivel de transcrito o a nivel de proteína. Se analizó a nivel de acumulación de RNAm de genes que codifican para algunas de las proteínas encontradas reprimidas, tales como CHRC y CP29 (relacionadas con fotosíntesis), y ANN, 14-3-3, SOD, TRP y HBP (relacionadas con defensa y/o estrés) en tejido de hojas de tomate de tres experimentos independientes (2008, 2011-A, 2011-B) y se comparó con los niveles de proteína, teniendo como resultado que los genes analizados fueron regulados a nivel de post-transcripcional. Es posible que estas proteínas puedan estar relacionadas con el pre-acondicionamiento para aumentar la resistencia al patógeno. El experimento 2011-A demostró que la micorrización mejora la absorción de fosfato y aumenta la fotosíntesis. El experimento 2011-B confirmó que la micorrización confiere resistencia contra el patógeno foliar *X. campestris pv. vesicatoria* en tomate. Los genes PR1A y CP29 aumentan su expresión por estrés biótico en hojas de plantas colonizadas con *R. intraradices* y no colonizadas en el experimento 2011-B.

Palabras claves. Micorrización, fotosíntesis, defensa, proteínas, preacondicionamiento, regulación, nivel transcripcional, nivel postranscripcional, expresión diferencial de genes.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhiza (AM) fungi form endosymbiosis with plant roots, which provides several benefits to plants such as improved phosphate uptake and resistance to pathogens (Azcón-Aguilar and Barea, 1996). Some studies have proved that AM symbiosis confers resistance to leaf pathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* and *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* in common bean and tomato, respectively, and supports the idea that the mechanism involved in such resistance is systemic.

Tomato plants colonized with *Rhizophagus intraradices* showed differential regulation of several leaf proteins (Peinado-Guevara, 2010). Some down regulated proteins were similar in sequence to proteins associated to photosynthesis and defense and/or stress such as plastid lipid protein (CHRC), polypeptide CP29 (CP29), superoxide dismutase Cu-Zn (SOD), 14-3-3 protein, thioredoxin peroxidase (TRP), harpin binding protein (HBP), and annexin p34 (ANN). In this study we analyzed these proteins at the gene expression level in three independent experiments (2008, 2011-A, 2011-B) by real time-PCR and found that SOD, TRP, 14-3-3 CHRC, HBP and ANN transcripts did not changed their expression at the transcriptional level. Therefore, regulation must have occurred at the post-transcriptional level. These proteins can be related to the priming mechanism induced by arbuscular mycorrhiza to increase resistance to leaf pathogens. Arbuscular mycorrhizal symbiosis improved phosphate uptake and enhances the photosynthetic efficiency in 2011-A experiment.

Mycorrhiza colonization induced resistance in tomato plants against *X. campestris pv. vesicatoria* (Experiment 2011-B) consistent with previous experiments. Also, PR1A, CP29 gene expression were up-regulated in leaves of mycorrhiza colonized plants, as well as non colonized plants, which suggests that this change is induced by the pathogen attack.

Key words. Arbuscular mycorrhizal fungi, photosynthesis, defense, comparative proteomic, priming, regulation, transcriptional level, post-transcriptional level, gene expression.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizicos arbusculares (HMAs) manifiestan una simbiosis con al menos el 80% de las plantas terrestre (Smith y Read, 1997). Las hifas del hongo penetran las células de la raíz hasta llegar a las células del córtex donde forman arbusculos, en los cuales se realiza el intercambio de nutrientes. El hongo le proporciona nutrientes minerales (fosfato, nitrógeno y azufre, entre otros) a la planta, y ésta a cambio, le otorga fotosintatos (Paskowski, 2006). La colonización micorrízica confiere otros beneficios a las plantas como tolerancia a estreses abióticos y bióticos (Azcón-Aguilar y Barea JM, 1996).

Se ha demostrado que los HMAs ofrecen protección a la planta contra ataques de patógenos de suelo como *Rhizoctonia*, *Fusarium* o *Verticillium*, los cuales causan pudrición de raíz (revisado por Whipps, 2004); y contra patógenos de parte aérea como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* en frijol y tomate respectivamente (Mora-Romero, 2008; Galindo-Flores, 2008).

El establecimiento de la simbiosis induce cambios transcripcionales en hoja y raíz. Liu *et al.* (2007), encontraron en plantas de *Medicago truncatula* colonizadas con *Rhizophagus intraradices* (*syn. Glomus intraradices*) 468 genes sobre-expresados y 131 genes reprimidos en tejido foliar y 545 genes sobre-expresados y 102 reprimidos en tejido de raíz. Los genes estuvieron relacionados con actividad de hidrólisis, regulación transcripcional, y actividades de quinasa y transferasa. Aproximadamente el 25% de los genes sobre-expresados estuvieron relacionados con defensa a patógenos. Además, demostraron que las plantas de *M. truncatula* colonizadas con *R. intraradices* se defendían mejor que las no colonizadas al ser atacadas por el patógeno foliar *Xanthomonas campestris pv. alfalfae*.

Fiorilli *et al.* (2009), encontraron 85 genes sobre-expresados y 337 genes reprimidos en tejido foliar y 362 genes sobre-expresados y 293 genes reprimidos en tejido de raíz en plantas de tomate colonizadas con *Glomus mosseae*. Los genes encontrados diferencialmente estuvieron relacionados con organización celular y modificación de proteína, metabolismo primario, modificación de pared celular, defensa y respuesta a estímulos.

Gallou, *et al.* (2011), demostraron que la micorrización confiere resistencia contra el hongo necrótico *Phytophthora infestans* en plántulas de papa colonizadas con *Glomus sp.* y encontraron dos genes de proteínas relacionadas a patogénesis (PR1 y PR2) sobre-expresadas en tejido foliar en plántulas colonizadas y plántulas colonizadas e infectadas. Se ha encontrado que la micorrización induce cambios en el patrón de proteínas en hojas. En nuestro grupo de trabajo a través de análisis de proteómica comparativa se ha mostrado que varias proteínas relacionadas con fotosíntesis, estrés y defensa son reprimidas en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* con respecto a plantas no colonizadas. Además la micorrización induce la acumulación de dos proteínas en plantas colonizadas, una proteína tipo germina y una proteína inducida por auxina (Peinado-Guevara, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión a nivel de RNA de los genes de algunas de las proteínas encontradas diferencialmente reprimidas en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* con respecto a las no colonizadas para elucidar los posibles papeles que estos genes juegan en la fotosíntesis y en la inducción de resistencia por micorrización, así como su tipo de regulación ya sea a nivel de RNA mensajero o a nivel de proteína. Además, se analizó la expresión de estos genes en respuesta a la infección por *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* con el fin de determinar su papel en la defensa contra el patógeno.

II. ANTECEDENTES

2.1 Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate, *Solanum lycopersicum* L. es una especie dicotiledónea perteneciente a la familia de las *Solanaceae*. Es perenne, de porte arbustivo y se cultiva de manera anual. Este cultivo pertenece al reino Plantae, división Streptophyta, clase Angiosperma, subclase Dicotiledonea, orden Solanales, familia Solanaceae, el género es *Solanum*, el subgénero *Lycopersicon* y la especie *Solanum lycopersicum*, L. (NCBI, 2011) . Se conocen nueve especies del género *Solanum*, pero solamente *Solanum lycopersicum* L. es cultivada comercialmente como hortaliza. Las especies silvestres de este género tienen gran importancia en el mejoramiento del tomate (Warnock, 1988).

Actualmente se cultivan variedades con dos tipos de hábitos de crecimiento, determinados e indeterminados. El primer grupo de variedades, es utilizado principalmente para agroindustria y se cultiva al aire libre; posee un período limitado de floración, seguido por un desarrollo frutal sincrónico. El segundo grupo, es utilizado generalmente para consumo fresco, especialmente en invernaderos cuando las temperaturas son una limitante. Se caracteriza por producir inflorescencias de forma continua durante el desarrollo de la planta (Kinet y Peet, 1997).

En la alimentación humana, la importancia del tomate radica en su alto contenido de minerales y vitaminas A y C, elementos indispensables para el desarrollo y correcto funcionamiento de los diferentes órganos humanos. Tiene propiedades antioxidantes y es considerado como un activador de las secreciones gástricas y un eficaz catalizador del proceso asimilativo (Gladys, 1993).

El tomate tiene un alto valor comercial ya que cada vez cobra más importancia para la alimentación humana. En México es uno de los principales cultivos que genera divisas

al país, en el 2009 se sembraron 53,572.62 ha de tomate obteniendo 12,233,405.88 miles de pesos. En Sinaloa la producción de tomate generó 3,056,317.63 miles de pesos con una superficie sembrada de 14,907.13 ha (SIAP, 2009).

Por otra parte, el tomate contiene un amplio rango de mapas moleculares de alta densidad, librerías de DNA (EST – secuencias de expresión específicos y BAC – cromosomas artificiales bacterianos) y microarreglos para transcriptoma disponibles para análisis moleculares, es por ello que se tomó al tomate como planta modelo de estudio para el presente trabajo.

2.2 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

2.2.1 Importancia y síntomas de la enfermedad

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doige) Dye es una bacteria fitopatógena gram negativa. Es el agente causal de la enfermedad mancha bacteriana del tomate y chile, la cual se manifiesta tanto en plántulas como en plantas adultas. Su clasificación taxonómica es: Reino *Procaryotae*, División *Gracilicutes*, Clase *Proteobacteria*, Familia *Pseudomonadaceae*, Género *Xanthomonas*, Especie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doige) Dye (Goto, 1992).

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más importantes en los cultivos de tomate y chile en el Estado de Sinaloa, donde se localiza con una distribución general y en forma epidémica, ocasionando pérdidas importantes en la producción. El clima caluroso y alta humedad de esta región, combinado con lluvias en invierno y neblinas, constituyen un ambiente ideal para la infección de hojas, peciolo, tallos y frutos, manifestándose los efectos de la enfermedad en la disminución de la producción y la calidad de los frutos (Cruz *et al.*, 1998).

En tomate, los síntomas en las hojas de las plantas adultas se reflejan en forma de pequeñas manchas de casi 3 mm de diámetro, irregulares y de color gris púrpura, que presentan un halo amarillo estrecho con la parte central de color negro. Cuando son numerosas, estas manchas producen defoliación o hacen que las hojas queden rasgadas. Las manchas restringidas por nervaduras son a veces angulares, mientras que aquéllas no restringidas tienden a ser redondas; en el haz de las hojas, estas manchas con frecuencia son hundidas (Jones *et al.*, 1986) (Figura 1 y 2).



Figura 1. Sintomatología de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* en hojas de tomate

Tomado de: (http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Impt_Diseases/Tomato/Tom_Spot.htm)

Debido a que *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* carece de enzimas que rompan la barrera protectora de las plantas, ingresa al hospedero por heridas causadas por insectos, heridas en tricomas, por daño mecánico, por los estomas e hidátodos de la planta (Agris, 1997).



Figura 2. Síntomas de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* en plantas de tomate.

Tomado de: (http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Impt_Diseases/Tomato/Tom_Spot.htm).

La humedad es un factor importante en la sobrevivencia y dispersión de esta bacteria, por lo que las lluvias, rocío y exceso de agua en los hidátodos ayudan a la eficacia de la infección, ya que logra suspenderse fácilmente en agua (Agrios, 1997). Las condiciones óptimas de crecimiento son a temperaturas de 24 a 28°C con humedades relativas altas entre 54 a 84% (Carrillo-Fasio *et al.*, 2001).

2.2.2 Ciclo de vida de *X. campestris pv. vesicatoria*

El ciclo de vida de *X. campestris pv. vesicatoria* consiste en tres fases: epifítica, patogénica y saprofítica (Figura 3) . En la primera fase, la bacteria reside en la superficie de la planta, el patógeno se multiplica lo suficiente para sobrevivir hasta que las condiciones se vuelvan favorables para la infección. La expresión de la enfermedad ocurre durante la fase patogénica, la bacteria penetra, se mueve y se multiplica dentro de la planta. Las lesiones se forman durante esta fase. La fase saprofítica o fase de

sobrevivencia ocurre en ausencia del huésped. En esta fase, las poblaciones de bacterias se vuelven estáticas o declinan (Stall y Cook, 1966). Durante esta fase, la bacteria produce un exopolisacárido (EPS), que se vuelve un coloide hidrofílico. La capacidad de retención de agua y la producción de EPS puede ayudar a sobrevivir a las bacterias en condiciones desfavorables. Durante esta fase de sobrevivencia, la bacteria sufre un estado de metabolismo reducido (hipobiótico), estado donde los nutrientes no son necesarios (Swings y Civerolo, 1993).

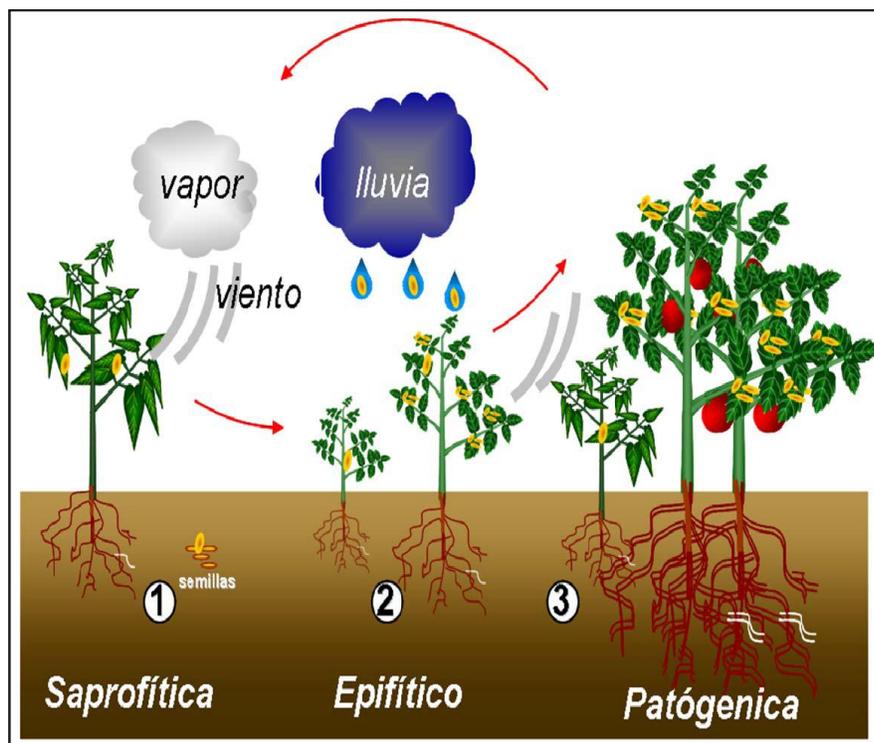


Figura 3. Ciclo de vida de *X. campestris pv vesicatoria*. (1) Fase saprofítica, la bacteria se disemina por medio de vapor, lluvia, viento, semillas contaminadas y hospederos alternos. Fase epifítica (2), la bacteria llega a la superficie de las plantas y se multiplica. Fase patogénica (3), se establece la infección, la planta muestra los síntomas característicos (Galindo-Flores, 2008).

2.3 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

2.3.1 Clasificación y ciclo de vida

La simbiosis micorrízica arbuscular ocurre entre los hongos de la división *Glomeromycota* (Schüssler *et al.*, 2001) y la mayoría de las plantas terrestres (80%) incluyendo cultivos agrícolas, hortícolas y plantas forestales. El mutualismo de los hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) se manifiesta por un intercambio bidireccional de nutrientes: el hongo se nutre de fotosintatos de la planta, y la planta de nutrientes minerales (entre ellos fosfatos) proporcionados por el hongo (revisado en Smith y Read, 1997). Los HMAs son biotrófos obligados porque necesitan proliferar dentro de su hospedero para poder sobrevivir (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares (NCBI, 2011).

Reino:	Fungi
División:	Glomeromycota
Clase:	Glomeromycetes
Orden:	Glomerales
Familia:	Glomeraceae
Género:	<i>Glomus</i>

Los HMAs se caracterizan por colonizar las células corticales de las raíces de las plantas y formar estructuras intracelulares llamadas arbusculos (Harrison, 1997). El proceso de colonización se da en cuatro etapas: (1) fase presimbiótica; (2) contacto e ingreso del hongo dentro del tejido radical; (3) proliferación del hongo dentro de la raíz; (4) invaginación celular y transferencia de nutrientes (Figura 4).

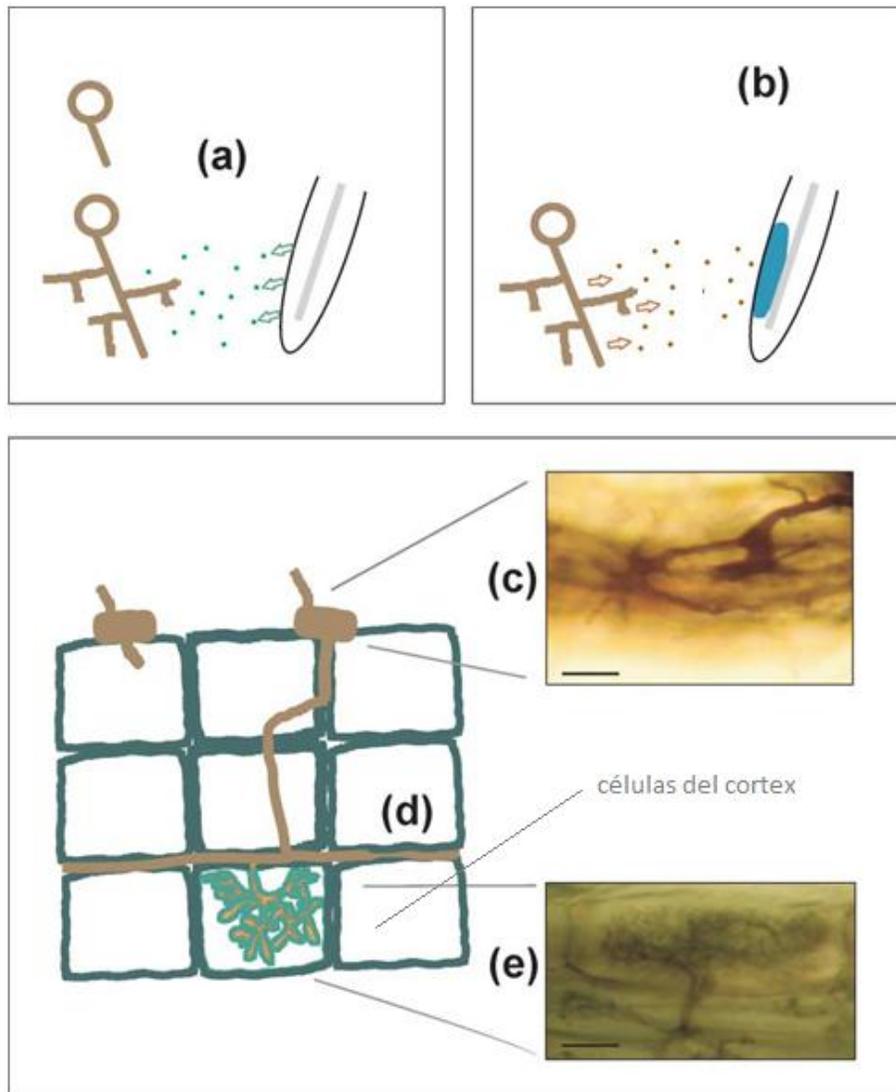


Figura 4. Proceso de colonización de los HMA. Fase presimbiótica: (a) Germinación de la espora y proliferación de la hifa. La planta exuda estrigolactona que estimula la ramificación de la hifa del hongo. (b) La planta reconoce factor(es) *myc* para prepararse a la asociación. **Contacto e ingreso del hongo dentro del tejido radical:** (c) formación del apresorio, se da el primero contacto célula-célula entre el hongo y la planta el cual constituye el sitio de ingreso del hongo a la planta hospedera. La hifa del hongo se extiende en las células de la raíz primero en forma apoplástica y después simplástica. **Proliferación del hongo dentro de la raíz:** (d) extensión apoplástica del hongo en forma adyacente a las células del córtex, para su rápida propagación a lo largo de los ejes de la raíz. **Invaginación celular y transferencia de nutrientes:** (e) formación de arbuscúlos dentro de las células del córtex. Los arbuscúlos se encuentran invaginados por la membrana de la célula vegetal y la membrana del hongo. Los arbuscúlos son el sitio de intercambio de nutrientes de la simbiosis (Paszkowski, 2006).

2.3.2 Beneficios que confiere los hongos micorrízicos arbusculares a las plantas

2.3.2.1 Nutricionales

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) obtienen carbohidratos de sus hospederos y simultáneamente le proveen a la planta nutrientes minerales como fósforo (Pi). Se ha visto que los HMAs también toman nitrógeno del medio ambiente y transfieren una porción a la planta. Esto se demostró utilizando un isótopo estable como marcador, sugiriendo que el nitrógeno es tomado por el micelio extraradical y transformado dentro de las estructuras intra-radicales del hongo como arginina y después liberado como amonio a la planta (Govindarajulu *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005).

2.3.2.2 Tolerancia a estrés abiótico y biótico

Los HMAs también confieren protección a estrés abiótico, Ruiz-Sánchez *et al.* (2010) demostraron que las plantas de arroz colonizadas con *Rhizophagus intraradices* se desarrollan mejor que las no colonizadas durante un periodo de estrés hídrico, además mejora la eficiencia fotosintética, induce la acumulación de moléculas antioxidantes como glutatión y reduce la acumulación de peróxido de hidrógeno y oxidación de lípidos en las plantas.

La colonización de *Glomus mosseae* en plantas de maíz mejoró las características de crecimiento, estatus de agua, concentración de clorofila, intercambio de gas y fluorescencia de clorofila bajo condiciones de estrés por salinidad en invernadero (Sheng *et al.*, 2008).

Con respecto a resistencia contra patógenos, se ha demostrado que los HMAs proporcionan defensa a las plantas contra patógenos de suelo como *Rhizoctonia*, *Fusarium* o *Verticillium* que causan pudrición de raíz (revisado por Whipps, 2004).

Recientemente se ha demostrado que los HMAs también protegen contra patógenos de parte aérea confiriendo una mayor resistencia a las plantas. Esto se ha visto en plantas de tomate y frijol colonizadas con *R. intraradices* e infectadas con la bacteria *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* y *Sclerotinia sclerotiorum* respectivamente (Galindo-Flores, 2008; Mora-Romero, 2008).

La micorrización reduce síntomas de la enfermedad causada por el fitoplasma del amarillamiento del tomate y da protección contra el hongo necrótico *Alternaria solani* en plantas de tomate (Lingua *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2006).

Los mecanismos de resistencia inducida por micorrización se pueden deber a un mejoramiento nutricional de la planta, competencia por sitios de colonización o fotosintatos, cambios en el sistema de raíz, cambios en la población microbiana y activación de mecanismos de defensa de las plantas. Algunos mecanismos pueden operar simultáneamente y pueden depender de las condiciones ambientales (Revisado por Whipps, 2004; Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Las investigaciones con plantas micorrizadas e infectadas con patógenos de parte aérea han demostrado que la protección es mediada de forma sistémica. Estudios que incluyeron controles con fosfatos suplementados mostraron que el efecto de la protección por micorrización no es debido al suplemento nutricional (García-Garrido, 2002; Galindo-Flores, 2008; Mora-Romero, 2008).

Es probable que el principal mecanismo de operación de la resistencia inducida por micorrización es mediante un pre-acondicionamiento o “priming”, en el cual la planta enciende algunos mecanismos que la preparan para activar los sistemas de defensa de manera más rápida y eficiente, causando con esto, una disminución de daño por el patógeno, con respecto a la respuesta de la planta no colonizada por HMAs (Pozo y Azcón- Aguilar, 2007).

Gallou *et al.* (2011) demostraron que la micorrización confiere resistencia contra el hongo necrótico *Phytophthora infestans* en plántulas de papa y sugieren que la resistencia sistémica inducida por micorrización está relacionada con el pre-acondicionamiento (priming) de dos genes que codifican para proteínas PR.

Cervantes-Gómez (2010) encontró una sobre-expresión del gen de la proteína de patogénesis (PR1) en plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* y plantas colonizadas e infectadas con *X. campestris pv. vesicatoria*, sugiriendo que la proteína PR1 juega un papel en la resistencia conferida por *R. intraradices* y es del tipo de resistencia sistémica adquirida.

2.4 Regulación de la expresión de genes

El genoma de una célula contiene en su secuencia de DNA la información para hacer miles de proteínas diferentes y moléculas de RNA. Una típica célula expresa solamente una fracción de sus genes. Las células pueden cambiar el patrón de genes expresados en respuesta a cambios en su medio ambiente. La expresión de la mayoría de los genes es regulado a nivel transcripcional mediante el control de la tasa de síntesis de RNAm controlada por proteínas de unión al DNA (Bruce *et al.*, 2002). Sin embargo, existe otro nivel de regulación (post-transcripcional) en el que los niveles de transcritos está determinado por otros factores tales como la estabilidad del RNAm. Además, la regulación postranscripcional involucra distintos procesos como cambios en la localización del RNAm, disminución del RNAm y traducción del mismo mediante la unión de proteínas al RNA formando complejos de ribonucleoproteínas y a nivel de proteína por modificación y degradación (Mata, *et al.*, 2005).

2.4.1 Regulación molecular de la simbiosis micorrízica arbuscular

La relación celular entre las raíces y los hongos micorrízicos arbusculares necesita de un continuo reconocimiento y cascada de señales de intercambio entre ambos

simbiontes, que influyen sobre la regulación de la expresión genética, cuyos productos inducen cambios morfogénicos y fisiológicos en ambos organismos, y los cuales regulan este tipo de relación mutualista (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Harrison, 1999).

2.4.2. Cambio en los perfiles de expresión de genes en plantas colonizadas por HMAs

La micorrización induce cambios en los perfiles de expresión genética tanto en raíz como en hoja. Se ha encontrado, mediante la construcción de una librería de cDNA, obtenida de raíces de tomate micorrizadas con *Glomus mosseae*, genes diferenciales que codifican para proteínas que están involucradas en varias rutas metabólicas, incluyendo la fijación de dióxido de carbono, metabolismo del azúcar, síntesis de proteínas, así como el control del ciclo celular (Tahiri y Antoniw, 1996).

Fiorilli *et al.* (2009) monitorearon perfiles de expresión global en plantas de tomate colonizadas por *Glomus mosseae* mediante microarreglos, el resultado fue de 362 genes sobre-expresados y 293 genes reprimidos en raíz; 85 sobre-expresados y 337 reprimidos en hoja. Los genes analizados en ambas partes de la planta corresponden a metabolismo primario y secundario, defensa y respuesta a estímulo, organización celular y modificación de proteína y por último regulación transcripcional.

En un estudio de *Medicago truncatula* se observó una expresión diferencial de genes en hojas de plantas colonizadas por HMAs con respecto a las no colonizadas. En este estudio se encontraron 468 genes cuya expresión aumentó y 131 genes cuya expresión disminuyó en hojas. En raíz encontraron 545 genes sobre-expresados y 102 reprimidos en raíces de plantas colonizadas con respecto a los de plantas no colonizadas. El 25% de los genes sobre-expresados se relacionaron con procesos de defensa. Posteriormente las plantas fueron infectadas con *Xanthomonas campestris pv. alfafa*. En estos experimentos las plantas colonizadas presentaron menor daño que las no

colonizadas apoyando la idea de la existencia de una inducción de respuesta sistémica (Liu *et al.*, 2007).

2.4.3 Cambio en el patrón de proteínas de las plantas colonizadas con HMA

Por otra parte, estudios de proteómica han sido utilizados de igual forma para proporcionar información sobre los mecanismos moleculares que son regulados por la colonización micorrízica en planta.

En plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intraradices* se encontraron proteínas reprimidas (Peinado-Guevara, 2010). Muchas de las proteínas encontradas reprimidas están relacionadas a fotosíntesis, estrés y/o defensa (Cuadro 2).

En el presente trabajo, se tomaron siete de las proteínas encontradas diferencialmente reprimidas en hojas de tomate (Cuadro 3) para analizar su expresión a nivel de RNA mensajero con el fin de generar información sobre el tipo de regulación de estas proteínas en plantas colonizadas y así tratar de elucidar y tener información sobre su papel dentro de la resistencia inducida por micorrización.

Cuadro 2. Identificación por espectrometría de masas de proteínas diferencialmente expresadas en hojas de plantas de tomate micorrizadas versus no micorrizadas (Peinado-Guevara, 2010)

Spot number	GenBank Accession Number	Protein	pI/M.W. (kDa)	Score/ identities	Peptide sequences matched	Density ratio: M / NM-LP
UP-REGULATED						
7402	AAC98029	Strong similarity to gb U20808 auxin-induced protein from <i>Vigna radiata</i> and a member of the zinc-binding dehydrogenase family (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	5.8/40.4	101 (14/14 100%) 64 (9/10 90%) 53 (8/8 100%)	QFGSLAEYTAVEEK VVDAFSYLETGR LVAAALNPVFDK	1.570
8102	Q9M3Y4	Germin-like protein (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	6.1/22.9	70 (10/11 90 %) 45 (8/9 88%) 31 (7/10 70%)	AVQDFCVADLK LVAATTFLEATLK APESPSPLPCK	2.043
DOWN-REGULATED						
PHOTOSYNTHESIS						
1101	P32980	ATP synthase delta chain, chloroplastic (<i>N. tabacum</i>)	4.8/23.7	94 (15/15 100%) 86 (13/14 92%)	WSAAGSYANALADVAK SNETLEQTTADLEK	0.138
2002	AAM66113	Thylakoid lumenal 16.5 kDa protein, chloroplast (<i>A. thaliana</i>)	5.0/14.9	62 (9/11 81%)	TAFVASASAFEK	0.188
3301	Q5Z5A8	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast precursor (<i>Oriza sativa</i> Japonica Group)	5.1/35.9	63 (13/13 100%) 46 (10/10 100%)	AADNIAANLYSVK GFGILDVGYR	0.065
4102	P12360	Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplast precursor (Light-harvesting complex I 26 kDa protein) (<i>S. lycopersicum</i>)	5.3/22.0	61 (9/10 90%)	YPGQFDPLGYSK	0.277
4202	P26320	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (<i>S. tuberosum</i>)	5.3/29.8	105 (17/17 100%) 73 (17/17 100%) 57 (11/11 100%)	GGSTGYDNAVALPAGGR DGIDYAAVTVQLPGGER FCLEPTSFTVK	0.441
5004	P07180	Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplast precursor (<i>S. lycopersicum</i>)	5.5/11.6	107 (13/13 100%)	GLWVPCLEFETEHEGFYVR	0.560
5103	Q00321	Type I (26 kD) CP29 polypeptide (<i>S. lycopersicum</i>)	5.4/25.4	89 (13/13 100%) 67 (10/10 100%)	TQLLLDGNTLNYFGK LFLPEGLLDR	0.214
6301	P10933	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic (<i>Pisum sativum</i> , pea)	5.5/34.5	103 (16/16 100%)	LYSIASSAIGDFGDSK	0.329
7303	P10933	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic	5.8/34.5	103 (16/16 100%) (13/14 93%)	LYSIASSAIGDFGDSK MAQYAEELWTLLQK	0.568

7901	Q43848	(<i>Pisum sativum</i> , pea) Transketolase, chloroplastic (<i>S. tuberosum</i>)	5.7/97.5	(14/15 94%) 64 (15/15 100%) 72 (13/13 100%) 81 (12/12 100%) 54 (12/12 100%)	ALGVDGFGASAPGEK ALPTYTPESPADATR SIITGELPAGWEK NLSQQNLNALAK VTTTIGFGSPNK	0.463
8101	P27522	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic (PSI type III chlorophyll a/b-binding protein) (<i>S. lycopersicum</i>)	6.1/23.8	111 (17/17 100%) 76 (11/11 100%)	FAMLGAAGALAPPELLGK WLAYGEVLDGR	0.311
8302	O04977	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic (<i>Nicotiana tabacum</i>)	6.1/35.2	77 (10/10 100%) 46 (7/7 100%) 37 (5/6 83%)	DGLVWADYKK NDTFLYMESNK QTTFLYFCLGK	0.422
OXIDO-REDUCTASE						
5101	Q7Y240	Thioredoxin peroxidase 1 (<i>S. lycopersicum</i>)	5.4/21.2	76 (11/11 100%)	YALLVDDLEVK	0.313
7002	Q43779	Superoxide dismutase (Cu-Zn) (<i>S. lycopersicum</i>)	5.8/14.8	85 (13/13 100%)	QLPLTGPQSLGR	0.411
8203	Q9LEG3	Putative alcohol dehydrogenase (<i>S. lycopersicum</i>)	6.2/27.7	105 (17/17 100%) 90 (13/13 100%)	VALLTGAASGLGEASAR VVVADLQDELGQK	0.317
8401	Q9ZUC1	Quinone oxidoreductase-like protein, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)	6.0/40.4	73 (11/14 78%)	AWSYTDYGSVNVLK	0.624
OTHER MOLECULAR FUNCTIONS						
1203	ABC42191	Plastid lipid associated protein CHRC (<i>S. lycopersicum</i>)	4.7/33.4	74 (16/16 100%) 68 (11/11 100%) (11/11 100%)	KGLITSVQDTASSVAK GDAGSVFVLIK QLADSFYGTNR	0.392
1204	P93211	14-3-3 protein (<i>S. lycopersicum</i>)	4.7/29.6	89 (16/16 100%)	VVAAADGAEELTVEER	0.280
2103	AAR26481	Harpin binding protein 1 (<i>S. lycopersicum</i>)	5.1/26.2	97 (17/17 100%) 56 (12/12 100%) 50 (11/11 100%)	ELESCAGAVDLAADLDK LLPITLGQVFQR EAEELIGSLK	0.465
6302	O81536	Annexin p34 (<i>S. lycopersicum</i>)	5.6/37.6	67 (10/10 100%)	LLVPLVSSYR	0.432
6903	P31542	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic (<i>S. lycopersicum</i>)	5.7/120.7	91 (13/13 100%) 38 (7/10 70%)	VLENLGADPSNIR NAVAVELTLMPR	0.361

Leucine=Isoleucine. M indicates colonized by AMF NM-LP indicates non-colonized by AMF fertilized with low phosphate Hoagland's solution (20 μM P)

Cuadro 3. Proteínas reprimidas en hojas de tomate micorrizadas (Peinado-Guevara, 2010).

No. de Spot	No. de acceso del GenBank	Proteína	pI/P.M. (kDa)	Porcentaje/ identidad	Secuencia de péptidos marcada	Relación de densidad: M / NM-LP
REPRIMIDAS						
FOTOSÍNTESIS						
5103	Q00321	Polipéptido CP29 Tipo I (26 kD) (<i>S. lycopersicum</i>)	5.4/25.4	89 (13/13 100%) 67 (10/10 100%)	TQLLLDGNTLNYFGK LFLPEGLLDR	0.214
1203	ABC42191	Proteína de plástidos asociada a lípidos CHRC (<i>S. lycopersicum</i>)	4.7/33.4	74 (16/16 100%) 68 (11/11 100%) (11/11 100%)	KGLITSVQDTASSVAK GDAGSVFVLIK QLADSFYGTNR	0.392
DEFENSA/ESTRÉS						
5101	Q7Y240	Tioredoxina peroxidasa 1 (<i>S. lycopersicum</i>)	5.4/21.2	76 (11/11 100%)	YALLVDDLEVK	0.313
7002	Q43779	Superóxido Dismutasa (Cu-Zn) (<i>S. lycopersicum</i>)	5.8/14.8	85 (13/13 100%)	QLPLTG PQSLLGR	0.411
1204	P93211	Proteína 14-3-3 (<i>S. lycopersicum</i>)	4.7/29.6	89 (16/16 100%)	VVAAADGAEELTVEER	0.280
2103	AAR26481	Proteína de unión a harpina 1 (<i>S. lycopersicum</i>)	5.1/26.2	97 (17/17 100%) 56 (12/12 100%) 50 (11/11 100%)	ELESCAGAVDLAADLDK LLPITLGQVFQR EAEAEIGSLK	0.465
6302	O81536	Anexina p34 (<i>S. lycopersicum</i>)	5.6/37.6	67 (10/10 100%)	LLVPLVSSYR	0.432

III. JUSTIFICACIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecen una asociación simbiótica con las raíces de la mayoría de las plantas otorgándoles beneficios nutricionales y resistencia a estrés abióticos y bióticos.

Se ha observado que el establecimiento de la micorrización reprime o induce la acumulación de algunas proteínas en hojas de tomate, lo cual podría indicar que estas moléculas juegan un papel en los procesos observados tales como la inducción de tolerancia a patógenos y en la fotosíntesis.

Sin embargo, no se conoce la regulación de estos genes a nivel transcripcional. Esta información podría ayudar a entender cuál es el papel y el nivel de regulación tanto de las proteínas reprimidas: tanto las asociadas a fotosíntesis: polipéptido Cp29 Tipo I (CP29), proteína de plástidos asociada a lípidos CHRC (CHRC); como las relacionadas con defensa: tioredoxina peroxidasa I (TRP), superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD), proteína 14-3-3 (14-3-3), proteína de unión a harpina (HBP) y anexina p34 (ANN), y su relación con la fotosíntesis y la defensa inducida por micorrización. Esta información permitirá entender en un futuro los procesos moleculares que controlan la inducción de defensa por micorrización y de esta manera diseñar estrategias biotecnológicas que mejoren la rentabilidad de los cultivos agrícolas.

IV. HIPÓTESIS

Los genes de proteínas diferencialmente acumuladas en hojas de plantas colonizadas con *Rhizophagus intraradices* mantienen el patrón de expresión mostrado por dichas proteínas, tanto en plantas colonizadas como en plantas colonizadas e infectadas con *X. campestris pv. vesicatoria*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar la expresión de genes de proteínas diferencialmente acumuladas en hojas de tomate en respuesta a la colonización de *Rhizophagus intraradices* y a la posterior infección con el patógeno *X. campestris pv. vesicatoria* para determinar su importancia en la inducción de resistencia a patógenos foliares y su nivel de regulación.

5.2 Objetivos Específicos

- Medir los niveles de expresión transcripcional de los genes CHRC, CP29, TRP, SOD, 14-3-3, HBP y ANN en hojas de plantas de tomate en respuesta a la colonización con *R. intraradices*.
- Medir los niveles de expresión transcripcional de los genes CHRC, CP29, TRP, SOD, 14-3-3, HBP y ANN en hojas de plantas de tomate en respuesta a la colonización con *R. intraradices* en respuesta a la infección con *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental

Se llevaron a cabo dos experimentos de colonización de plantas de tomate y su posterior infección con *X. campestris pv. vesicatoria*. El primer experimento (denominado 2011-A) se realizó del 16 de noviembre del 2010 al 28 de febrero del 2011. Este experimento obedeció a un diseño completamente al azar con tres tratamientos: 1) plantas colonizadas con *R. intraradices* fertilizadas con solución nutritiva Hoagland con bajo de fosfato (+Mic), 2) plantas no colonizadas con *R. intraradices* fertilizadas con bajo fosfato (-Mic) y 3) plantas no colonizadas con *R. intraradices* fertilizadas con alto fosfato (-Mic+PO₄). Cada tratamiento estuvo formado por seis réplicas biológicas (Figura 5).

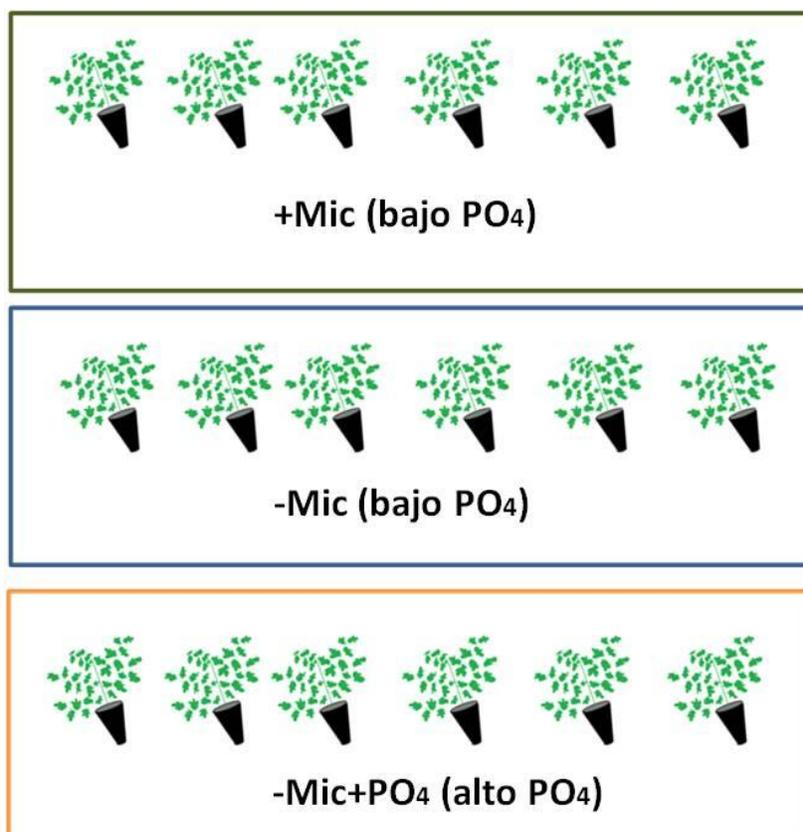


Figura 5. Diseño del experimento 2011-A.

Las variables evaluadas fueron: concentración de fósforo inorgánico en hojas, peso fresco de hoja y raíz, fotosíntesis evaluada como eficiencia máxima del fotosistema II y expresión diferencial de los genes de cada proteína diferencial.

El segundo experimento (2011-B) se llevó a cabo mediante un diseño completamente al azar. Se realizaron los tres tratamientos descritos en experimento 2011-A. Este grupo se cosechó al día 0 post-infección es decir antes de infectar con *X. campestris pv. vesicatoria*. El segundo grupo con los mismos tres tratamientos fue infectado con *X. campestris pv. vesicatoria* y un tercer grupo no fue infectado utilizado como control. Estos últimos dos grupos fueron cosechados cuando las plantas infectadas mostraron los síntomas de la enfermedad en todas las plantas el cual se mostró a los ocho días después de la infección. Cada tratamiento estuvo integrado por tres réplicas biológicas (Figura 6).

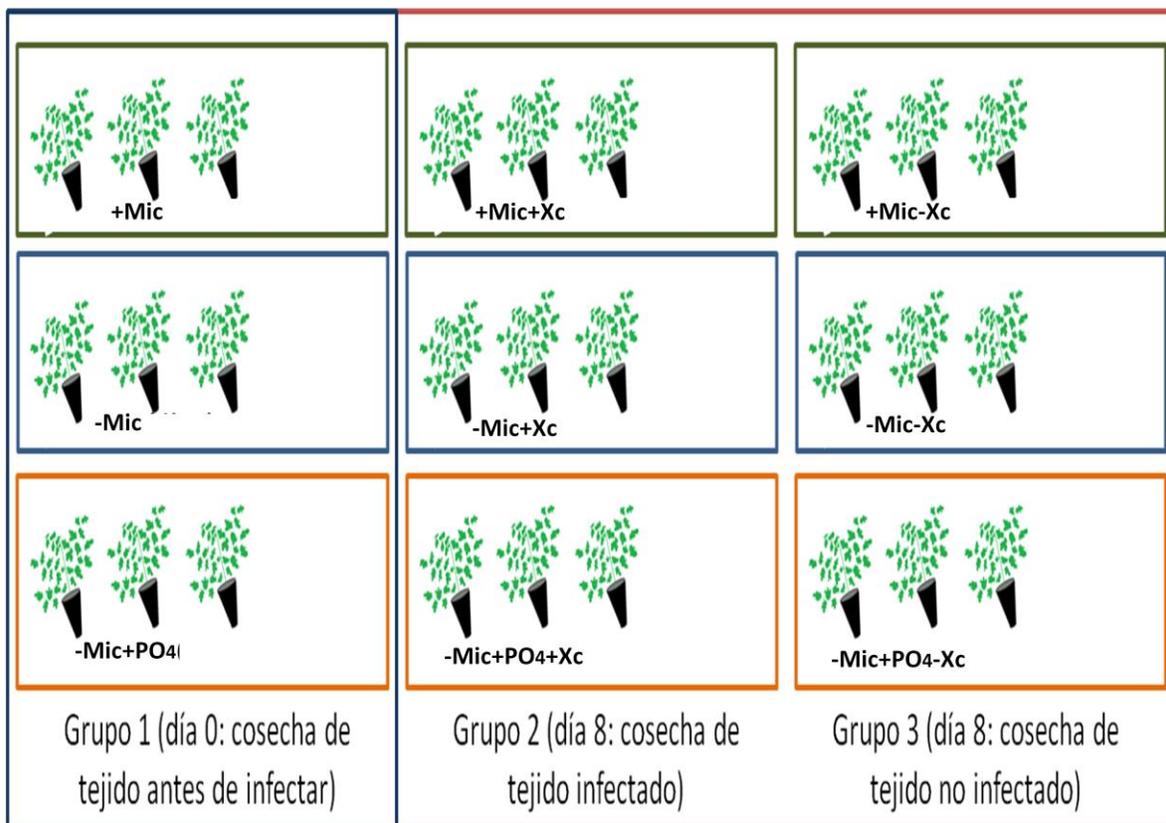


Figura 6. Diseño del experimento 2011-B.

Las variables evaluadas fueron: concentración de fosfato inorgánico en hojas, peso fresco de hoja y raíz, expresión diferencial de los genes de cada proteína y para el grupo 2: número de manchas por cm².

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una Prueba Tukey ($\alpha < 0.05$) para los dos experimentos.

6.2 Establecimiento de la simbiosis

6.2.1 Inóculo de *Rhizophagus intraradices* ((N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, 2010)

El HMA empleado para establecer la simbiosis con tomate fue *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler 2010) proporcionado por el Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza del CIIDIR-SINALOA el cual es mantenido en la línea DC2 de raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota*) crecidas en cajas de Petri con medio mínimo (MgSO₄ · 7H₂O, 731 mg; KNO₃, 80 mg; KCl, 65 mg; KH₂PO₄, 4.8 mg; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 288 mg; Na-Fe EDTA, 8 mg; KI, 0.75 mg; MnCl₂ · 4H₂O, 6 mg; ZnSO₄ · 7H₂O, 2.658 mg; H₃BO₃, 1.5 mg; CuSO₄ · 5H₂O, 0.13 mg; Na₂ MoO₄ · 4H₂O, 0.0024 mg; glicina, 3 mg; tiamina-HCl, 0.1 mg; piridoxina-HCl, 0.1 mg; ácido nicotínico, 0.5 mg; mio-inositol, 50 mg; sacarosa, 10 g en un litro a pH 5.5, según lo descrito por Chabot *et al.* (1992). Las esporas fueron extraídas disolviendo el medio con citrato de sodio (10 mM) moliendo la raíz en una licuadora comercial. La suspensión fue filtrada con mallas de 500, 100 y 50 µm. Las esporas obtenidas fueron lavadas tres veces, la suspensión del último lavado fue usado como inóculo control y las esporas se suspendieron en agua destilada. Se determinó la concentración de esporas por mililitro, se tomaron cuatro muestras de 200 µL de la suspensión de esporas y se contó el número de esporas de cada muestra, se realizó un promedio de las muestras y se calculó el aproximado a un mililitro. Finalmente se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.2.2 Obtención de plantas de tomate y colonización

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Missouri) se germinaron en sustrato estéril de arena y vermiculita en una proporción 1:3 (v/v). Las plántulas se inocularon con 300-400 esporas de *R. intraradices* por planta, a los 18 días post-germinación para el experimento 2011-A y 25 días para el experimento 2011-B. Se mantuvieron en cámaras bioclimáticas (Binder, Tuttlingen, Alemania, Art. No. 9020-0127) con fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 oscuridad y 25/20 °C (Galindo-Flores, 2008).

Las plantas fueron fertilizadas con solución Hoagland preparada en el laboratorio. Para el experimento 2011-A, las plantas se regaron dos veces por semana usando solución de Hoagland (KNO₃, 2.5 mM; Ca(NO₃)₂, 2.5 mM; MgSO₄, 1 mM; NaFe EDTA, 50 µM; H₃BO₃, 10 µM; MnCl₂ · 4H₂O, 2 µM; ZnSO₄ · 7H₂O, 1 µM ; CuSO₄ · 5H₂O, 0.5 µM; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.2 µM; MES buffer 0.5 µM, Hoagland y Arnon., 1983) y dos tratamientos de fosfato: KH₂PO₄, 20 µM y KH₂PO₄, 200 µM (fosfato mínimo y fosfato completo, respectivamente) las primeras 5 semanas después de la colonización del hongo y las últimas 5 semanas con el doble de concentración de cada nutriente de Hoagland.

Para el experimento 2011-B, las plantas se regaron dos veces por semana usando solución de Hoagland (KNO₃, 2.5 mM; Ca(NO₃)₂, 2.5 mM; MgSO₄, 1 mM; NaFe EDTA, 50 µM; H₃BO₃, 10 µM; MnCl₂ · 4H₂O, 2 µM; ZnSO₄ · 7H₂O, 1 µM ; CuSO₄ · 5H₂O, 0.5 µM; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.2 µM; MES buffer 0.5 µM, Hoagland y Arnon., 1983) y dos tratamientos de fosfato: KH₂PO₄, 20 µM y KH₂PO₄, 200 µM (fosfato mínimo y fosfato completo, respectivamente) durante todo el experimento (12 semanas).

6.2.3 Determinación de porcentajes de colonización

Para la cuantificación de las estructuras fúngicas, las raíces se fijaron con etanol (Faga-lab, Sin. Méx.) al 50% por 2 h, seguido de una incubación en KOH (Faga-lab, Sin. Méx.) al 20% por 2 d, y HCl (Faga-lab, Sin. Méx.) al 0.05% por 1 h, para posteriormente ser teñidas con azul de tripano (modificado de Phillips & Hayman, 1970) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1 g en 50 ml de agua, tomar 2.5 ml y agregar en 150 ml de lactoglicerol) por 2 d. Luego, las raíces se almacenaron en lactoglicerol 1:1:1 (agua: ácido láctico (Faga-lab, Sin. Méx.): glicerol (Faga-lab, Sin. Méx.) v:v:v). Para determinar el porcentaje de colonización se utilizó el método de intersección a la línea (Giovannetti & Mosse, 1980). Se tomaron al azar 50 raíces laterales de dos centímetros de longitud y se montaron en una caja Petri. Se fijaron puntos de referencia en la caja Petri y se realizaron conteos por transectos de todas las raíces que presentaron estructuras fúngicas como, hifas, esporas, arbusculos y vesículas dentro de la raíz. Se calculó el porcentaje del total de las raíces colonizadas entre el total de raíces.

6.3 Infección y determinación de la severidad del patógeno (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)

La infección con *X. campestris* se realizó a las 11 semanas post colonización del hongo. La concentración de bacterias utilizada fue aproximadamente de 5.1×10^6 UFC/mL. Se raspó el haz y el envés de cada foliolo y tallo de cada una de las plantas de los grupos 2 y 3. Las plantas del grupo 2 (infectadas) se sumergieron en la solución de suspensión del patógeno (4 L) y las plantas del grupo 3 (no infectadas) en agua destilada estéril (4 L).

Las plantas infectadas y no infectadas fueron cubiertas con bolsas para simular cámaras húmedas por 48 horas y se mantuvieron en cámaras bioclimáticas con un fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad) y una temperatura de 28°C. Después de las 48 h las bolsas fueron perforadas y las temperaturas se modificaron a 25 y 20°C

(luz:oscuridad). Las plantas se regaron y fertilizaron según se requerían y se monitoreó de manera constante el avance de la infección, observando la aparición y evolución de las lesiones.

Para determinar la cantidad de bacterias en las hojas de las plantas tratadas, se tomó un disco de 1 cm de tejido de cada planta. El tejido se maceró, se resuspendió en agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas. De cada dilución se pasó 100 μ L a cajas Petri y se incubaron a 28°C por 48 h, posteriormente se realizó el conteo de colonias (Cuadro 4).

Cuadro 4. Conteo de bacterias. UFC por cm^2 en hojas de plantas sumergidas en suspensión bacteriana.

Tratamiento	UFC/ cm^2
+Mic+Xc (día 8 pi)	$14.01 \times 10^{-4} \pm 4.41$
-Mic+Xc día 8 pi)	$7.22 \times 10^{-4} \pm 0.74$
-Mic+PO ₄ +Xc día 8 pi)	$0.42 \times 10^{-4} \pm 0.74$

Para determinar el número de manchas por cm^2 se tomaron 3 folíolos de cada planta, se midió el área del folíolo y se contó el total de manchas en el mismo (Gallou *et al.*, 2010).

6.4 Análisis de fósforo inorgánico en hojas de plantas de tomate

Se tomó aproximadamente 1 mL de muestra de hoja previamente molida en N₂ líquido de cada una de las tres réplicas biológicas analizadas. Se realizaron tres réplicas técnicas de cada muestra tomando la cuarta parte de la muestra biológica. Las muestras fueron pesadas en una balanza analítica para obtener su peso fresco. Se mantuvieron en un horno convencional a 50°C toda la noche para la obtención de su

peso seco. Se realizó un estándar de concentración en nM de KH_2PO_4 , los cuales consistieron en: 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 nM. Se agregó 300 μL de agua destilada, se homogenizó la muestra con un pistilo y se incubaron a 42°C por 30 min junto con los estándares. Se realizó una dilución 1:100 de las muestras y se agregó 700 μl de la mezcla reactiva (esta consistió en un volumen de 1:6 de ácido ascórbico al 10%: 0.42% de molibdato de amonio en H_2SO_4 1N) se incubaron a 42°C durante 30 min. Se tomó 900 μL de cada muestra para leer su absorbancia en un espectrofotómetro a 820 nm antes de cumplir 1 h de incubación (Ames, 1956).

6.5 Medición de eficiencia del fotosistema II en hojas de plantas de tomate

La eficiencia fotosintética fue medida en las plantas del experimento 2011-A y para ello se utilizó el aparato FluorPen FP 100 usando el parámetro QY (Quantum Yield) el cual mide la eficiencia máxima del fotosistema II cuando las plantas son adaptadas a oscuridad (F_v/F_m) (Figura 7).

Las plantas fueron adaptadas a oscuridad por 15 min entre las 12:00 pm y 12:30 pm. Se tomaron tres tipos de hoja de cada planta (hoja joven, hoja madura y hoja senescente), para la hoja joven se midió la segunda hoja más joven, una hoja tomada a la mitad de la planta como hoja madura y para hoja senescente una hoja de la parte baja de la planta. La medición fue en el primer foliolo de cada tipo de hoja.



Figura 7. FluorPen FP 100.

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA multifactorial y una prueba Tukey ($p < 0.05$) para ver la diferencia entre tratamiento y tipo de hoja.

6.6 Identificación y selección *in silico* de secuencias candidatas de genes de las proteínas en estudio

De las secuencias de péptidos obtenidas de las proteínas en estudio se realizó una búsqueda de proteínas para encontrar sus secuencias de aminoácidos completa mediante el uso de un programa BLAST en el sitio <http://www.expasy.ch/tools/blast/>. Al obtener la secuencia completa se realizó una transcripción reversa para obtener la secuencia de nucleótidos de esa proteína en los casos en los que la secuencia nucleotídica no estuviera reportada.

En base a los datos obtenidos se buscaron ortólogos de estos genes en tomate utilizando las herramientas del sitio <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>. De las secuencias ortólogas en tomate se diseñaron pares de oligonucleótidos para cada gen con el programa Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Cuadro 5).

6.7 Extracción de RNA total y cuantificación

Se tomaron 100 μg de tejido congelado y previamente molido en N_2 líquido. Se realizó la extracción de RNA total mediante el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74904) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, el RNA se cuantificó mediante espectrometría. Se utilizó un buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.0 para realizar una dilución 1:100 de la muestra y se midió su absorbancia a 260 nm. El cálculo de la concentración de RNA total se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$$

$$1 \text{ unidad de } A_{260} \text{ ssRNA} = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados en qPCR para el análisis de expresión diferencial.

Gen	No. acceso GenBank	Secuencia del oligonucleótido
Polipéptido CP29 Tipo I (26 kD)	Q0032	CP291in. 5'-GCT AAA GCT GCC GCT GTC T-3'
		CP292in. 5'-TCG GGG ATT TCT GAT CTG TC-3'
Proteína de plástido asociada a lípidos CHRC	ABC42191	CHRC1in. 5'-ATT GGA ACA CCC CAG TTG AC-3'
		CHRC2in. 5'-AAG CCT TTG AAG GGG CTT AG-3'
Tioredoxina peroxidasa 1	Q7Y240	TRP1in. 5'-CAG TGT CAA TGA CCC CTT TG-3'
		TRP2in. 5'-GGG GTG ATT TTC CAG CTC CA-3'
Superóxido dismutasa (Cu-Zn)	Q43779	SOD1in. 5'-GTC CAT GCC CTT GGT GAT AC-3'
		SOD2in. 5'-ACG CAC CTC ATC TTC AGG AG-3'
Proteína 14-3-3	P93211	14-3-31in. 5'-ATT ACC ATC GGC CTC AAC AG-3'
		14-3-32in. 5'-CAG CTG CTT CTT TCC TCT CTG-3'
Proteína de unión a harpina 1	AAR26481	HBP1in. 5'-GCT GTA GAT CTC GCA GCT GAT-3'
		HBP2in. 5'-AGG ACG ACT TCC ACC AAG AG-3'
Anexina p34	O81536	ANN1in. 5'-TCT CGA AGA GGA CGT TGC TT-3'
		ANN2in. 5'-CAC CTC ATC TCC CCC ATA TC-3'

6.8 Transcripción reversa

Las reacciones de transcripción reversa se prepararon mezclando 500 ng de RNA total, 1 µL oligo dT de anclaje, TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTVN (IDT, IA, USA, 0.5mg/mL) en donde V=G+A+C y N=A+C+G, 1 µL de una mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs) (10 mM) Bioline, London, UK), en un volumen final de 12 µL usando agua ultrapura (agua UP). La mezcla se incubó a 65°C por 5 min, se transfirió a hielo por 2 min y se agregó 0.25 µL (10 unidades) del inhibidor de RNAsa RNase out (Invitrogen, Cat. No. 10777-019), 2 µL DTT (0.1M) y 4 µL de buffer de reacción 5X, 1.5 µL de agua UP y se incubó a 42°C por 2 min. Se adicionó 0.25 µL (50 U) de enzima transcriptasa reversa Super Script II (200 U/ µL) Invitrogen, Cat. No. 1864-014). Se mezcló y

centrifugó brevemente y se incubó a 42°C por 50 min. Después, se incubó a 70°C por 10 min, se colocó en hielo por 2 min y se almacenó a -20°C.

6.9 Cuantificación de cDNA

El cDNA obtenido de la reacción de transcripción reversa se cuantificó utilizando agua UP para realizar una dilución 1:100 de la muestra y se midió su absorbancia a 260 nm. El cálculo de la concentración de cDNA se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{cDNA}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$$

$$1 \text{ unidad de } A_{260} \text{ dsDNA} = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$$

6.10 Cuantificación de los niveles de expresión de genes mediante PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis de PCR en tiempo real (qPCR) se llevó a cabo utilizando Syber Green qPCR SuperMix-UDG (Qiagen, Cat. No. 204074) en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) usando el software Rotor Gene Q – Pure detector versión 1.7 (Qiagen) para la obtención de los datos. La reacción fue llevada a cabo en un volumen total de 10 μL que contiene 5 μL de 2X Super Mix-UDG, 2 μmol de cada primer y 50 ng de cDNA. El programa de ciclos de PCR consistió en: 95°C por 5 min y 45 ciclos de 95°C por 5 s y 60°C por 10 s. Por último, se llevó a cabo una curva de disociación de 60 a 95°C con un aumento de 1°C en cada paso. Todas las reacciones se realizaron con tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para calcular los niveles de expresión relativos usando como gen normalizador G3PDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) y UBI (Ubiquitina).

Los valores de expresión relativa entre 2 y 0.5 (o de número de veces de inducción/represión de 2 a -2) fueron considerados como no diferentes a 1, es decir, no se presenta un cambio en la expresión relativa. Este criterio es aún más estricto que el

utilizado en otros trabajos en donde el umbral de expresión relativa es considerado en 1.5 del valor de expresión (Liu *et al.*, 2007). Este criterio aumenta la certeza de los resultados en expresión diferencial obtenidas.

6.10.1 Método para determinación de los niveles de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La comparación de los niveles de expresión del gen de interés normalizada con un gen de referencia endógeno en una muestra de un tratamiento comparada con otro se realiza mediante la siguiente ecuación aritmética:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-[\Delta Ct \text{ muestra experimental} - \Delta Ct \text{ muestra control}]}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

ΔCt muestra experimental = Ct gen de interés – Ct gen normalizador, obtenidos de la amplificación en la muestra experimental

ΔCt muestra control = Ct gen de interés – Ct gen normalizador, obtenidos de la amplificación en la muestra control

(PE Applied Biosystems; Perkin Elmer, Foster City, CA, 1997)

VII. RESULTADOS

7.1 Concentración de fosfato inorgánico en hojas de tomate de tejido criopreservado del experimento 2008

Se tomó tejido criopreservado del experimento de Galindo-Flores (2008) para determinar concentración fosfato inorgánico en hojas y expresión diferencial de los genes. En dicho experimento se obtuvo el peso fresco de hoja y raíz, y no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. Además, en dicho trabajo se demostró que la micorrización induce resistencia contra el patógeno foliar *X. campestris pv. vesicatoria*. La figura 8 muestra los datos de concentración de fosfato inorgánico (fi) en hoja. Se observa que las plantas colonizadas y no colonizadas fertilizadas con bajo fosfato (20 μM) no tuvieron diferencia significativa en su contenido de fi en hojas, mientras que las plantas no colonizadas con alto fosfato (200 μM) presentaron mayores nivel de fi (3424.34 ± 703.15) y fueron estadísticamente diferentes con respecto a las colonizadas (2009.05 ± 831.03) y no colonizadas (1647.9 ± 738.05) fertilizadas con bajo PO_4 .

7.2 Experimento 2011-A

En este apartado se muestran los resultados obtenidos del experimento 2011-A los cuales consistieron en peso fresco de hoja y raíz como parámetros de crecimiento de la planta, porcentaje de colonización, concentración de fosfato inorgánico y eficiencia máxima del fotosistema II.

7.2.1 Crecimientos de las plantas y colonización con HMAs

Las plantas de tomate se colonizaron con *R. intraradices* a los 18 días post-germinación. Las plantas mostraron porcentajes altos de colonización ($> 75\%$) (Cuadro 6) a las 10 semanas post-inoculación del HMA. Las plantas colonizadas con *R. intraradices* y fertilizadas con bajo PO_4 (+Mic) mostraron un mayor crecimiento que las

plantas no colonizadas fertilizadas también con bajo PO_4 (-Mic), sin embargo se observó que las plantas en estas dos condiciones presentaron un menor crecimiento comparadas con las plantas fertilizadas con alto fósforo (-Mic+ PO_4) (Figura 9). Las plantas fueron sacadas una por una de los recipientes para determinar el peso fresco de hoja y raíz tratando de realizar el peso al mismo tiempo en cada planta. Las plantas con fertilización completa presentaron mayor peso fresco de hoja y de raíz y fueron estadísticamente significativa a las plantas micorrizadas y no micorrizadas fertilizadas con bajo PO_4 . Las plantas micorrizadas tuvieron mayor peso fresco de hoja y raíz que las no micorrizadas y fertilizadas con bajo PO_4 (Cuadro 6).

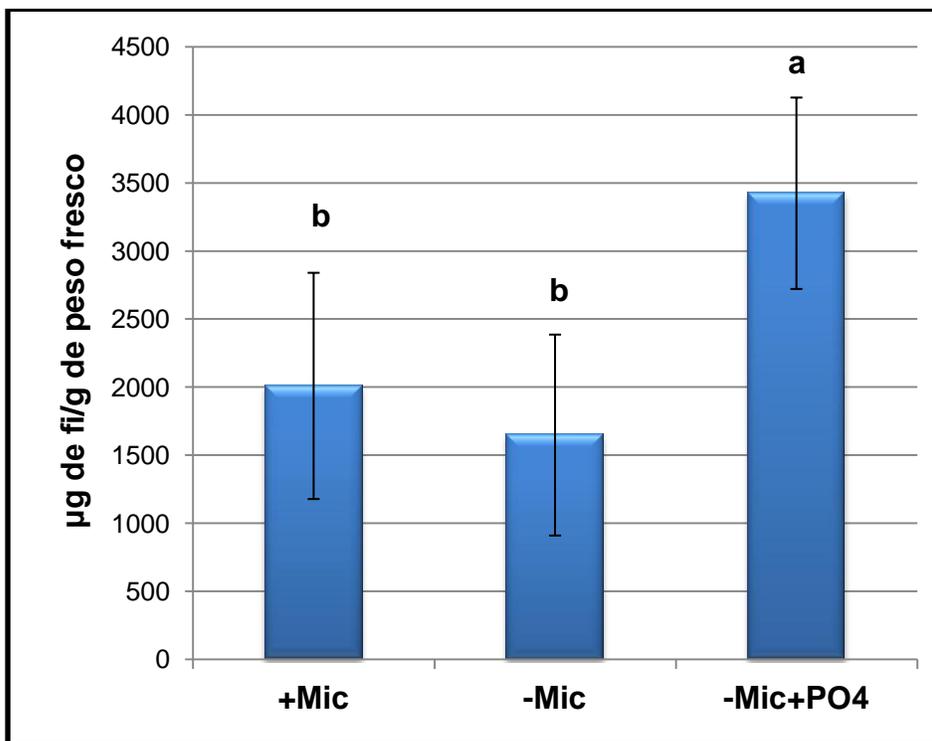


Figura 8. Concentración de fósforo inorgánico (fi) por g de peso fresco en hojas de tomate de tejido criopreservado del experimento 2008. Promedios (\pm DS) de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Fisher ($\alpha \leq 0.05$). +Mic (colonizada con *R. intraradices* fertilizadas con solución Hoagland con 20 μM de PO_4), -Mic (no colonizada fertilizadas con solución Hoagland con 20 μM de PO_4), -Mic+ PO_4 (no colonizada fertilizadas con solución Hoagland con 200 μM de PO_4) cosechadas al día 28 post inoculación con el HMA.



Figura 9. Crecimiento de las plantas del experimento 2011-A. (1) Plantas no micorrizadas con bajo PO_4 , (2) Plantas micorrizadas con bajo PO_4 , (3) Plantas no micorrizadas con alto PO_4 .

Cuadro 6. Porcentaje de colonización de *R. intraradices* y peso fresco de hoja (g) y peso fresco de raíz (g) en planta del experimento 2011-A.

Tratamiento	% Colonización <i>R. intraradices</i>	Peso fresco hoja (g)	Peso fresco raíz (g)
+Mic	75.5 ± 8.31	2.89 ± 0.91 b	1.49 ± 0.54 b
-Mic	-	1.40 ± 0.60 c	0.70 ± 0.28 c
-Mic+ PO_4	-	12.90 ± 0.82 a	4.38 ± 0.42 a

Promedios (\pm DS) de seis réplicas biológicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Tukey ($\alpha \leq 0.05$). +Mic (colonizada con *R. intraradices* con bajo fósforo), -Mic (no colonizada con *R. intraradices* con bajo fósforo), -Mic+ PO_4 (no colonizada con *R. intraradices* con alto fósforo).

7.2.2 Concentración de fósforo inorgánico en hojas de tomate

La concentración de fósforo inorgánico (fi) en hojas de plantas micorrizadas (+Mic) presentó niveles mayores (2215.73 ± 462.54) que la de las plantas no micorrizadas con bajo fósforo (-Mic) (1610.91 ± 336.86) de manera estadísticamente significativa (Figura 10); mientras que las plantas micorrizadas no fueron estadísticamente diferentes a las plantas no micorrizadas fertilizadas con solución nutritiva con alto fósforo (-Mic+ PO_4) (2531.27 ± 348.15). Los datos obtenidos muestran que en efecto, la colonización con HMA mejora la absorción de fósforo inorgánico en la planta. La concentración de fi en

las muestras fue determinada mediante una curva de calibración o curva estándar (Figura 2A, anexo).

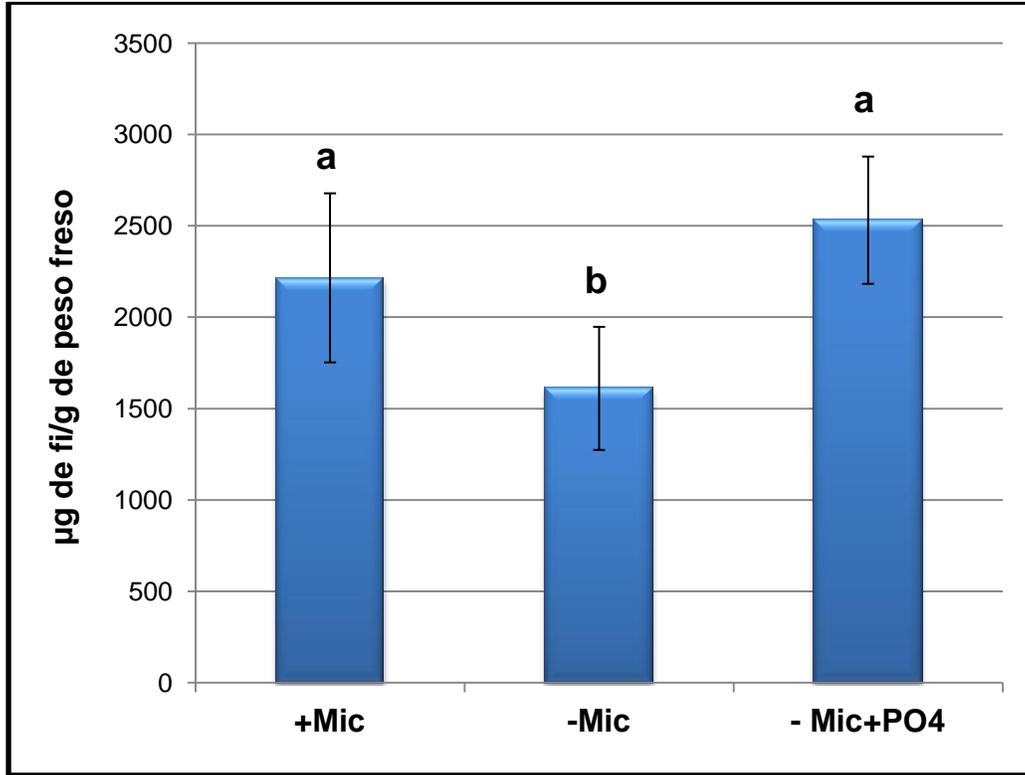


Figura10. Concentración de fosfato inorgánico (fi) por g peso fresco en hojas de tomate del experimento 2011-A. Promedios (\pm DS) de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Fisher ($\alpha \leq 0.05$). +Mic (colonizada con *R. intraradices* con bajo fosfato), -Mic (no colonizada con *R. intraradices* con bajo fosfato), -Mic+PO4 (no colonizada con *R. intraradices* con alto fosfato).

7.2.3 Eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) en hojas de plantas de tomate

La medición de la eficiencia máxima del PSII (Fv/Fm) se realizó del día 60 al 69 post inoculación con *R. intraradices*. Las mediciones se realizaron diariamente durante 10 días. Las plantas no micorrizadas con alto fosfato (-MIC+PO₄) tuvieron una mayor eficiencia máxima del PSII (0.786 ± 0.0019) que las plantas micorrizadas (+MIC) (0.770 ± 0.0019) y no micorrizadas (-MIC) (0.745 ± 0.0019) fertilizadas con bajo fosfato. Los tres tratamientos fueron estadísticamente diferentes (Figura 11). La

colonización con *R. intraradices* mejoró la eficiencia del fotosistema II con respecto a las no colonizadas, ambas fertilizadas con bajo fosfato.

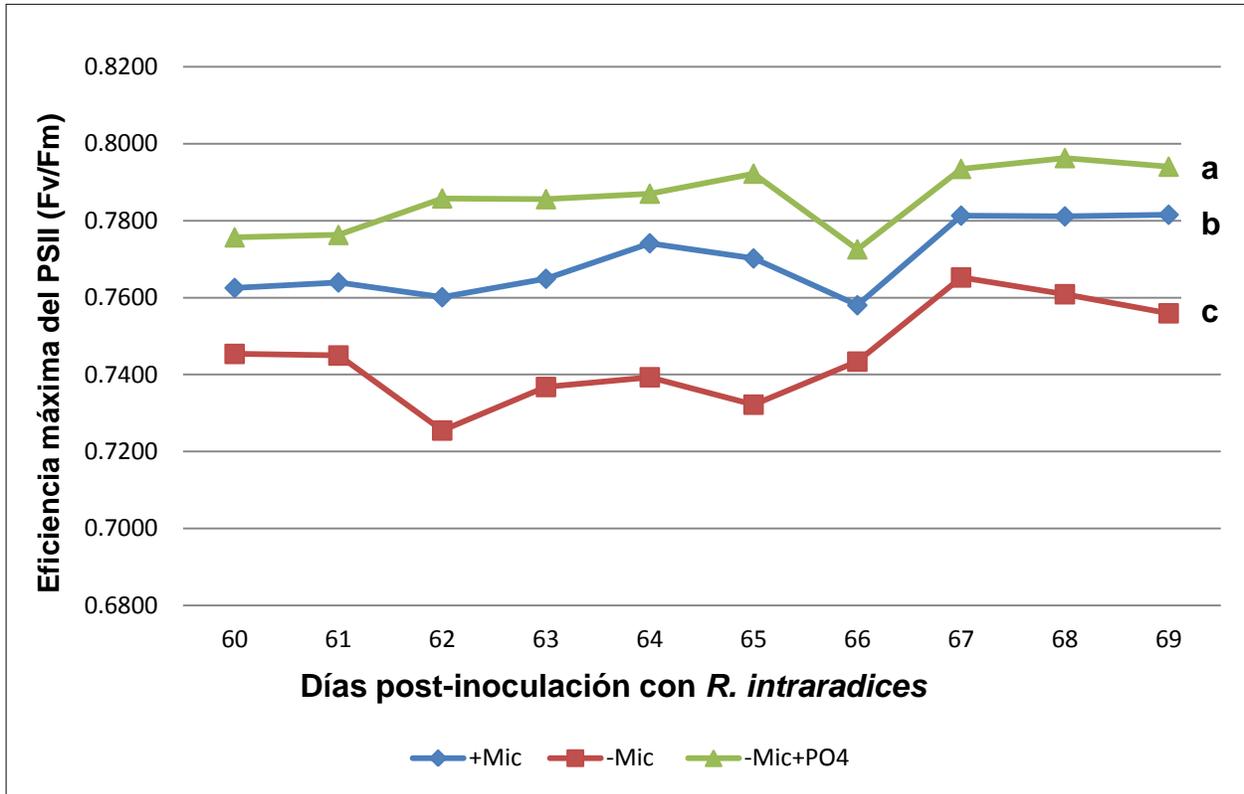


Figura 11. Eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) en hojas de plantas de tomate adaptadas a oscuridad del experimento 2011-A. Promedios de seis réplicas biológicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Tukey ($\alpha \leq 0.05$). +Mic (colonizada con *R. intraradices* con bajo fosfato), -Mic (no colonizada con *R. intraradices* con bajo fosfato), -Mic+PO4 (no colonizada con *R. intraradices* con alto fosfato).

7.3 Experimento 2011-B

A continuación se presenta los resultados del experimento 2011-B donde se obtuvo el peso fresco de hoja y raíz como parámetro de crecimiento de la planta, porcentaje de colonización, concentración de fosfato inorgánico y para la determinación de la infección con *X. campestris* pv. *vesicatoria* se determinó el número de manchas por cm².

7.3.1 Crecimiento de las plantas y colonización con HMA

En este experimento se inocularon plantas de tomate con *R. intraradices* a las cuatro semanas después de la germinación y se mantuvieron por 11 semanas. En este experimento se obtuvieron porcentajes altos de colonización (Cuadro 7).

Este experimento tuvo dos etapas. La primera etapa consistió en la colonización de plantas y su cosecha a la semana 11 post inoculación y una segunda etapa en las que plantas adicionales de las tres condiciones (+Mic, -Mic y -Mic+PO₄) fueron infectadas con el patógeno *X. campestris* pv *vesicatoria* por 8 días. Las plantas micorrizadas cosechadas al día 77 post inoculación (+Mic) y que no fueron infectadas con *X. campestris* mostraron un porcentaje de colonización de 86.78 ± 2.36 . Las plantas micorrizadas e infectadas con *X. campestris* pv. *vesicatoria* cosechadas al día 8 post-infección (+Mic+Xc) y las plantas micorrizadas no infectadas cosechadas al día 8 post-infección (+Mic-Xc) mostraron porcentajes de colonización de 82.47 ± 6.28 y 85.33 ± 4.23 respectivamente (Cuadro 7). Con respecto al peso fresco de hoja, los tratamientos fertilizados con 200 μM de PO₄ (-Mic+PO₄, -Mic+PO₄+Xc y -Mic+PO₄-Xc) presentaron mayor peso fresco y resultaron significativamente diferentes que el resto de los tratamientos. El promedio del peso fresco en hoja fue mayor en las plantas colonizadas (+Mic, +Mic+Xc, +Mic-Xc) con respecto a las no colonizadas (-Mic, -Mic+Xc, -Mic-Xc), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Cuadro 7). Con respecto a peso fresco de raíz los tratamientos -Mic+PO₄, -Mic+PO₄+Xc y -Mic+PO₄-Xc fueron estadísticamente mayores a los tratamientos con +Mic y -Mic con fertilización 20 μM de PO₄ (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de colonización de *R. intraradices* y peso fresco de hoja (g) y peso fresco de raíz (g) en planta del experimento 2011-B.

Tratamiento	% Colonización <i>R. intraradices</i>	Peso fresco hoja (g)	Peso fresco raíz (g)
+Mic	86.78 ± 2.36	1.54 ± 0.50 b	0.92 ± 0.34 d
-Mic	-	1.20 ± 0.34 b	1.12 ± 0.06 d
-Mic+PO4	-	7.78 ± 0.31 a	3.04 ± 0.24 c
+Mic+Xc	82.47 ± 6.28	1.34 ± 0.09 b	1.42 ± 0.22 d
-Mic+Xc	-	0.96 ± 0.12 b	1.25 ± 0.24 d
-Mic+PO4+Xc	-	8.29 ± 1.39 a	5.62 ± 0.87 a
+Mic-Xc	85.33 ± 4.23	1.42 ± 0.35 b	1.63 ± 0.25 d
-Mic-Xc	-	1.13 ± 0.10 b	1.54 ± 0.11 d
-Mic+PO4-Xc	-	7.57 ± 1.79 a	4.37 ± 0.51 b

Promedios (\pm DS) de tres réplicas biológicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

7.3.2 Concentración de fosfato inorgánico en hojas de tomate

Con respecto a la concentración de fosfato inorgánico en hojas de tomate en el experimento 2011-B hubo diferencia significativa entre los tratamiento +Mic y -Mic con respecto al tratamiento -Mic+PO₄ (Figura 12). Las plantas no micorrizadas con 200 μ M de fosfato (-Mic+PO₄) fueron las de mayor concentración (1779.51 \pm 322.36 μ g/g de peso fresco). Aunque las plantas micorrizadas (+Mic) tuvieron mayor concentración de fosfato (427.20 \pm 120.32 μ g/g de peso fresco) que las no micorrizadas con bajo fosfato (-Mic) (255.32 \pm 277.95 μ g/g de peso fresco), éstas no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellas (Figura 10).

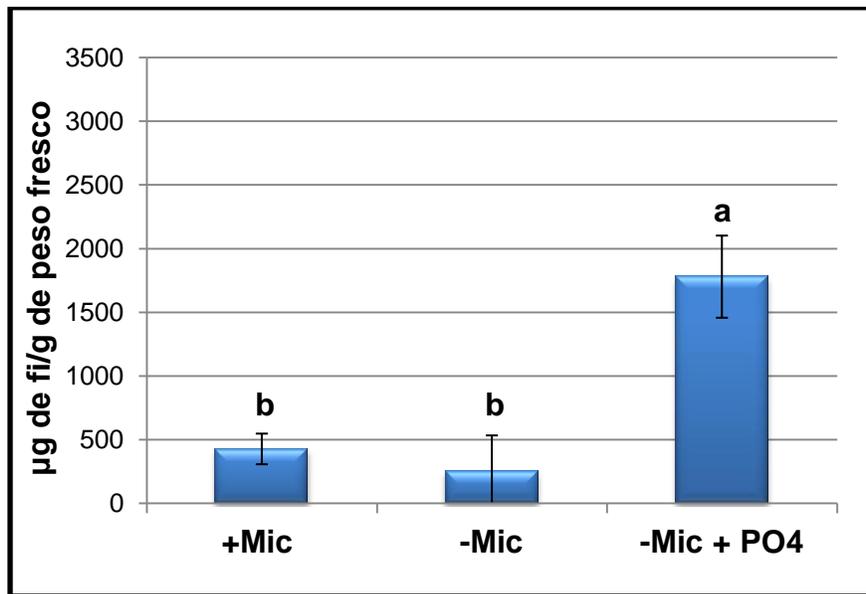


Figura 12. Concentración de fosfato inorgánico (fi) por peso fresco en hojas de tomate del experimento 2011-B. Promedios (\pm DS) de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Fisher ($\alpha \leq 0.05$). +Mic (colonizada con *R. intraradices* con 20 μmol de PO_4), -Mic (no colonizada con *R. intraradices* con 20 μmol de PO_4), -Mic+ PO_4 (no colonizada con *R. intraradices* con 200 μmol de PO_4)

7.3.3 Infección con *X. campestris pv. vesicatoria*

Para la infección con *X. campestris pv. vesicatoria* se utilizó una cepa del laboratorio de Interacción microorganismo-planta previamente caracterizado molecularmente (Figura 13). Esta cepa fue la misma que se utilizó en el experimento 2008. Los síntomas de la enfermedad (manchas necróticas) se mostraron en todas las plantas a los 8 días después de la infección. Para determinar la infección ocasionada por *X. campestris pv. vesicatoria* se tomaron tres folíolos de cada réplica biológica de los tratamientos +Mic+Xc (día 8 pi), -Mic+Xc (día 8 pi) y -Mic+ PO_4 +Xc (día 8 pi). Se midió el área de cada folíolo y se contaron las manchas que había en él para obtener el número de manchas por cm^2 . El análisis estadístico demostró que existe diferencia significativa entre los tratamientos. El tratamiento +Mic+Xc (día 8 pi) tuvo una menor infección ($4.63 \text{ manchas/cm}^2 \pm 1.66$) con respecto al tratamiento -Mic+Xc (día 8 pi) ($9.69 \text{ manchas/cm}^2$)

± 5.21) de manera significativa, sin embargo, no fue significativamente diferente al tratamiento $-\text{Mic}+\text{PO}_4+\text{Xc}$ (día 8 pi) ($6.63 \text{ manchas/cm}^2 \pm 2.86$) (Figura 14).



Figura 13. Colonias de *X. campestris pv vesicatoria* en medio agar nutritivo.

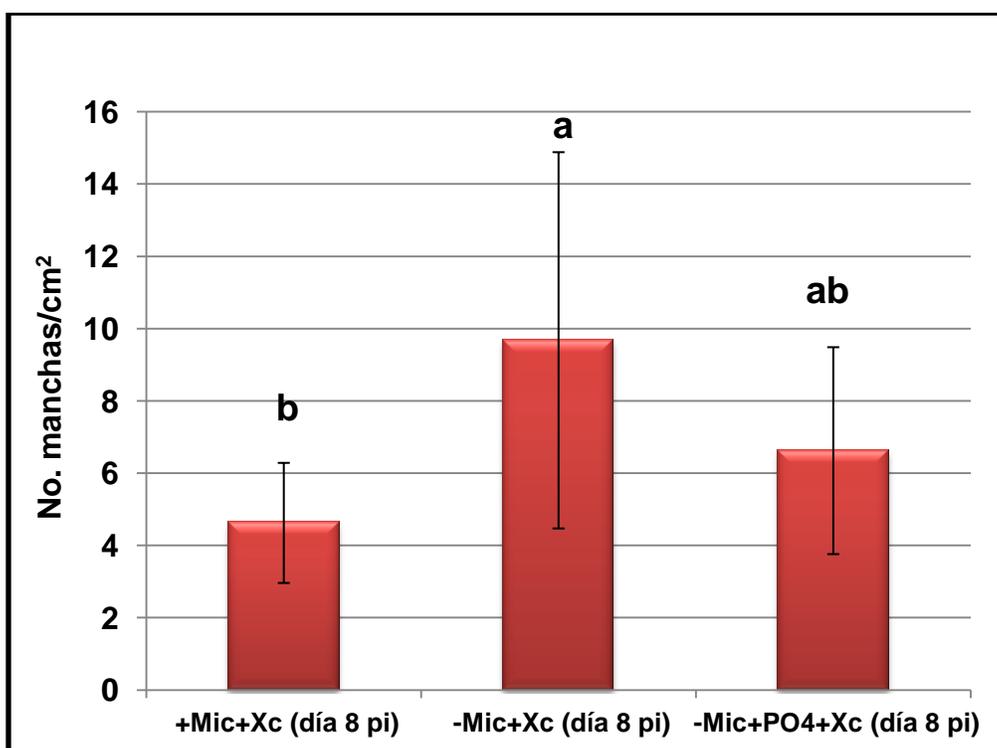


Figura 14. Infección de *X. campestris pv. vesicatoria* en foliolo de tomate expresada como número de manchas por cm^2 de foliolo. Promedios (\pm DS) de tres réplicas biológicas. Letras diferentes de cada columna son significativamente diferentes por Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Día 8 pi= día 8 post-infección con *X. campestris pv. vesicatoria*.

7.4 Expresión diferencial de genes de proteínas reprimidas en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* por qPCR

Se ha demostrado que la colonización con HMA induce una respuesta de resistencia contra el ataque de patógenos tanto en raíz como de patógenos foliares. Esta resistencia puede ser debido a un pre-acondicionamiento que la colonización del hongo proporciona a la planta para aumentar sus defensas, por ello es importante analizar lo que sucede en las plantas colonizadas con HMA antes del ataque del patógeno. Peinado-Guevara (2010), empleando proteómica comparativa en hojas de plantas de tomate colonizadas y no colonizadas con *R. intraradices* encontró proteínas diferencialmente reprimidas en hojas de plantas colonizadas relacionadas a fotosíntesis (cadena delta de la ATP sintasa, proteína del lumen del tilacoide de 16.5 kDa, factor de estabilidad y ensamblaje del fotosistema II (HCF136), proteína de 26 KDa del complejo I de captación de luz, proteína 1 aumentadora de evolución de oxígeno, cadena pequeña de la Rubisco, polipéptido CP29, isoenzima de hoja de la ferredoxina NADP reductasa, transcetolasa cloroplástica, proteína 8 de unión a clorofila a-b y proteína de plástido asociada a lípidos CHRC, y proteínas relacionadas a defensa y/o estrés (tioredoxina peroxidasa 1, superóxido dismutasa (Cu-Zn), alcohol deshidrogenasa, proteína tipo quinona oxido-reductasa, proteína tipo 14-3-3, proteína de unión a harpina, annexina p34).

Este trabajo consistió en analizar los genes de algunas de estas proteínas a nivel de RNA mensajero para determinar si la disminución observada en la acumulación de proteínas por la micorrización obedecía a una regulación transcripcional o postranscripcional.

Para esto, se determinó la expresión diferencial de los genes CP29 y CHRC (polipéptido CP29 y proteína de plástidos asociada a lípidos, respectivamente, ambos genes relacionados a fotosíntesis) y SOD, ANN, 14-3-3, TRP y HBP (superóxido dismutasa, annexina p34, proteína tipo 14-3-3, tioredoxina peroxidasa, proteína de unión a harpina, respectivamente, y relacionados con estrés), mediante qPCR (PCR

cuantitativo) en tejido criopreservado del experimento de Hugo-Galindo (2008) (Experimento 2008, mismo tejido empleado por Peinado-Guevara (2010)), y de los dos experimentos fisiológicos realizados en este trabajo (2011-A y 2011-B). Para normalizar los datos de expresión se utilizaron dos genes de referencia (constitutivos) reportados en trabajos con solanáceas: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y ubiquitina (UBI).

7.4.1 Especificidad de los oligonucleótidos diseñados

Para asegurar que los oligonucleótidos utilizados amplificaban un solo amplicón, se llevaron a cabo curvas de disociación para cada uno de ellos (Figura 15). En todos los casos se observó una sola curva de disociación por amplicón, lo que indica que sólo se amplificó un producto de PCR. En la figura 16 se muestran las curvas de amplificación para cada par de oligonucleótido utilizado.

7.4.2 Genes de referencias (G3PDH y UBI)

Inicialmente, se utilizó como gen normalizador a G3PDH, sin embargo, se observó poca homogeneidad de los valores de CT con este gen. Alternativamente, se diseñaron oligonucleótidos para la utilización del gen ubiquitina (UBI) como gen de referencia. A diferencia de G3DPH, el gen UBI presentó resultados de CTs más homogéneas. Además, el gen UBI cumplió con el criterio de no presentar diferencia significativa en expresión entre la condición micorrizada y no micorrizada, por lo que puede ser utilizado como gen normalizador en este sistema.

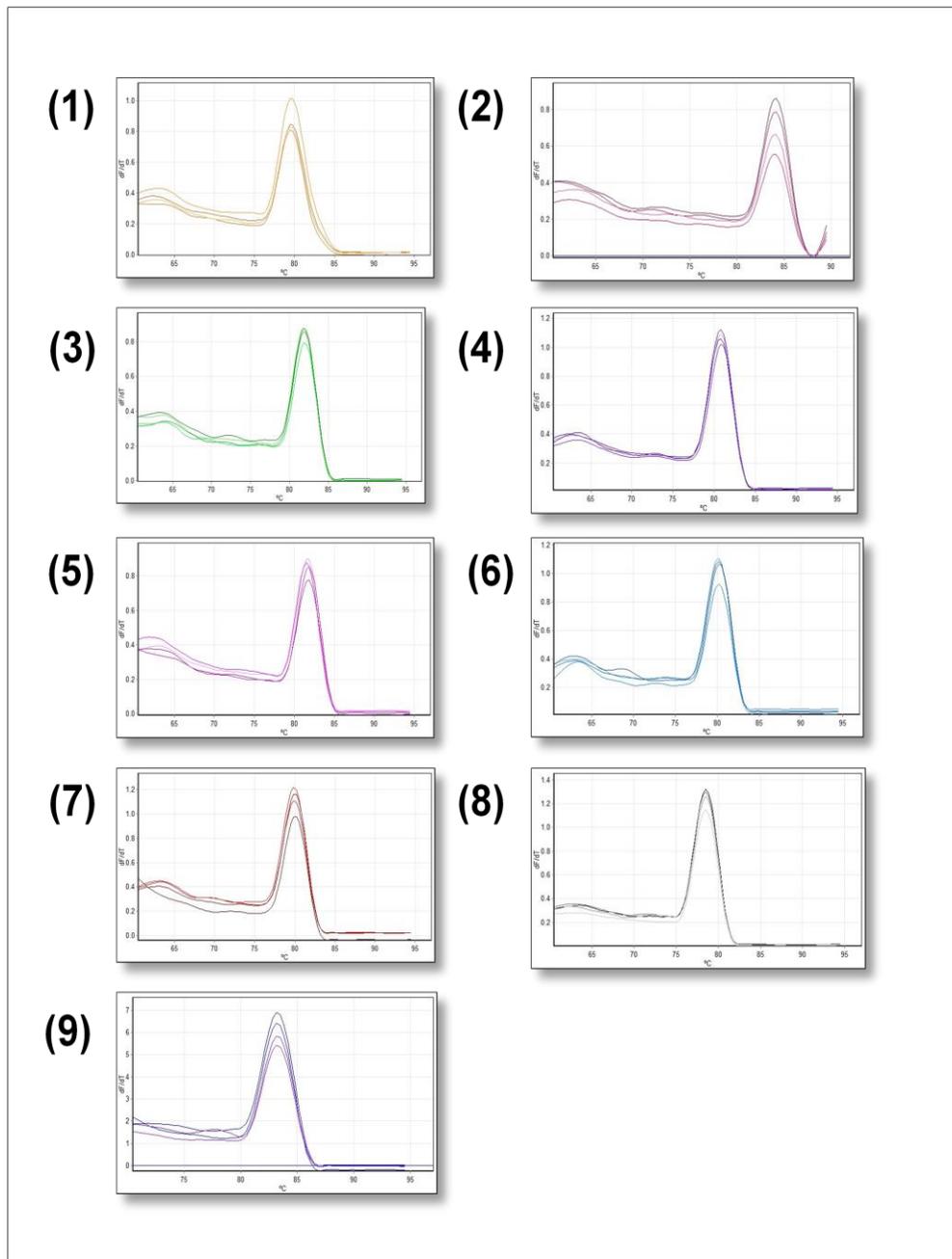


Figura 15. Curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados. (1) CHRC (proteína de plástidos asociada a lípidos), (2) CP29 (polipéptido CP29), (3) ANN (anexina p34), (4) 14-3-3 (proteína 14-3-3), (5) SOD (superóxido dismutasa (Cu-Zn)), (6) TRP (tioredoxina peroxidasa I), (7) HBP (proteína de unión a harpina), (8) G3PDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), (9) UBI (ubiquitina).

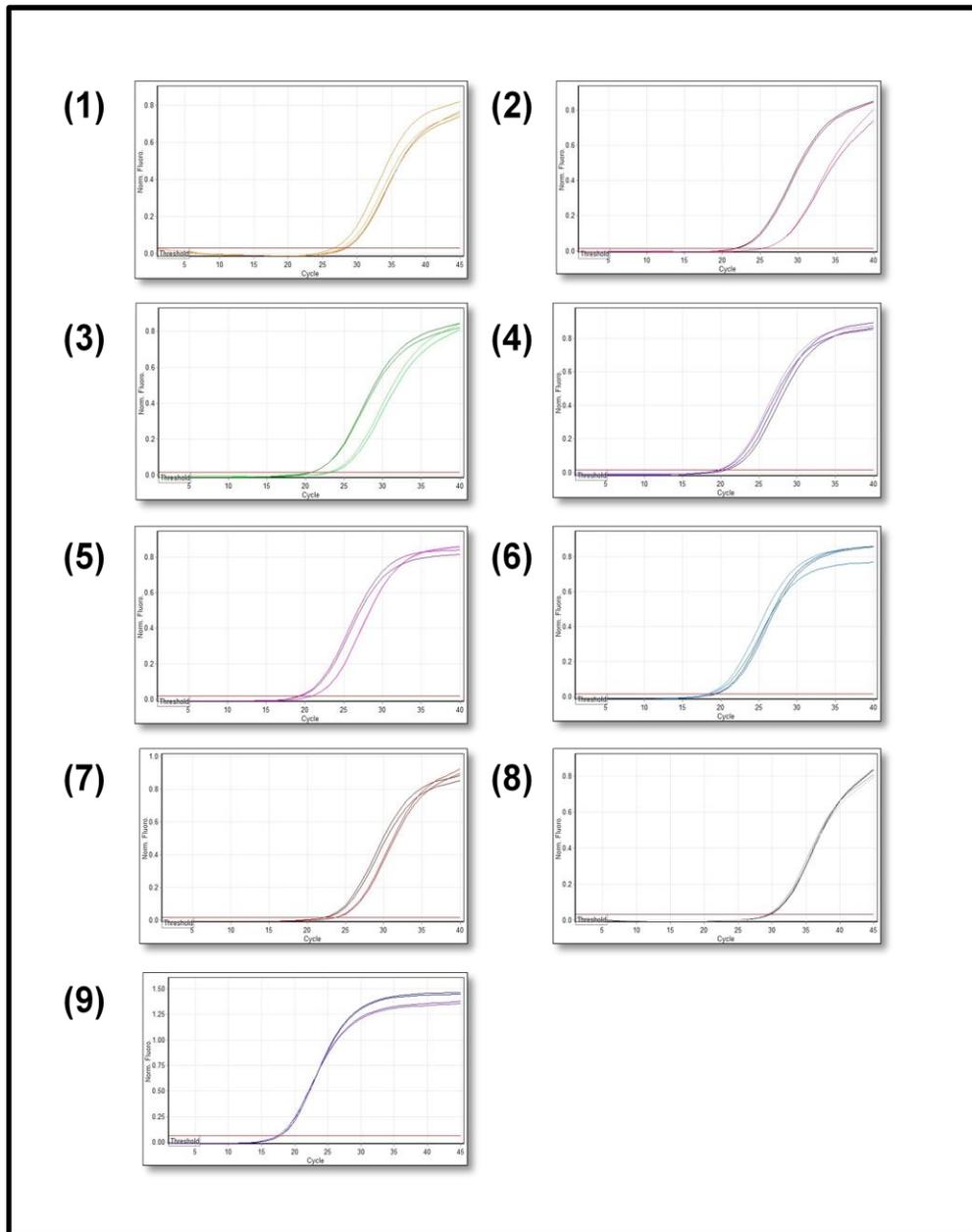


Figura 16. Curvas de amplificación de los oligonucleótidos diseñados. (1) CHRC (proteína de plástidos asociada a lípidos), (2) CP29 (polipéptido CP29), (3) ANN (anexina p34), (4) 14-3-3 (proteína 14-3-3), (5) SOD (superóxido dismutasa (Cu-Zn)), (6) TRP (tioredoxina peroxidasa I), (7) HBP (proteína de unión a harpina), (8) G3PDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), (9) UBI (ubiquitina).

7.4.3 Determinación de la eficiencia ($10^{-(1/\text{pendiente})}$)

La determinación de la eficiencia de las reacciones fue obtenida mediante la fórmula ($10^{-(1/\text{pendiente})}$), refiriéndose a la pendiente calculada a partir de los valores de Ct obtenidos a diferentes concentraciones de cDNA. El cuadro 8 muestra los valores de las pendientes de las curvas obtenidas para cada uno de los genes medidos a concentraciones crecientes de 10, 25, 50 y 100 ng de cDNA.

Cuadro 8. Eficiencia relativa en las reacciones de qPCR para cada uno de los genes analizados.

Gen	Pendiente	$10^{-(1/\text{pendiente})}$
CHRC (proteína de plástidos asociada a lípidos)	-3.68	1.87
CP29 (polipéptido Cp29)	-3.39	1.97
ANN (anexina p34)	-3.51	1.93
14-3-3 (proteína 14-3-3)	-3.42	1.96
SOD (superóxido dismutasa (Cu-Zn))	-3.39	1.97
TRP (tioredoxina peroxidasa I)	-3.26	2.03
HBP (proteína de unión a harpina)	-3.76	1.84
GPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)	-3.48	1.94
UBI (ubiquitina)	-3.64	1.88

La eficiencia ($10^{-(1/\text{pendiente})}$) óptima es 2.

7.4.4 Determinación de la expresión relativa de los genes en hojas de plantas micorrizadas con respecto a hojas de plantas no micorrizadas

La expresión relativa de los genes fue analizada mediante la ecuación $E^{-\Delta\Delta Ct}$, donde E equivale a la eficiencia de cada gen (valores de eficiencia obtenidos en el cuadro 8). Los valores de expresión relativa están mostrados en el cuadro 9. Los genes analizados en los experimentos del 2008, 2011-A y 2011-B muestran expresiones diferenciales menores a 2 y mayores a 0.5, los cuales han sido considerados en este trabajo como los límites del rango fuera del cual se considerará una expresión relativa significativa.

Por lo tanto, ya que la expresión diferencial de los genes analizados no sobrepasan el rango, esto significa que estos genes no son inducidos ni reprimidos en las condiciones estudiadas. La excepción fue el gen del polipéptido Cp29, cuya expresión, en el experimento 2008, resultó reprimida (expresión relativa 0.16).

Cuadro 9. Expresión diferencial de genes (+Mic vs –Mic) relacionados con fotosíntesis y defensa y/o estrés en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices*

	Experimento 2008	Experimento 2008	Experimento 2011-A	Experimento 2011-B
Gen	Proteína	Expresión diferencial del gen (condición +MIC vs condición -MIC)		
Superóxido dismutasa (Cu-Zn) (SOD)	0.411*	1.38	1.03	0.82
Proteína 14-3-3 (14-3-3)	0.280*	1.02	1.24	0.92
Proteína de unión a harpina (HBP)	0.465*	0.81	1.29	1.15
Tioredoxina peroxidasa I (TRP)	0.313*	0.90	1.26	0.62
Proteína asociada a lípidos de plástido (CHRC)	0.392*	1.26	1.25	1.05
Anexina p34 (ANN)	0.432*	1.98	0.99	0.69
Polipéptido Cp29 (CP29)	0.214*	0.16	1.39	1.69

*Relación de densidad de proteínas encontradas reprimidas en hoja (Peinado-Guevara, 2010). Niveles de expresión menores a 0.5 se consideran como represión del gen y mayores a 2 se considera inducción del gen.

7.4.5 Determinación de la expresión relativa de los genes en hojas de plantas micorrizadas con respecto a hojas de plantas no micorrizadas ambas infectadas con *X. campestris pv vesicatoria*

Se determinó la expresión diferencial de los mismos genes analizados anteriormente en tejido de hojas de tomate micorrizadas y no micorrizadas ambas infectadas con *X. campestris pv. vesicatoria* del experimento 2011-B. El cuadro 10 muestra los niveles de expresión diferencial de los genes en donde no se encontró diferencia entre las dos condiciones. En el mismo cuadro se muestra los niveles de proteína encontrados en tejido foliar del experimento 2008 en donde la proteína 14-3-3 y el polipéptido Cp29 resultaron diferenciales. Las dos proteínas se encontraron aumentadas en la condición micorrizada e infectada con respecto a la no micorrizada e infectada (Peinado-Guevara, 2010). Sin embargo, al analizar los niveles de transcrito de estos genes, no se observó una expresión diferencial entre su expresión en la condición micorrizadas e infectadas contra la condición no micorrizada e infectada. A manera de control se midió también la expresión diferencial del gen PR1, mismo que ha sido descrito en múltiples sistemas como inducido por la infección por patógenos (Brederode *et al.*, 1991; Bonasera *et al.*, 2006; Gallou *et al.*, 2011). Aunque la expresión de PR1 no fue diferencial en las plantas micorrizadas e infectadas contra las no micorrizadas e infectadas, sí se observó una expresión diferencial entre las plantas infectadas contra las no infectadas, independientemente si estaban micorrizadas o no. El análisis de PR1 indica que la planta respondió de manera efectiva a la infección por *X. campestris*, lo cual da certeza a las estimaciones de expresión relativa de los otros genes. Además se calcularon las expresiones relativas de las condiciones micorrizada infectada contra micorrizada no infectada y no micorrizada infectada contra no micorrizada no infectada. El polipéptido Cp29 fue el único caso en el que se observó una disminución en su expresión relativa en ambas comparaciones (Cuadro 10).

Cuadro 10. Expresión diferencial de genes relacionados con fotosíntesis y defensa en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* e infectadas con *X. campestris pv. vesicatoria*.

Nombre	Experimento 2008		Experimento 2011-B	
	MIC+INF Vs. NO MIC+INF	MIC+INF Vs. NO MIC+INF	MIC+INF Vs. MIC-INF	NO MIC+INF Vs. NO MIC-INF
Superóxido dismutasa (Cu-Zn) (SOD)		0.90	1.04	0.95
Proteína 14-3-3 (14-3-3)	5.68 *	1.02	1.69	1.53
Proteína de unión a harpina (HBP)		1.06	0.71	0.77
Tioredoxina peroxidasa I (TRP)		1.24	1.15	1.48
Proteína de plástido asociada a lípidos (CHRC)		1.33	1.26	0.99
Anexina p34 (ANN)		1.08	1.28	0.81
Polipéptido Cp29 (CP29)	1.94*	0.83	0.26	0.53

*Relación de densidad de proteínas encontradas reprimidas en hoja (Peinado-Guevara, 2010). Niveles de expresión menores a 0.5 se considera como represión del gen, y mayores a 2 se considera inducción del gen.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de esta tesis fue analizar la expresión a nivel de transcripción de genes de algunas de las proteínas encontradas reprimidas en hojas de plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* con el fin de generar conocimiento que nos permita entender el papel de dichos genes y proteínas en la inducción de defensa en hojas por la micorrización. El análisis de proteómica comparativa se realizó con tejido foliar del experimento 2008 (Galindo-Flores, 2008; Peinado-Guevara, 2010). Varias de las proteínas encontradas reprimidas en la condición micorrizada con respecto a la no micorrizada tienen relación con el proceso de la fotosíntesis o con el cloroplasto, entre ellas la proteína de plástidos asociada a lípidos (CHRC) y el polipéptido Cp29 (CP29). Estos resultados de proteómica podrían indicar que la micorrización está afectando negativamente el proceso fotosintético. Sin embargo, y contrario a esta idea, la literatura señala que la micorrización aumenta la eficiencia de la fotosíntesis (Sheng *et al.*, 2008; Kaschuk *et al.*, 2009; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010). Ya que fue imposible determinar la fotosíntesis en el experimento 2008, se optó por realizar un segundo experimento fisiológico (experimento 2011-A) para medir eficiencia de la fotosíntesis en las plantas micorrizadas y al mismo tiempo corroborar la expresión de los genes de las proteínas de fotosíntesis encontradas reprimidas (CHRC y CP29) en el experimento 2008 y de otros genes cuyas proteínas resultaron diferenciales (ANN, 14-3-3, SOD, TRP, HBP).

En el experimento 2008, además de probar las condiciones micorrizadas y no micorrizadas, se continuó el experimento mediante la infección por *X. campestris* de plantas micorrizadas y no micorrizadas, con el objeto de analizar la expresión relativa de los genes estudiados y compararlos con los resultados de proteómica en estas condiciones. En este experimento (2011-A), sin embargo, no se pudo realizar la infección con *X. campestris pv. vesicatoria*, por lo que no pudieron corroborarse los resultados de expresión de los genes analizados bajo la condición de infección con el patógeno. Por lo tanto se realizó un tercer experimento (2011-B) de micorrización e

infección a manera de repetición del experimento de infección del experimento 2008. A continuación se presenta la discusión de los resultados de los tres experimentos independientes:

8.1 Crecimiento de la planta de los experimentos 2011-A y 2011-B y concentración de fosfato en hoja de los experimentos 2008, 2011-A y 2011-B

En este trabajo, plantas de tomate fueron colonizadas con *R. intraradices* y no colonizadas. Ya que concentraciones altas de fosfatos son inhibitorias para el establecimiento de la asociación micorrízica arbuscular (García-Garrido, 2002; Fritz *et al.*, 2006; Branscheid *et al.*, 2010), la fertilización utilizada para las plantas micorrizadas en el experimento consistió en un décimo (20 μM) de la concentración regular fosfatada (200 μM) de la solución nutritiva utilizada (solución Hoagland). El objetivo es proveer de una concentración mínima de fosfatos para que se pueda establecer la colonización, pero permitiendo el desarrollo de las plantas. Las plantas no micorrizadas también fueron fertilizadas con solución Hoagland con bajo fosfato. Sin embargo, ya que las plantas micorrizadas son más eficientes para adquirir fosfatos, se decidió incluir un control más que consistió en plantas no micorrizadas fertilizadas con fosfato completo con la idea de descartar posibles respuestas debidas a una mejora en la nutrición fosfatada y no necesariamente al proceso de micorrización.

En el experimento 2011-B no hubo diferencia significativa entre las plantas de tomate micorrizadas y no micorrizadas en cuanto a la producción de biomasa, ni en el contenido de fosfato inorgánico determinado en hojas. Fritz *et al.*, (2006) tampoco encontraron diferencias en fi y biomasa entre las plantas de tomate colonizadas y no colonizadas con *R. intraradices*. A pesar de que en el presente trabajo las diferencias no siempre fueron significativas, el contenido de fi y de peso fresco fue siempre mayor en las plantas micorrizadas con bajo fosfato con respecto a las no micorrizadas también fertilizadas con bajo fosfato. Las plantas no micorrizadas crecidas con alto fosfato en

todos los casos presentaron mayores niveles de fi y peso fresco, tal como pudiera esperarse

En los dos experimentos (2011-A y 2011-B) se obtuvieron porcentajes altos de colonización (Cuadro 6 y 7), sin embargo, esto no se vio reflejado en el crecimiento de las plantas del experimento 2011-B. Los efectos positivos en el crecimiento de la planta dependen tanto de la planta como del hongo. En experimentos con soya (Ross, 1971; Kuo y Huang, 1982) algunas especies de HMAs estimularon el crecimiento de las plantas, en cambio en experimentos con lenteja y chícharo (Xavier y Germida, 2002; 2003) los efectos positivos de la colonización con HMA no fueron muy evidentes. Fritz *et al.* (2006) en plantas de tomate encontraron que la colonización con *R. intraradices* no mostró efectos positivos en el crecimiento de la planta y se observó una leve disminución en cuanto a peso fresco de la planta colonizada con respecto a la no colonizada.

Una posible explicación a la poca o nula diferencia en concentración de fi en hojas de plantas micorrizadas puede ser que los HMAs usan la mayor parte de la energía proveniente del carbono que le provee la planta para su propio crecimiento. De tal manera que pudieran estar utilizando más carbono para mantener su propio proceso de respiración que para la toma de nutrientes, entre ellos fósforo. En este caso, la energía proveniente del carbono transferido al hongo durante la simbiosis no trae como consecuencia el aumento de biomasa de la planta ni el aumento en la concentración de fósforo en hoja (Mortimer *et al.*, 2008).

En el experimento 2011-A sí hubo diferencia significativa entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas en cuanto a peso fresco de hoja y raíz. En este experimento las primeras cinco semanas post-inoculación del hongo fue la misma del experimento y 2011-B y del experimento de Galindo-Flores (2008) y las cinco semanas posteriores se fertilizó con el doble de la concentración de cada nutriente de la solución Hoagland. También hubo diferencia significativa en cuanto a concentración de fósforo entre las plantas colonizadas y no colonizadas de este experimento. Por lo tanto, el aumento en

el crecimiento de la planta colonizada pudiera ser atribuido a una mayor disponibilidad de fosfato, mismo que pudo ser tomado de manera más eficiente por las plantas micorrizadas que las no micorrizadas.

8.1 La colonización con *R. intraradices* aumenta la eficiencia máxima del fotosistema II en hoja de plantas de tomate

El método que se utilizó para medir fotosíntesis en el presente trabajo fue mediante la fluorescencia de la clorofila a (Chl a), a través del análisis del funcionamiento del fotosistema II (PSII). Esto se logra midiendo las señales de fluorescencia a partir de tejido adaptado a oscuridad cuando la irradiación de fotones es muy baja y prácticamente todos los centros de captación de luz del PSII están abiertos (F_o) y durante un pulso de una sobre-saturación de irradiación de fotones, cuando prácticamente todos los centros de captación de luz del PSII están cerrados (F_m). De esta manera es posible estimar la eficiencia fotoquímica del fotosistema II cuando las plantas son adaptadas a oscuridad (eficiencia máxima del PSII) como:

F_v/F_m .

Donde:

$F_v = F_m - F_o$

F_m = fluorescencia de Chl a cuando los centros de captación del PSII se encuentran cerrados en plantas adaptadas a oscuridad.

F_o = fluorescencia de Chl a cuando los centros de captación del PSII se encuentran abiertos en plantas adaptadas a oscuridad.

En el experimento 2011-A, las plantas colonizadas con *R. intraradices* mostraron una mayor eficiencia fotoquímica del PSII que las no colonizadas. Estos datos concuerdan con otros autores. Sheng *et al.* (2008) mostraron que plantas de maíz colonizadas con *Glomus mosseae* tienen mayor eficiencia máxima del PSII (Fv/Fm) que las plantas no colonizadas. Los valores obtenidos son similares a los de este experimento. Además demostraron que en condiciones de estrés por salinidad las plantas de maíz colonizadas tienen mayor eficiencia que las no colonizadas. Ruiz-Sánchez *et al.* (2010) encontraron que plantas de arroz colonizadas con *R. intraradices* mantienen mejor la eficiencia fotosintética durante un periodo de estrés hídrico con respecto a las plantas no colonizadas.

El aumento de la capacidad de fotosíntesis puede ser debido a dos factores. Primeramente, a la nutrición suplementada de fosfato. En fotosíntesis, el fosfato es usado como suministro de energía (en forma de ATP o NADPH) para la regeneración del aceptor de CO₂ (ribulosa-1,5- bifosfato) y la regulación de la glucólisis (de Groot *et al.*, 2003). Esta puede ser la razón por la que las plantas micorrizadas del experimento 2011-A tuvieron mayor eficiencia de fotosíntesis con respecto a las no micorrizadas, ya que tuvieron mayor concentración de fosfato en hoja.

También puede ser debido a la demanda de carbono, ya que la planta necesita una mayor cantidad de fotosintatos para mantener la simbiosis sin afectar su crecimiento. La razón es que el incremento de la demanda de carbono estimula la tasa de exportación de triosa-fosfato la cual se encarga de regresar el ortofosfato (Pi) del citosol (donde se realiza la glucólisis) hacia el cloroplasto y activar así las enzimas que regulan la fotosíntesis (activación del ciclo de Calvin) (Paul y Foyer, 2001). Además, el incremento de la exportación de triosa-fosfato y el mejoramiento de disponibilidad de ortofosfato incrementa la actividad de la cadena de transporte de electrones para la fosforilación de ATP y NADPH y previene la sobre-reducción del fotosistema I (Bukhov, 2004).

8.2 La micorrización induce resistencia contra el patógeno foliar *X. campestris* pv. *vesicatoria* en tomate

Durante el establecimiento de la simbiosis por HMAs ocurre una modulación en la respuesta de defensa de la planta. Esta modulación tiene una leve pero efectiva activación de la respuesta inmune de la planta la cual puede ocurrir no sólo localmente si no también sistémicamente. Esta activación permite un estado de pre-acondicionamiento de la planta para activar eficientemente los mecanismos de defensa en respuesta al ataque potencial de patógenos (revisado por Pozo *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, las plantas micorrizadas y no micorrizadas fertilizadas con bajo PO_4 y las plantas no micorrizadas con alto PO_4 fueron infectadas con *X. campestris* pv. *vesicatoria*, un patógeno foliar que causa la enfermedad de la mancha bacteriana en tomate. A los ocho días después de la infección con el patógeno, las plantas de los tres tratamientos mostraron en sus hojas la sintomatología de la enfermedad y se procedió a hacer el análisis para determinar el número de manchas por cm^2 de foliolo. Se obtuvo que las plantas micorrizadas tuvieron mejor resistencia que las no micorrizadas al presentar menor número de manchas/ cm^2 de foliolo. Los resultados de este experimento (2011-B) corroboran lo encontrado por Galindo-Flores (2008) en el experimento 2008.

Las plantas micorrizadas y fertilizadas con bajo y las no micorrizadas fertilizadas con alto fósforo no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su respuesta a *X. campestris* en el experimento 2011-B, en contraste con lo observado por Galindo-Flores en el experimento 2008.

Los resultados de estos dos experimentos representan una evidencia más que indica que la micorrización induce resistencia contra patógenos foliares, tal como se ha demostrado en otros trabajos como en tomate contra *Alternaria solani* (Fritz *et al.*, 2006), *X. campestris* pv. *alfalfae* en *Medicago truncatula* (Liu *et al.*, 2007), *Sclerotinia*

sclerotiorum en frijol (Mora-Romero, 2008) y *Phytophthora infestans* en plántulas de papa *in vitro* (Gallou *et al.*, 2010) por mencionar algunos.

En el experimento 2011-B se confirma que la micorrización induce un mecanismo de defensa, ya que las plantas micorrizadas con bajo fósforo presentaron menos manchas producidas por el patógeno *X. campestris* que las no micorrizadas también fertilizadas con bajo fósforo. Sin embargo, ya que en este experimento, a diferencia del experimento 2008, no hubo diferencias significativas entre las manchas observadas entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas pero fertilizadas con alto fósforo, esto podría indicar que la inducción de resistencia a *X. campestris* observada sí puede tener un componente afectado por la nutrición fosfatada.

8.3 La regulación de dos genes de fotosíntesis y cinco genes de defensa y/o estrés no son regulados a nivel de transcrito en las plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices*

Se realizó qPCR en muestras de hojas de plantas de los tres experimentos (2008, 2011-A y 2011-B) para determinar los niveles de expresión de los siete genes cuyas proteínas resultaron diferenciales en el experimento 2008. El análisis de expresión diferencial demostró que no hubo cambio en los siete genes en la condición micorrizada con respecto a la no micorrizada en los tres experimentos independientes con excepción del gen del polipéptido Cp29, el cual presentó una disminución en la expresión a nivel de transcrito (expresión relativa 0.2) en tejido foliar del experimento 2008. Los datos corroboran los obtenidos por Fiorelli *et al.* (2009) donde encontraron que los genes de anexina p34, polipéptido Cp29, tioredoxina peroxidasa, proteína 14-3-3, superóxido dismutasa (Cu-Zn) y proteína de plástidos asociada a lípidos no cambian su expresión en hoja de plantas de tomate colonizadas con *Glomus mosseae*. Liu *et al.* (2007) encontró que un gen que codifica para una anexina no tuvo cambio en su

expresión en raíces de *M. truncatula* colonizadas por *R. intraradices*, *Gigaspora gigantea* y *Glomus versiforme*.

Ya que la mayoría de los genes cuya expresión fue medida en los tres experimentos no presentaron un cambio en su expresión en los tres experimentos y sí mostraron una disminución a nivel de proteína en el experimento 2008 se concluye que la regulación de estos genes en hojas de tomate micorrizadas con *R. intraradices* no es a nivel de transcrito, es decir que la regulación se da después de la transcripción.

Entonces, la regulación a la que obedecen estos genes puede ser post-transcripcional o traduccional. La regulación post-transcripcional se da por el procesamiento, exportación y cambios en la localización del RNAm, mientras que la regulación traduccional o post-traduccional se da mediante la modificación o el control de la degradación de las proteínas. Sin embargo, aunque la conclusión de los análisis llevados a cabo en este trabajo indica que la regulación de los genes es post-transcripcional, es imposible definir si la regulación es a nivel de estabilidad, integridad y/o localización del transcrito, o por otra parte en la estabilidad o modificación de la proteína.

Las proteínas relacionadas a fotosíntesis encontradas reprimidas en el experimento 2008 (CHRC y CP29) no influyeron negativamente a la eficiencia de la fotosíntesis en las hojas de las plantas micorrizadas del experimento 2011-A, ya que la eficiencia fotosintética de las plantas micorrizadas fue siempre mayor a la de las plantas no micorrizadas bajo el mismo régimen nutricional.

Debido a que en los experimentos 2008 y 2011-B se demostró que la micorrización induce resistencia contra *X. campestris pv. vesicatoria* podemos inferir que la regulación de estas siete proteínas puede estar relacionada con el pre-acondicionamiento o priming por micorrización, particularmente de los genes relacionados a defensa y estrés (ANN, 14-3-3, SOD, TRP, HBP). La represión de estas proteínas en la condición

micorrizada puede estar involucrada con la activación de la respuesta tipo inmune de la planta para activar eficientemente el mecanismo de defensa contra el ataque posterior de un patógeno.

Algunos trabajos han demostrado que los cambios transcripcionales de algunos genes en respuesta a la micorrización inducen una resistencia contra el ataque de un patógeno. Liu *et al.* (2007) encontraron que el 25% de los genes que aumentaron su expresión en las plantas de *M. truncatula* micorrizadas estuvieron relacionados con defensa, posteriormente realizaron un experimento de infección con *X. campestris pv. alfalfae* y demostraron que la micorrización induce resistencia contra este patógeno. Jung *et al.* (2009) demostraron que la resistencia sistémica inducida por *G. mosseae* confiere resistencia contra *Botrytis cinerea* en hojas de tomate y estuvo asociada con la inducción de genes marcadores de ácido jasmónico en las plantas micorrizadas. Gallou *et al.* (2010) encontraron inducción de dos genes relacionados con patogénesis (*PR1* y *PR2*) en hojas de plántulas de papa micorrizadas *in vitro* en ausencia y presencia del patógeno *Phytophthora infestans*, y sugieren que la resistencia sistémica en las plantas micorrizadas es debido al pre-acondicionamiento (priming) de dos genes PR en papa.

Aunque los genes estudiados en el presente trabajo no mostraron cambios a nivel de transcrito, sus proteínas sí fueron reprimidas en la condición micorrizada. Aunque la regulación negativa de genes o proteínas no es común que sea reportada como mecanismos de inducción de defensa, nuestros resultados sugieren que este mecanismo no puede ser descartado. Es posible pensar que mientras algunas proteínas son reprimidas, algunas isoenzimas pudieran estar inducidas. Esto, sin duda, deberá ser abordado en experimentos posteriores.

8.4 La regulación del polipéptido Cp29 y la proteína 14-3-3 no son reguladas a nivel de transcrito en las plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* e infectadas con *X. campestris pv. vesicatoria* y están relacionadas con la defensa inducida por micorrización

Además del análisis de genes de defensa en las condiciones micorrizadas y no micorrizadas, en este trabajo se midieron los genes en plantas infectadas con el patógeno *X. campestris pv vesicatoria*, con el objeto de determinar si su regulación genética se alteraba en la presencia del patógeno.

A nivel de proteína, las únicas que resultaron diferenciales en el experimento de infección del 2008 fueron el polipéptido Cp29 y la proteína tipo 14-3-3.

Las proteínas tipo 14-3-3 tienen un amplio rango de funciones como reguladores de vías de señalización de transducción, como proteínas adaptadoras, chaperonas, activadoras y represoras (Palmgren *et al.*, 1998). Algunas de estas proteínas regulan directamente las actividades de un amplio rango de proteínas blanco mediante interacción proteína-proteína o mediante la modificación de la localización intracelular de la proteína blanco (Roberts, 2003). Proteínas tipo 14-3-3 han sido también relacionada en procesos de defensa.

Aunque a nivel de transcrito, la proteína tipo 14-3-3 no presentó cambios en las hojas de plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas, a nivel de proteína, disminuyó en las plantas micorrizadas (Cuadro 9). De manera interesante, cuando las plantas fueron enfrentadas al patógeno, el gen de la proteína 14-3-3 tampoco se vio modificado en su expresión, pero a nivel de proteína aumentó su acumulación cinco veces en las plantas micorrizadas e infectadas con respecto a las plantas no micorrizadas e infectadas (Cuadro 10). Entonces, esta proteína es regulada

principalmente a nivel de proteína, ya que el nivel de transcrito no se modifica sustancialmente, ni previo ni posterior a la infección.

El polipéptido Cp29 es el complejo más grande de los denominados complejos de proteínas menores de obtención de luz (LHC, "minor" light harvesting complex) del PSII y consiste en aproximadamente de 257 aminoácidos (Bergantino *et al.*, 1998). Esta proteína se encontró reprimida en la condición micorrizada con respecto a la no micorrizada (Cuadro 9). A nivel de transcrito, a pesar de que el valor de expresión relativa fue de 0.16, es decir que el gen estaría reprimido en la condición micorrizada, es importante mencionar que al analizar los datos crudos, este valor fue poco confiable, ya que los valores de las réplicas fueron muy variables. Por otro lado, el análisis de este gen en los experimentos 2011-A y 2011-B indican que no hubo cambio en su expresión a nivel de transcrito. Por otro lado, y de manera interesante, el polipéptido Cp29 aumentó su expresión a nivel de proteína en la condición micorrizada e infectada con *X. campestris*, aunque no se observó cambio a nivel de transcrito (Cuadro 10), reafirmando con esto, la idea de que los efectos bioquímicos y moleculares de la micorrización son regulados principalmente a nivel de proteína y no a nivel de acumulación de transcritos. El polipéptido Cp29 es susceptible de ser fosforilado, lo cual ha sido reportado para esta proteína en hojas de maíz cuando son expuestas a condiciones fuertes de fotoinhibición (Bergantino *et al.*, 1998). Por lo tanto, es posible que la fosforilación de esta proteína puede estar relacionada con un mecanismo para activar eficientemente la resistencia contra un patógeno en las plantas micorrizadas.

Se realizó la expresión diferencial de PR1 como un control de inducción del gen por infección y se encontró que este gen aumenta su expresión cuando la planta es atacada por un patógeno, lo cual es una indicación de que la infección por *X. campestris* ocurrió de manera adecuada en el experimento.

IX. CONCLUSIONES

- La colonización con *Rhizophagus intraradices* induce resistencia contra el patógeno foliar *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en las plantas de tomate.
- La colonización con *R. intraradices* aumenta la eficiencia del fotosistema II con respecto a las plantas de tomate no colonizadas.
- La regulación de las proteínas relacionadas con fotosíntesis (como la proteína de plástidos asociada a lípidos y el polipéptido Cp29) y proteínas relacionadas con defensa y/o estrés (como anexina p34, superóxido dismutasa (Cu-Zn), tioredoxina peroxidasa y proteína de unión a harpina) en hojas de tomate colonizadas con *R. intraradices* no es a nivel de acumulación de transcritos.
- La regulación de estas proteínas en la condición micorrizada puede estar relacionada con el pre-acondicionamiento o “priming” por micorrización.
- La regulación del polipéptido Cp29 y la proteína 14-3-3 no son reguladas a nivel de transcrito en las plantas de tomate colonizadas con *R. intraradices* e infectadas con *X. campestris* pv. *vesicatoria* y pudieran estar relacionadas con la defensa inducida por micorrización.

X. RECOMENDACIONES

Realizar experimentos con plantas de tomate a distintas concentraciones de fosfato para encontrar las concentraciones mínimas de fosfato sin llegar al umbral de crecimiento y realizar a esa concentración los experimentos de micorrización.

Analizar a nivel de RNAm las proteínas encontradas inducidas en el experimento de Peinado-Guevara 2010, la proteína tipo germina y la proteína de unión a auxina las cuales no pudieron ser analizadas en este experimento ya que los oligonucleótidos diseñados no fueron específicos.

Realizar experimentos de micorrización y analizar los procesos fisiológicos como fotosíntesis y los procesos moleculares, a nivel de gen, proteína y metabolito de manera conjunta.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.** Plant Pathology. 1997, 4th Edition. Academic Press. USA. 421p.
- Ames, B.N.** 1956. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Analytical Methods. 8, 115-118.
- Azcón-Aguilar C, Barea JM.** 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens — an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza. 6, 457-464.
- Bergantino, E., Sandona, D., Cgini, D., Bassi, R.** 1998. The photosystem II subunit CP29 can be phosphorylated in both C3 and C4 plants as suggested by sequence analysis. Plant Molecular Biology. 36, 11-22.
- Bonasera, J.M., Kim, J.F., Beer, S.V.** 2006. PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. BMC Plant Biology. 6: 23.
- Branscheid, A., Sieh, D., Datt Pant, B., May, P., Devers, E.A., Elkrog, A., Schauser, L., Sheible, W-R., Krajinski, F.** 2010. Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. The American Phytopathological Society. 9, 915-926.
- Brederode, F., Linthorst, H., Bol, J.** 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by Virus infection, ethephan treatment, UV light and wounding. Plant Molecular Biology. 17, 1117-1125.
- Bruce, A., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** 2002. Control of gene expression. In: Molecular Biology of the Cell, 4TH Edition. Garland Science. New York, pp 395-399.
- Bukhov, N.G.** 2004. Dynamic light regulation of photosynthesis. Russian Journal of Plant Physiology. 51, 742–753.
- Carrillo-Frasio, J.A., Sánchez-Bautista, L., Garcia-Estrada, R.S., Allende-Molar, R., Márquez-Zequera, I.** 2001. Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge)

Dye. Presentes en el estado de Sinaloa, México. Cd. Obregón, Sonora. Revista Mexicana de Fitopatología. 19, 248-250.

Camoni, L., Harper, J.F., Palmgren, M.G. 1998. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). FEBS Lett. 430, 381–384.

Cervantes-Gómez, R.G. 2010. Estudio transcripcional del mecanismo de resistencia sistémica contra patógenos de parte aérea inducida por micorrización en tomate (*Solanum lycopersicum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). Guasave, Sinaloa, México. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN UNIDAD SINALOA. 105 p.

Cruz, O.J., García, E.R. y Carrillo, F.A. 1998. Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. 255 p.

de Groot, C.C., van den Boogaard, R., Marcelis, L.F.M., Harbinson, J., Lambers, H. 2003. Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. Journal of Experimental Botany. 54, 1957–1967.

Fiorilli, V. Catoni, M. Miozzi, L. Novero, M. Accotto, GP. Lanfranco, L. 2009. Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytologist 184, 975-987.

Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjaer, M.F., Thordal-Christensen, H., Pons-Kuehnemann, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. Mycorrhiza. 16, 413-419.

Galindo-Flores, H. 2008. Resistencia inducida por micorrización en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Guasave, Sinaloa, México. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN UNIDAD SINALOA. 117 p.

Gallou, A., Lucero-Mosquera H.P., Cranenbrouck, S., Suárez J.P., Declereck S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 76, 20-26.

García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Journal of Experimental Botany. 53, 1377-1386.

- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gallote, A., Tahiri-Slaoui, Gianinazzi S.** 1996. Cellular and molecular defence-related root response to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 133, 45-57.
- Giovanetti, M., Mosse, B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 84, 489-500.
- Gladys, F. S.** 1993. *Compendio de Agronomía*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba. 656 pp.
- Goto, M.** 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, Inc. USA. 40p.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bucking, H., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y.** 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435, 819–823.
- Harrison, M.J.** 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends Plant Science*. 2, 54-60.
- Jin, H., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Piotrowski, E., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y.** 2005. The uptake metabolism transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytology*. 168, 687–696.
- Jones, J.B., Pohronezny, KL., Stall, R.E. and Jones, J.E.** 1986. Survival of *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seed and volunteer tomato plants. *Phytopathology*. 76, 430-434.
- Jung, S.C., García-Andrade, J., García, J.M., Azcón-Aguilar, C.** 2009. Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., Gianinazzi, S., Gianinazzi –Pearson, V. (ed.) *Mycorrhizas: functional processes and ecological impact*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: p 123-135.
- Kaschuk, G., Kuyper, T.W., Leffelaar, P.A., Hungria M., Giller K.E.** 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?. *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 1233-1244.
- Kinet, J.M and Peet.** 1997. Tomato. In: *The physiology of vegetable crops*. Wien CAB International. New York, New York. pp 207-259.

- Kuo, C.G., Huang, R.S.1982.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal on the growth and yield of rice-stubble cultured soybeans. *Plant and Soil*. 64, 325–330.
- Lingua, G., D'Agostino, G., Massa, N., Antosiano, M., Berta, G.** 2002. Mycorrhiza-induced differential response to a yellow disease in tomato. *Mycorrhiza* .12, 191-198.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D. and Harrison, M. J.** 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal*. 50, 529–544.
- Mata, J., Marguerat, S., Bähler, J.** 2005. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends in Biochemical Sciences*. 30, 506-514.
- Mora-Romero, A.** 2008. Efecto de la micorrización con *Glomus intraradices* en la tolerancia al moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* en tres líneas de frijol. Guasave, Sinaloa, México. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN UNIDAD SINALOA. 99 p.
- Mortimer, P.E., Pérez-Fernández, M.A., Valentine, A.J.** 2008. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology & Biochemistry*. 40,1019–1027.
- NCBI.** Taxonomy browser. *Solanum lycopersicum* (tomato). [Consulta enero 2010] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4081>
- NCBI.** Taxonomy browser. *Glomus intraradices*. [Consulta enero 2010] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4876&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Oxborough, K.** 2004. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany*. 55, 1195-1205.
- Paszkowski, U.** 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Tansley review*. *New Phytologist*. 37p.
- Paul, M.J., Foyer, C.H.** 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 52, 1383–1400.

- Peinado-Guevara, L.I.** 2010. Estudio de la resistencia inducida por micorrización mediante proteómica comparativa en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, Mill)". Guasave, Sinaloa, México. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Sinaloa. 145 p.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S.** 1970. Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55, 158-161.
- Pozo, M., Azcon-Aguilar, C.** 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Current Opinion in Plant Biology. 10, 393–398.
- Roberts, M.R.** 2003. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. Trends Plant Science, 8, 218 –223.
- Ross, J.P.** 1971. Effect of phosphate fertilization on yield of mycorrhizal and nonmycorrhizal soybeans. Phytopathology. 61, 1400–1403.
- Ruiz-Sánchez, M., Aroca, R., Muñoz, Y., Polón, R., Ruiz-Lozano, J.M.** 2010. The arbuscular mycorrhizal simbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. Journal of Plant Physiology.167, 862-869.
- Rychter, A.M., Rao, I.M.** 2005. Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism. In: Pessaraki, M. (Ed.), Handbook of Photosynthesis. Taylor & Francis Group, LLC, Tucson, pp. 123–148.
- S. Johnston, Rutgers University.** Corne Vegetable md Online. Photo of tomato: Bacterial spot (*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*). [Consulta enero 2010] http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Impt_Diseases/Tomato/Tom_Spot.htm.
- SIAP-SAGARPA.** Servicio de información agropecuaria y pesquera, SAGARPA. [Consulta enero 2010] <http://www.siap.gob.mx>.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang F., Huang Y.** 2008. Influence of arbuscular mycorrhizal on photosynthesis and water status of maize plants under salta stress. Mycorrhiza. 18, 287-296.
- Smith SE, Read DJ.** 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. San Diego

- Stall, R.E., Cook, A.A.** 1996. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* and lesion development in resistant and susceptible pepper. *Phytopathology*. 56, 1152-1154.
- Swing, J.G., Civerolo, E.L.** 1993. *Xanthomona*. First edition Chapman and Hall. London and New York. 399 p.
- Tahiri-Aloui, A., Antoniuw, J.F.** 1996. Cloning of genes associated with the colonization of tomato roots by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agronomie*. 16, 699-707.
- Warnock, S.J.** 1988. A review of taxonoly and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hort Science*. 23 (4), 669-673.
- Whipps J.M.** 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*. 82, 1198-1227.
- Xavier, L.J.C., Germida, J.J.** 2002. Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 181–188.
- Xavier, L.J.C., Germida, J.J.** 2003. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum pv. viceae* enhance pea yield and nutrition. *Biology and Fertility of Soils*. 37, 161–167.

ANEXOS

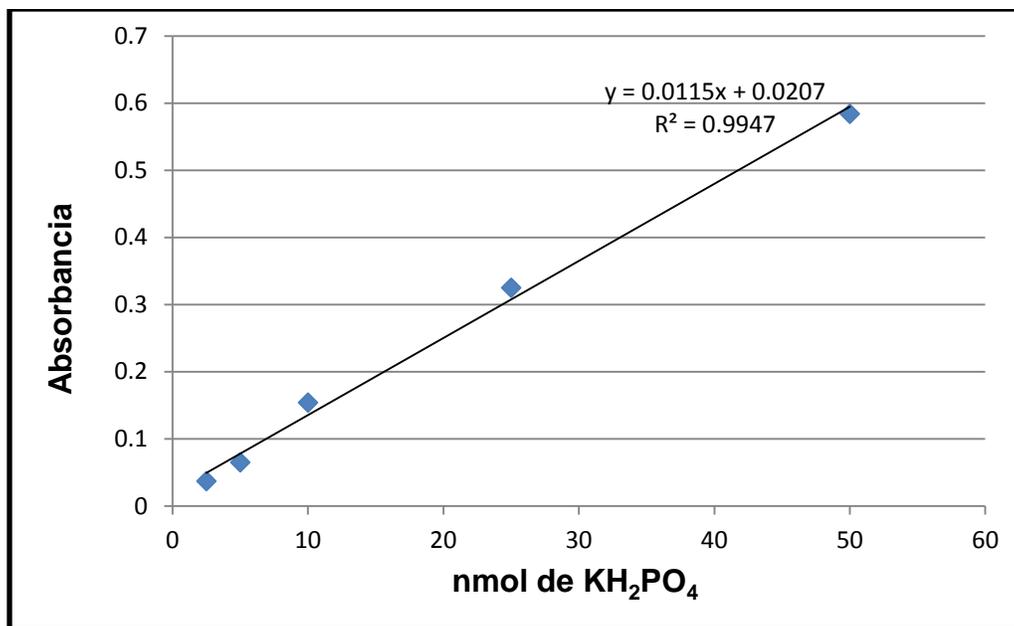


Figura 1A. Curva estándar de KH_2PO_4 para concentración de fosfato inorgánico en tejido foliar del experimento 2008. Absorbancia en espectrofotómetro a 820 nm.

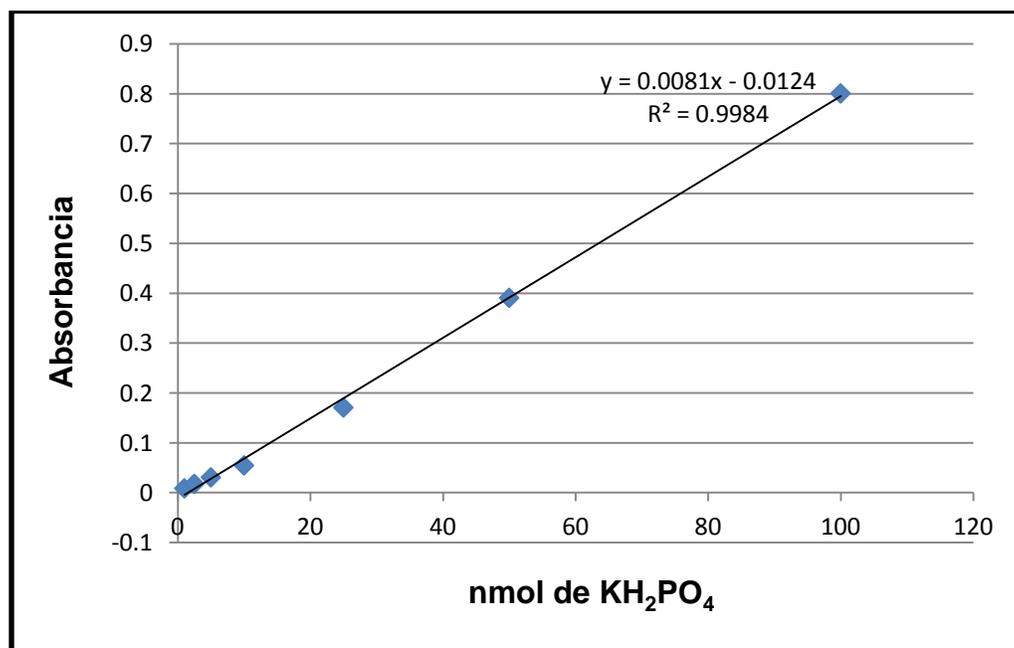


Figura 2A. Curva estándar de KH_2PO_4 para concentración de fosfato inorgánico en tejido foliar del experimento 2011-A. Absorbancia en espectrofotómetro a 820 nm.

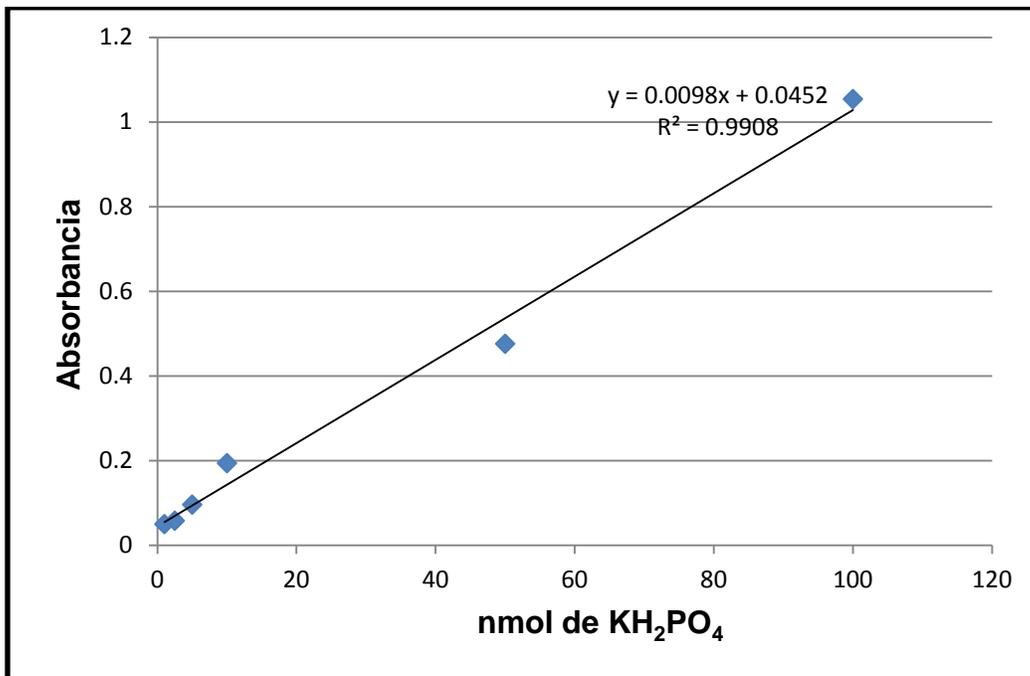


Figura 3A. Curva estándar de KH₂PO₄ para concentración de fosfato inorgánico en tejido foliar del experimento 2011-B. Absorbancia en espectrofotómetro a 820 nm.

Tabla 1A. Datos de CT (treshold cycle) de gen HBP.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
HBP -M-X1	22.59	22.55	0.06	22.25	0.61	HBP -M1	23.18	23	0.18	22.50	0.45	HBP -M1	20.23	20.29	0.1	20.05	0.76
HBP -M-X1	22.48					HBP -M1	23					HBP -M1	20.41				
HBP -M-X1	22.57					HBP -M1	22.83					HBP -M1	20.23				
HBP -M-X2	22.74	22.65	0.11			HBP -M2	22.08	22.06	0.1			HBP -M2	19.12	19.2	0.11		
HBP -M-X2	22.52					HBP -M2	22.15					HBP -M2	19.33				
HBP -M-X2	22.69					HBP -M2	21.94					HBP -M2	19.15				
HBP -M-X3	21.69	21.55	0.13			HBP -M3	22.15	22.19	0.06			HBP -M3	20.45	20.67	0.19		
HBP -M-X3	21.53					HBP -M3	22.17					HBP -M3	20.73				
HBP -M-X3	21.43					HBP -M3	22.25					HBP -M3	20.82				
HBP +M-X1	22.47	22.45	0.05	22.31	0.33	HBP -M4	22.76	22.74	0.04			HBP +M1	19.08	19.04	0.06	19.38	0.40
HBP +M-X1	22.48					HBP -M4	22.7					HBP +M1	19.07				
HBP +M-X1	22.39					HBP -M4	22.76					HBP +M1	18.97				
HBP +M-X2	22.56	22.54	0.04			HBP +M1	21.53	21.53	0.03	21.77	0.67	HBP +M2	20.04	19.82	0.32		
HBP +M-X2	22.5					HBP +M1	21.5					HBP +M2	19.98				
HBP +M-X2	22.57					HBP +M1	21.56					HBP +M2	19.45				
HBP +M-X3	21.93	21.93	0.14			HBP +M2	21.73	21.79	0.06			HBP +M3	19.37	19.29	0.08		
HBP +M-X3	22.07					HBP +M2	21.84					HBP +M3	19.27				
HBP +M-X3	21.79					HBP +M2	21.82					HBP +M3	19.22				
						HBP +M3	22.68	22.68	0.03								
						HBP +M3	22.64										
						HBP +M3	22.71										
						HBP +M4	21.01	21.09	0.07								
						HBP +M4	21.11										
						HBP +M4	21.15										

Tabla 2A. Datos de CT (treshold cycle) de TRP.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
TRP -M-X1	19.53	19.24	0.05	19.26	0.19	TRP -M1	21.49	21.55	0.06	20.71	0.57	TRP -M1	18.09	18.15	0.06	18.10	0.40
TRP -M-X1	19.43					TRP -M1	21.59					TRP -M1	18.15				
TRP -M-X1	19.46					TRP -M1	21.58					TRP -M1	18.22				
TRP -M-X2	19.65	19.46	0.06			TRP -M2	20.36	20.36	0.01			TRP -M2	17.62	17.63	0.06		
TRP -M-X2	19.76					TRP -M2	20.35					TRP -M2	17.58				
TRP -M-X2	19.75					TRP -M2	20.35					TRP -M2	17.69				
TRP -M-X3	19.01	19.09	0.02			TRP -M3	20.42	20.43	0.05			TRP -M3	18.41	18.53	0.13		
TRP -M-X3	18.9					TRP -M3	20.39					TRP -M3	18.51				
TRP -M-X3	18.93					TRP -M3	20.49					TRP -M3	18.67				
TRP +M-X1	18.9	18.90	0.03	19.11	0.18	TRP -M4	20.49	20.48	0.03			TRP +M1	17.59	17.59	0.13	18.25	0.32
TRP +M-X1	18.88					TRP -M4	20.46					TRP +M1	17.46				
TRP +M-X1	18.93					TRP -M4	20.51					TRP +M1	17.71				
TRP +M-X2	19.17	19.19	0.02			TRP +M1	19.98	20.01	0.04	20.07	0.42	TRP +M2	18.21	19.37	2.1		
TRP +M-X2	19.2					TRP +M1	20					TRP +M2	18.1				
TRP +M-X2	19.21					TRP +M1	20.05					TRP +M2	21.79				
TRP +M-X3	19.18	19.23	0.05			TRP +M2	19.77	19.8	0.04			TRP +M3	17.74	17.79	0.05		
TRP +M-X3	19.24					TRP +M2	19.85					TRP +M3	17.78				
TRP +M-X3	19.28					TRP +M2	19.79					TRP +M3	17.84				
						TRP +M3	20.67	20.69	0.02								
						TRP +M3	20.71										
						TRP +M3	20.69										
						TRP +M4	19.87	19.79	0.07								
						TRP +M4	19.77										
						TRP +M4	19.72										

Tabla 3A. Datos de CT (treshold cycle) de SOD.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
SOD -M-X1	21.11	21.28	0.19	20.48	1.28	SOD -M1	19.65	19.51	0.18	18.99	0.47	SOD -M1	17.27	17.36	0.14	17.13	0.65
SOD -M-X1	no amplifico					SOD -M1	19.31					SOD -M1	17.52				
SOD -M-X1	21.25					SOD -M1	19.58					SOD -M1	17.3				
SOD -M-X1	21.49					SOD -M2	19.06	18.98	0.29			SOD -M2	16.42	16.4	0.04		
SOD -M-X2	21	21.15	0.13			SOD -M2	18.65					SOD -M2	16.43				
SOD -M-X2	21.11					SOD -M2	19.22					SOD -M2	16.36				
SOD -M-X2	21.3					SOD -M3	18.86	19.07	0.27			SOD -M3	17.81	17.63	0.18		
SOD -M-X2	21.18					SOD -M3	19.38					SOD -M3	17.62				
SOD -M-X3	18.97	19	0.1			SOD -M3	18.96					SOD -M3	17.46				
SOD -M-X3	19.1					SOD -M4	18.54	18.38	0.55			SOD +M1	17.02	17.19	0.2	17.06	0.31
SOD -M-X3	18.87					SOD -M4	17.77					SOD +M1	17.41				
SOD -M-X3	19.05					SOD -M4	18.82					SOD +M1	17.13				
SOD +M-X1	19.84	19.91	0.06	19.71	0.35	SOD +M1	19.02	19.31	0.35	18.65	0.49	SOD +M2	17.18	17.28	0.12		
SOD +M-X1	19.9					SOD +M1	19.69					SOD +M2	17.26				
SOD +M-X1	19.9					SOD +M1	19.21					SOD +M2	17.41				
SOD +M-X1	19.99					SOD +M2	18.64	18.15	0.44			SOD +M3	16.72	16.71	0.03		
SOD +M-X2	19.79	19.91	0.11			SOD +M2	18					SOD +M3	16.74				
SOD +M-X2	19.85					SOD +M2	17.81					SOD +M3	16.68				
SOD +M-X2	20					SOD +M3	18.63	18.62	0.16								
SOD +M-X2	19.99					SOD +M3	18.76										
SOD +M-X3	19.08	19.31	0.17			SOD +M3	18.45										
SOD +M-X3	19.31					SOD +M4	18.62	18.5	0.12								
SOD +M-X3	19.49					SOD +M4	18.39										

SOD +M-X3	19.37					SOD +M4	18.48					
NO M -X1 SOD	17.93	17.95	0.03	18.40	0.41	SOD -M1	19	19.03	0.13	18.64	0.39	
NO M -X1 SOD	17.98					SOD -M1	19.17					
NO M -X1 SOD	17.96					SOD -M1	18.92					
NO M -X2 SOD	18.79	18.74	0.04			SOD -M2	18.61	18.62	0.12			
NO M -X2 SOD	18.71					SOD -M2	18.5					
NO M -X2 SOD	18.71					SOD -M2	18.74					
NO M -X3 SOD	18.64	18.52	0.11			SOD -M3	18.3	18.26	0.04			
NO M -X3 SOD	18.41					SOD -M3	18.26					
NO M -X3 SOD	18.52					SOD -M3	18.22					
M -X1 SOD	17.98	18.01	0.06	18.04	0.12	SOD +M1	18.7	18.59	0.1	18.20	0.38	
M -X1 SOD	17.97					SOD +M1	18.51					
M -X2 SOD	18.21	18.18	0.05			SOD +M1	18.55					
M -X2 SOD	18.13					SOD +M2	17.73	17.83	0.12			
M -X1 SOD	18.08					SOD +M2	17.97					
M -X2 SOD	18.22					SOD +M2	17.81					
M -X3 SOD	17.94	17.94	0.08			SOD +M3	18.21	18.19	0.01			
M -X3 SOD	18.02					SOD +M3	18.18					
M -X3 SOD	17.86					SOD +M3	18.19					

Tabla 4A. Datos de CT (treshold cycle) de CHRC.

Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
CHRC -M-X1	28.49	28.65	0.46	27.40	1.58	CHRC -M1	24.36	24.62	0.24	23.88	0.60	CHRC -M1	23.07	22.9	0.21	22.20	1.29
CHRC -M-X1	28.28					CHRC -M1	24.82					CHRC -M1	22.66				
CHRC -M-X1	28.5					CHRC -M1	24.69					CHRC -M1	22.96				
CHRC -M-X1	29.33					CHRC -M2	23.53	23.53	0.11			CHRC -M2	21.02	20.72	0.29		
CHRC -M-X2	27.63	27.92	0.4			CHRC -M2	23.42					CHRC -M2	20.72				
CHRC -M-X2	27.62					CHRC -M2	23.64					CHRC -M2	20.43				
CHRC -M-X2	27.98					CHRC -M3	23.26	23.27	0.04			CHRC -M3	22.9	22.99	0.15		
CHRC -M-X2	28.47					CHRC -M3	23.31					CHRC -M3	22.91				
CHRC -M-X3	25.58	25.62	0.16			CHRC -M3	23.23					CHRC -M3	23.16				
CHRC -M-X3	25.4					CHRC -M4	24.06	24.11	0.05			CHRC +M1	22.09	21.98	0.19	21.85	0.79
CHRC -M-X3	25.75					CHRC -M4	24.12					CHRC +M1	22.09				
CHRC -M-X3	25.73					CHRC -M4	24.16					CHRC +M1	21.76				
CHRC +M-X1	26.71	27.15	0.45	26.73	1.27	CHRC +M1	22.86	22.86	0.05	23.22	0.9	CHRC +M2	22.71	22.56	0.17		1.15
CHRC +M-X1	27.78					CHRC +M1	22.82					CHRC +M2	22.38				
CHRC +M-X1	27.07					CHRC +M1	22.91					CHRC +M2	22.58				
CHRC +M-X1	27.04					CHRC +M2	23	23	0.08			CHRC +M3	21.08	21	0.23		
CHRC +M-X2	27.81	27.74	0.18			CHRC +M2	23.08					CHRC +M3	21.18				
CHRC +M-X2	27.58					CHRC +M2	22.91					CHRC +M3	20.75				
CHRC +M-X2	27.97					CHRC +M3	24.5	24.54	0.04								
CHRC +M-X2	27.61					CHRC +M3	24.57										
CHRC +M-X3	25.4	25.31	0.34			CHRC +M3	24.56										
CHRC +M-X3	25.07					CHRC +M4	22.44	22.48	0.05								
CHRC +M-X3	25.02					CHRC +M4	22.54										
CHRC +M-X3	25.75					CHRC +M4	22.46										

CHRC -M1	24.86	24.82	0.05	24.70	0.41
CHRC -M1	24.84				
CHRC -M1	24.76				
CHRC -M2	25.23	25.04	0.19		
CHRC -M2	24.85				
CHRC -M2	25.04				
CHRC -M3	24.24	24.25	0.05		
CHRC -M3	24.21				
CHRC -M3	24.31				
CHRC +M1	24.23	24.2	0.09	24.43	0.61
CHRC +M1	24.1				
CHRC +M1	24.26				
CHRC +M2	23.98	23.97	0.11		
CHRC +M2	24.08				
CHRC +M2	23.85				
CHRC +M3	24.33	25.13	1.16		
CHRC +M3	24.6				
CHRC +M3	26.47				

Tabla 5A. Datos de CT (treshold cycle) de 14-3-3.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
-M-X1 14-3	22.43	22.47	0.05	21.35	1.25	14-3-3 -M1	23.73	23.71	0.28	23.32	0.48	14-3-3 -M1	19.08	19.12	0.03	19.20	0.63
-M-X1 14-3	22.5					14-3-3 -M1	23.43					14-3-3 -M1	19.13				
-M-X2 14-3	21.51	21.58	0.09			14-3-3 -M1	23.98					14-3-3 -M1	19.14				
-M-X2 14-3	21.64					14-3-3 -M2	23.11	23.02	0.08			14-3-3 -M2	18.62	18.67	0.15		
-M-X3 14-3	19.97	20	0.05			14-3-3 -M2	22.99					14-3-3 -M2	18.56				
-M-X3 14-3	20.04					14-3-3 -M2	22.95					14-3-3 -M2	18.84				
+M-X1 14-3	20.81	20.76	0.07	20.64	0.48	14-3-3 -M3	22.7	22.8	0.1			14-3-3 -M3	19.87	19.81	0.12		
+M-X1 14-3	20.7					14-3-3 -M3	22.79					14-3-3 -M3	19.67				
+M-X2 14-3	21.27	21.05	0.31			14-3-3 -M3	22.91					14-3-3 -M3	19.88				
+M-X2 14-3	20.83					14-3-3 -M4	23.76	23.74	0.05			14-3-3 +M1	18.9	18.93	0.06	18.92	0.08
+M-X3 14-3	20.14	20.12	0.03			14-3-3 -M4	23.78					14-3-3 +M1	18.99				
+M-X3 14-3	20.1					14-3-3 -M4	23.69					14-3-3 +M1	18.88				
14-3-3 -M-XC1	18.97	18.79	0.18	18.96	0.45	14-3-3 +M1	22.59	22.64	0.16	22.69	0.22	14-3-3 +M2	19.05	19.12	0.13		
14-3-3 -M-XC1	18.79					14-3-3 +M1	22.51					14-3-3 +M2	19.28				
14-3-3 -M-XC1	18.61					14-3-3 +M1	22.82					14-3-3 +M2	19.04				
14-3-3 -M-XC2	19.48	19.47	0.02			14-3-3 +M2	22.51	22.42	0.12			14-3-3 +M3	18.97	18.7	0.29		
14-3-3 -M-XC2	19.45					14-3-3 +M2	22.46					14-3-3 +M3	18.39				
14-3-3 -M-XC2	19.48					14-3-3 +M2	22.28					14-3-3 +M3	18.75				
14-3-3 -M-XC3	18.63	18.63	0.04			14-3-3 +M3	22.72	22.78	0.06								
14-3-3 -M-XC3	18.67					14-3-3 +M3	22.82										
14-3-3 -M-XC3	18.59					14-3-3 +M3	22.82										
14-3-3 +M-XC1	18.43	18.42	0.04	18.56	0.13	14-3-3 +M4	22.99	22.93	0.07								
14-3-3 +M-XC1	18.46					14-3-3 +M4	22.85										
14-3-3 +M-XC1	18.39					14-3-3 +M4	22.95										

14-3-3 +M-XC2	18.62	18.6	0.03
14-3-3 +M-XC2	18.56		
14-3-3 +M-XC2	18.61		
14-3-3 +M-XC3	18.75	18.67	0.08
14-3-3 +M-XC3	18.59		
14-3-3 +M-XC3	18.67		

Tabla 6A. Datos de CT (treshold cycle) de ANN.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
ANN -M-X1	23.1	23.18	0.11	22.27	1.36	ANN -M1	20.87	21.15	0.24	21.07	0.43	ANN -M1	18.76	18.81	0.07	18.46	0.66
ANN -M-X1	23.25					ANN -M1	21.31					ANN -M1	18.89				
ANN -M-X2	22.89	22.93	0.06			ANN -M1	21.26					ANN -M1	18.78				
ANN -M-X2	22.97					ANN -M2	21.36	21.39	0.4			ANN -M2	17.64	17.7	0.06		
ANN -M-X3	20.61	20.71	0.13			ANN -M2	21					ANN -M2	17.69				
ANN -M-X3	20.8					ANN -M2	21.81					ANN -M2	17.76				
ANN +M-X1	20.89	20.97	0.11	20.93	0.23	ANN -M3	20.46	20.44	0.04			ANN -M3	18.73	18.86	0.13		
ANN +M-X1	21.05					ANN -M3	20.41					ANN -M3	18.84				
ANN +M-X2	21.27	21.14	0.18			ANN -M4	21.24	21.3	0.16			ANN -M3	19				
ANN +M-X2	21.02					ANN -M4	21.18					ANN +M1	18.42	18.37	0.04	18.49	0.26
ANN +M-X3	20.63	20.69	0.08			ANN -M4	21.49					ANN +M1	18.34				
ANN +M-X3	20.75					ANN +M1	20.71	20.75	0.06	20.79	0.29	ANN +M1	18.35				
						ANN +M1	20.73					ANN +M2	18.94	18.79	0.13		
						ANN +M1	20.81					ANN +M2	18.68				
						ANN +M2	20.64	20.51	0.11			ANN +M2	18.77				
						ANN +M2	20.45					ANN +M3	18.43	18.31	0.11		
						ANN +M2	20.44					ANN +M3	18.23				
						ANN +M3	20.72	20.69	0.04			ANN +M3	18.27				
						ANN +M3	20.71										
						ANN +M3	20.64										
						ANN +M4	20.84	21.19	0.32								
						ANN +M4	21.46										
						ANN +M4	21.28										

Tabla 7A. Datos de CT (treshold cycle) de CP29.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
CP29 -M-X1	24.16	24.19	0.04	22.92	1.63	CP29 -M1	22.07	21.82	0.23	21.27	0.89	CP29 -M1	18.18	18.29	0.11	17.62	1.42
CP29 -M-X1	24.22					CP29 -M1	21.8					CP29 -M1	18.3				
CP29 -M-X2	23.48	23.5	0.04			CP29 -M1	21.6					CP29 -M1	18.39				
CP29 -M-X2	23.53					CP29 -M2	20.79	20.73	0.08			CP29 -M2	15.86	15.98	0.16		
CP29 -M-X3	21.03	21.08	0.08			CP29 -M2	20.75					CP29 -M2	16.16				
CP29 -M-X3	21.14					CP29 -M2	20.64					CP29 -M2	15.91				
CP29 +M-X1	24.97	25.12	0.21	25.29	1.27	CP29 -M3	20.38	20.33	0.04			CP29 -M3	18.47	18.58	0.1		
CP29 +M-X1	25.26					CP29 -M3	20.29					CP29 -M3	18.68				
CP29 +M-X2	26.84	26.64	0.29			CP29 -M3	20.33					CP29 -M3	18.6				
CP29 +M-X2	26.43					CP29-M4	22.26	22.21	0.05			CP29 +M1	16.21	16.05	0.35	16.57	0.53
CP29 +M-X3	23.86	24.12	0.37			CP29-M4	22.16					CP29 +M1	16.29				
CP29 +M-X3	24.39					CP29-M4	22.22					CP29 +M1	15.65				
CP29 -M-XC1	19.16	19.22	0.06	18.92	0.33	CP29 +M1	20.19	20.21	0.02	20.49	0.89	CP29 +M2	17.49	17.11	0.44		
CP29 -M-XC1	19.22					CP29 +M1	20.22					CP29 +M2	16.63				
CP29 -M-XC1	19.28					CP29 +M1	20.23					CP29 +M2	17.21				
CP29 -M-XC2	18.99	18.97	0.12			CP29 +M2	20.53	20.58	0.04			CP29 +M3	16.83	16.54	0.26		
CP29 -M-XC2	19.07					CP29 +M2	20.59					CP29 +M3	16.45				
CP29 -M-XC2	18.84					CP29 +M2	20.61					CP29 +M3	16.34				
CP29 -M-XC3	18.34	18.56	0.24			CP29 +M3	21.52	21.64	0.17								
CP29 -M-XC3	18.82					CP29 +M3	21.83										
CP29 -M-XC3	18.51					CP29 +M3	21.55										
CP29 +M-XC1	21.33	21.42	0.16	20.83	0.90	CP29 +M4	19.52	19.52	0.01								
CP29 +M-XC1	21.6					CP29 +M4	19.5										
CP29 +M-XC1	21.32					CP29 +M4	19.52										

CP29 +M-XC2	21.24	21.27	0.2
CP29 +M-XC2	21.09		
CP29 +M-XC2	21.49		
CP29 +M-XC3	19.95	19.8	0.12
CP29 +M-XC3	19.73		
CP29 +M-XC3	19.74		

Tabla 8A. Datos de CT (treshold cycle) de PR1.

2008						2011-A						2011-B					
Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol	Nombre	CT rep tec	Prom. CT rep tec	Ds CT rep tec	Prom. CT rep biol	Ds CT rep biol
PR1A -M-XC1	17.55	17.51	0.04	17.16	0.59	PR1a -M1	15.33	15.33	0.05	15.97	1.76	PR1A -M1	15.47	15.47	0.11	14.36	1.02
PR1A -M-XC1	17.52					PR1a -M1	15.39					PR1A -M1	15.59				
PR1A -M-XC1	17.46					PR1a -M1	15.29					PR1A -M1	15.37				
PR1A -M-XC2	17.52	17.49	0.09			PR1a -M2	16.74	16.71	0.11			PR1A -M2	13.45	13.45	0.03		
PR1A -M-XC2	17.56					PR1a -M2	16.59					PR1A -M2	13.41				
PR1A -M-XC2	17.38					PR1a -M2	16.81					PR1A -M2	13.48				
PR1A -M-XC3	16.38	16.48	0.08			PR1a -M3	15.82	15.88	0.11			PR1A -M3	13.98	14.17	0.27		
PR1A -M-XC3	16.54					PR1a -M3	15.81					PR1A -M3	14.48				
PR1A -M-XC3	16.5					PR1a -M3	16.01					PR1A -M3	14.05				
PR1A +M-XC1	15.69	15.69	0.06	17.00	1.43	PR1a -M4	12.56	12.65	0.1			PR1A +M1	14.44	14.46	0.11	14.52	0.11
PR1A +M-XC1	15.75					PR1a -M4	12.76					PR1A +M1	14.36				
PR1A +M-XC1	15.62					PR1a -M4	12.62					PR1A +M1	14.57				
PR1A +M-XC2	18.52	18.52	0.02			PR1a +M1	18.05	18.05	0.01	17.98	1.09	PR1A +M2	14.47	14.64	0.15		
PR1A +M-XC2	18.49					PR1a +M1	18.05					PR1A +M2	14.72				
PR1A +M-XC2	18.53					PR1a +M1	18.04					PR1A +M2	14.73				
PR1A +M-XC3	16.78	16.78	0.02			PR1a +M2	15.86	15.82	0.11			PR1A +M3	14.65	14.45	0.17		
PR1A +M-XC3	16.79					PR1a +M2	15.7					PR1A +M3	14.32				
PR1A +M-XC3	16.76					PR1a +M2	15.9					PR1A +M3	14.39				
						PR1a +M3	17.88	17.85	0.05								
						PR1a +M3	17.81										
						PR1a +M4	18.1	18.05	0.05								
						PR1a +M4	18										
						PR1a +M4	18.05										
						PR1a -M1	15.81	15.77	0.05	16.23	0.52						

PR1a -M1	15.78					
PR1a -M1	15.72					
PR1 a -M2	16.79	16.8	0.03			
PR1 a -M2	16.83					
PR1 a -M2	16.78					
PR1a -M3	16.07	16.12	0.04			
PR1a -M3	16.14					
PR1a -M3	16.15					
PR1a +M1	18.1	18.1	0.04	17.18	1.32	
PR1a +M1	18.14					
PR1a +M1	18.05					