

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA AP2/ERF  
EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU EFECTO EN  
LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

**PRESENTA**

**M. en C. TANIA BELEN ÁLVAREZ GÓMEZ**

**TUTOR: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ**

**CO-TUTOR: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO**

Cuernavaca, Morelos, 2020

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por la beca otorgada durante el desarrollo de actividades en el periodo que se realizaron los estudios de posgrado del doctorado.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB) y a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Institución que me permitió formar parte del grupo de alumnos del programa de Doctorado en Ciencias Naturales.

Al laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, principalmente a mis tutores de tesis, el Dr. Ramón Suárez Rodríguez y el Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, a quienes considero fueron parte importante en el proceso integral en mi formación y por su apoyo incondicional durante mi estancia, a la M. en C. Nancy por su apoyo en el laboratorio.

Al resto de mis asesores, al Dr. Mario Ramírez Yáñez del Centro de Ciencias Genómicas (CCG), al Dr. Edgar Martínez Fernández del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) y el Dr. Edgar Dantán González del CeIB por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis, sus opiniones y consejos, así como su apoyo en sus laboratorios.

A mis compañeras de laboratorio, Saraí Castro, Dulce Gallardo, Guadalupe Castillo en quienes conocí grandes personas y amigas.

A Samantha Navarro por su amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

## **Dedicatoria**

Este trabajo está dedicado a la gran familia que tengo, a cada uno de ellos que estuvo presente siempre con las mejores palabras de apoyo.

En especial:

A mis padres Bernabé y Carolina, quienes siempre han estado en cada paso, por su apoyo para conseguir todo aquello que me proponga y a quienes agradezco infinitamente todo.

A mis hermanos Citlalli, Jimena y Bernabé, por su apoyo y palabras de aliento, a quienes admiro y motivan a seguir mis sueños y metas.

A Luis por ser quien ha estado a mi lado en cada paso, por su amor, paciencia y motivación para continuar.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	8
<b>1.1. Tomate</b>	8
1.1.1. Descripción general del tomate	8
1.1.2. Tomate como modelo de estudio	9
<b>1.2. Producción de tomate</b>	10
1.2.1. Producción nacional	10
1.2.2. Producción mundial de tomate	12
<b>1.3. Problemática</b>	13
<b>1.4. Estrés en plantas</b>	15
1.4.1. Estrés abiótico	16
1.4.2. Estrés biótico	18
<b>1.5. Respuesta de la planta ante el estrés</b>	21
<b>1.6. Factores de transcripción</b>	26
1.6.1. Factores de transcripción AP2/ERF	28
1.6.2. Factores de transcripción ERF	30
1.6.3. Factores de transcripción como herramientas biotecnológicas	32
<b>2. Justificación</b>	36
<b>3. Hipótesis</b>	37
<b>4. Objetivo general</b>	37
4.1. Objetivos específicos	37
<b>5. Materiales y Métodos</b>	38
5.1. Material	38
5.2. Análisis de expresión de los factores ERF1, ERF3b y ERF5 en planta silvestre	38
5.3. Construcción de plásmidos	38
5.4. Análisis filogenético	41
5.5. Transformación genética de tomate	41
5.6. Extracción de ADN	43
5.7. Análisis molecular de plantas de tomate	44
5.8. Extracción de ARN y síntesis de cDNA	44
5.9. Análisis de expresión	46
5.10. Pruebas de germinación de semillas de tomate	46
5.11. Prueba de estrés en plantas de tomate	46
5.12. Determinación del contenido de clorofila en plantas de tomate	47
5.13. Determinación del contenido de Malondialdehído (MDA) en plantas de tomate	47
5.14. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> e infección en hojas de tomate	48
<b>6. Resultados</b>	49
6.1. Análisis de expresión espacio-temporal de ERF en plantas silvestres de tomate en diferentes tratamientos	49

6.2.	Construcción de plásmidos -----	52
6.3.	Análisis filogenético -----	55
6.4.	Transformación genética de cotiledones de tomate -----	56
6.5.	Análisis molecular de las plantas transgénicas -----	57
6.6.	Segregación de líneas transgénicas de tomate -----	59
6.6.1.	Características fenotípicas de líneas transgénicas homocigas -----	63
6.7.	Análisis de expresión de factores ERF y genes blanco -----	66
6.8.	Evaluación de la germinación en condiciones de estrés de líneas transgénicas -----	67
6.9.	Efecto de la sobreexpresión de ERF3b y ERF5 en condiciones de estrés -----	71
6.9.1.	Determinación del contenido de clorofila y MDA en condiciones de estrés -----	72
6.9.2.	Análisis de tolerancia al herbicida Paraquat -----	76
6.9.3.	Análisis de tolerancia a la infección de <i>B. cinerea</i> -----	78
7.	<b>Discusión de Resultados</b> -----	79
7.1.	Expresión espacio-temporal de factores ERF en diferentes tratamientos de estrés en plantas silvestre de tomate -----	79
7.2.	Características de líneas transgénicas -----	81
7.3.	Efecto de la germinación en condiciones de estrés -----	83
7.4.	Efecto del estrés en líneas transgénicas comparadas con la línea WT -----	86
7.4.1.	Contenido de clorofila en condiciones de estrés -----	86
7.4.2.	Contenido de MDA en condiciones de estrés -----	88
7.4.3.	Tolerancia al herbicida Paraquat -----	90
7.4.4.	Tolerancia a la infección de <i>B. cinerea</i> -----	91
8.	<b>Conclusiones</b> -----	94
9.	<b>Perspectivas</b> -----	95
10.	<b>Referencias bibliográficas</b> -----	95
11.	<b>Anexos</b> -----	111
11.1.	Secuencia nucleotídica de los factores ERF (Genbank)-----	111
11.2.	Secuencias ERF de <i>S. lycopersicum</i> cv. Ailsa Craig obtenidas mediante secuenciación-----	112
11.3.	Resultado del análisis tipo Blast a partir de secuencias obtenidas de la unidad de secuenciación -----	115
11.4.	Proceso de transformación de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Ailsa Craig) -----	119

## Índice de figuras

1. Planta de tomate -----	9
2. Principales estados productores de tomate en México -----	11
3. Rendimiento de la producción de tomate por hectárea cosechada de los principales estados productores -----	12
4. Principales países productores de tomate -----	13
5. Curva generalizada para la respuesta dado por un proceso biológico expuesto a diferentes intensidades de un factor ambiental -----	14
6. Balance de la respuesta inmune y costo de adaptación del estado físico de la planta -----	21
7. Modelo ilustrativo de la percepción de diferentes estímulos que pueden activar receptores para dar lugar a una respuesta -----	22
8. Red hormonal de vías de señalización y comunicación cruzada de ABA, SA, JA, ET en respuesta de defensa en plantas -----	25
9. Representación de la interacción de los factores de transcripción con proteínas reguladoras al unirse en un elemento en <i>cis</i> en la secuencia promotora de un gen blanco -----	27
10. Vía de señalización general que involucra la respuesta de defensa en plantas -----	28
11. Niveles de expresión espacio-temporal (tratamiento/control) de los factores de transcripción ERF bajo condiciones de deshidratación, salinidad y trehalosa exógena en plantas silvestres de tomate de dos semanas -----	50
12. Amplificación de los factores ERF a partir de DNA de tomate silvestre cv. Ailsa Craig -----	52
13. Patrón de restricción de los plásmidos de los diferentes ERF, por la liberación del gen ligado en un vector de clonación -----	53
14. Análisis de restricción y amplificación de los vectores de transformación -----	54
15. Árbol filogenético de factores ERF de <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Arabidopsis</i> -----	55
16. Planta de tomate transformada genéticamente mediada por <i>A. tumefaciens</i> -----	57
17. Amplificación por PCR del gen de resistencia a kanamicina <i>NPTII</i> en	

plantas de diferentes líneas transgénicas -----	58
18. Representación del T-DNA para cada uno de los factores de transcripción y sitios de anclaje de los cebadores -----	58
19. Amplificación por PCR del fragmento AMV-ERF (ERF1/3b/5) a partir de DNA genómico de plantas de diferentes líneas transgénicas de tomate y WT -----	59
20. Características de líneas transgénicas de tomate ERF1 -----	60
21. Fenotipo de plantas seleccionadas como línea homocigas transformadas con el gen <i>ERF1</i> -----	61
22. Análisis de expresión mediante RT-PCR de plantas de la línea L1ERF1 --	62
23. Inserción de T-DNA en las líneas transgénicas ERF3b y ERF5 -----	63
24. Características fenotípicas de frutos de tomate de líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre -----	64
25. Características fenotípicas de las líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre -----	65
26. Expresión relativa de factores ERF y genes blanco ( <i>P5CS</i> y <i>APx</i> ) de líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre -----	67
27. Efecto de la germinación en semillas de las líneas transgénicas comparadas con la línea silvestre -----	69
28. Efecto del estrés abiótico (salinidad y sequía) en el contenido de clorofila y MDA en plantas transgénicas ERF en comparación con la línea silvestre ----	74
29. Secuencia del efecto de tolerancia del herbicida Paraquat en líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre -----	77
30. Tolerancia a la infección de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas transgénicas comparadas con la línea silvestre -----	78

## Índice de tablas

1. Valor nutricional de tomate rojo fresco -----	8
2. Secuencia específica de oligonucleótidos -----	39
3. Medio de cultivo para la transformación genética de tomate -----	42
4. Transformación de cotiledones de tomate -----	56

# 1. Introducción

## 1.1. Tomate

El tomate es una planta originaria de América del Sur, domesticada principalmente en México, contiene una gran fuente de nutrientes importantes como vitamina A y C, así como enzimas antioxidantes (Tabla 1) (Gerszberg *et al.*, 2014; Bergougnoux, 2014). Su consumo se realiza en fresco, así como procesado (Candar-Cakir *et al.*, 2016); es considerado uno de los principales productos agroalimentarios de exportación, así como el séptimo producto agrícola de importancia a nivel mundial (después del maíz, arroz, trigo, papa y la yuca) y es el segundo producto vegetal después de la papa (SIAP-SAGARPA, 2012; Bergougnoux, 2014).

<b>Tabla 1. Valor nutricional de tomate rojo fresco 100g</b>			
(Bergougnoux, 2014-USDA)			
Agua		94.52g	
Energía		18kcal	
Proteína		0.88g	
Carbohidratos		2.63g	
<b>MINERALES</b>		<b>VITAMINAS</b>	
-Calcio	10mg	-Vitamina C	13.7mg
-Magnesio	11mg	-Colina	6.7mg
-Fosforo	24mg	-Vitamina A	42µg
-Potasio	237mg	-α-Caroteno	449µg
-Sodio	5mg	-β-Caroteno	101µg
-Fluoruro	2.3µg	-Licopeno	2573µg
		-Luteína + zeaxantina	123µg
		-Vitamina K	7.9µg

### 1.1.1. Descripción general del tomate

El tomate pertenece a la familia Solanaceae que alberga más de 3000 especies que incluye plantas de importancia económica como la papa, chile, berenjena, petunia y tabaco (Bergougnoux, 2014); es una planta herbácea perenne, de

crecimiento determinado y ramificación simpodial, presenta, además, hojas pecioladas, compuestas, de color verde en el haz y envés de color grisáceo, su tamaño depende de las características genéticas de cada variedad. Las flores son hermafroditas y regulares, se presentan formando inflorescencia, está formada por un pedúnculo corto, con un cáliz compuesto de cinco a seis sépalos y la corola con cinco o seis pétalos amarillos. El fruto es carnoso, ovalado, succulento y fragante, con cavidades o lóculos internos variables (Figura 1). La semilla es aplanada y de forma lenticelar, el sistema radicular está constituido por raíz principal, raíces secundarias y adventicias, que se extienden superficialmente sobre un diámetro de 1.5m y más de 0.5m de profundidad; sin embargo, el 70% de las raíces se localizan a menos de 0.2m de la superficie (CENTA Guía tomate, SAGARPA, 2012).

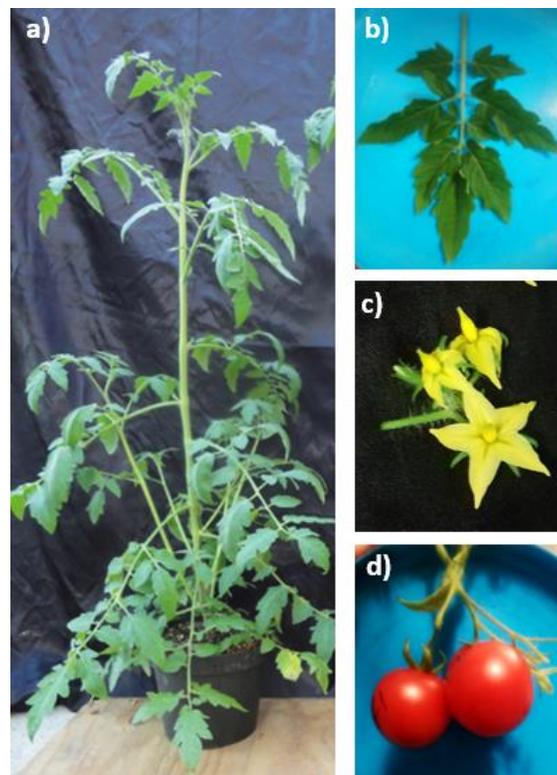


Figura 1 Planta de tomate. a) Planta de tomate adulta, b) hoja compuesta, c) flor, d) fruto.

### **1.1.2. Tomate como modelo de estudio**

El tomate es uno de los principales cultivos agrícolas como fuente de alimentación, económicamente importante a nivel mundial, y es considerado un sistema modelo predominante para estudios genéticos en plantas, es la especie de la familia Solanaceae más intensamente utilizada para investigación, presenta características significativas a diferencia de otras plantas modelo como lo es Arabidopsis, el arroz, el trigo entre otras, la planta de tomate produce frutos frescos (denominadas botánicamente como bayas), ramificación simpodial y es el único modelo de plantas con hojas compuestas; otras razones incluyen el fácil manejo de cultivo en un amplio rango de ambientes, presenta un ciclo de vida corto, además de que se cuenta con tecnología para su transformación genética, así como la disponibilidad de fuentes de información; es un organismo diploide con un genoma relativamente pequeño (950Mbp) con 12 pares de cromosomas que codifican aproximadamente 38,000 genes, carece de duplicación de genes, tiene la habilidad de desarrollar haploides, así como un amplio rango de mutantes, presenta insensibilidad al fotoperiodo, alta autofertilización y homocigosis, buen potencial reproductivo, fácil control de polinización e hibridación, así como el estudio del desarrollo de frutos y la generación de bases de datos genéticos (Foolad, 2007; Barone *et al.*, 2008; Kimura y Neelima, 2008; Liu *et al.*, 2016, Sol Genomics Network, 2018).

## **1.2. Producción de tomate**

### **1.2.1. Producción nacional**

La producción total de tomate en México para el año agrícola 2017 alcanzó un total de 3,055,861 tn, destacándose 10 estados productores, Sinaloa posicionándose en el primer lugar con una producción de 744,824 tn y un rendimiento del 57.38 tn/ha, en segundo lugar, San Luis Potosí y en el tercer puesto Michoacán con una producción de 334,054 y 211,100 tn respectivamente,

continuando con Zacatecas, Jalisco, Baja California, Puebla, Sonora, Morelos y México (Figura 2) (SIAP-SAGARPA, 2018).

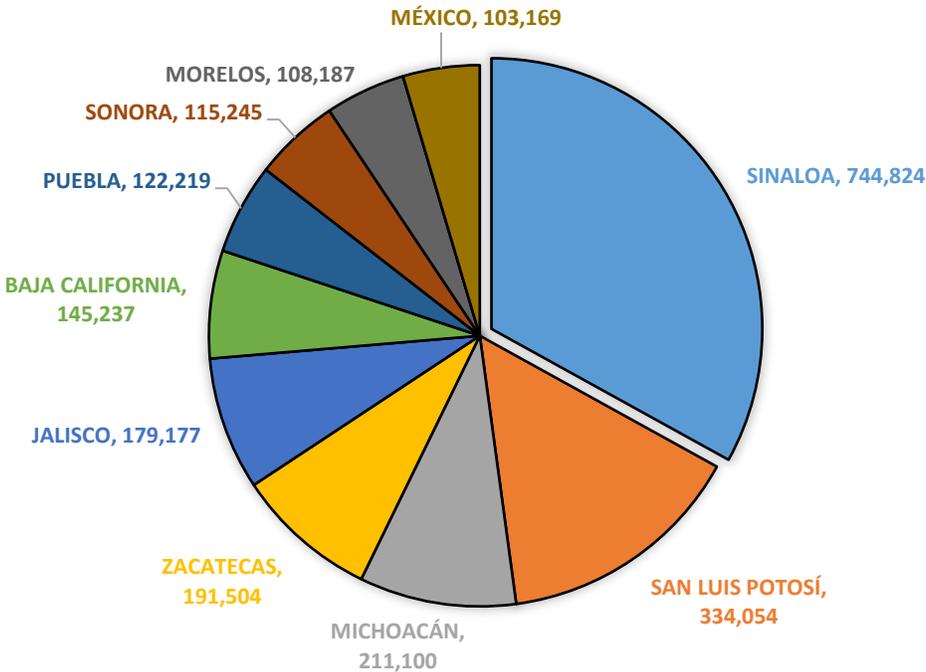


Figura 2 Principales estados productores de tomate en México. SIAP, año agrícola-2017. Datos expresados en toneladas. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do).

A nivel nacional, el rendimiento total de la producción de tomate por hectárea cosechada alcanzó 64.832 tn/ha. De los principales estados productores, Puebla obtuvo el mayor rendimiento de producción con 145.917 tn/ha, mientras que Michoacán presentó el menor rendimiento con 36.382 tn/ha (Figura 3), sin embargo, el estado con mayor rendimiento en la producción fue Querétaro con un rendimiento de 404.002 tn/ha y una producción de 103.061 toneladas; cabe destacar que 17 estados presentan rendimientos por debajo del promedio, lo que realmente resulta conocer la problemática al obtener un menor rendimiento (SIAP-SAGARPA, 2018).

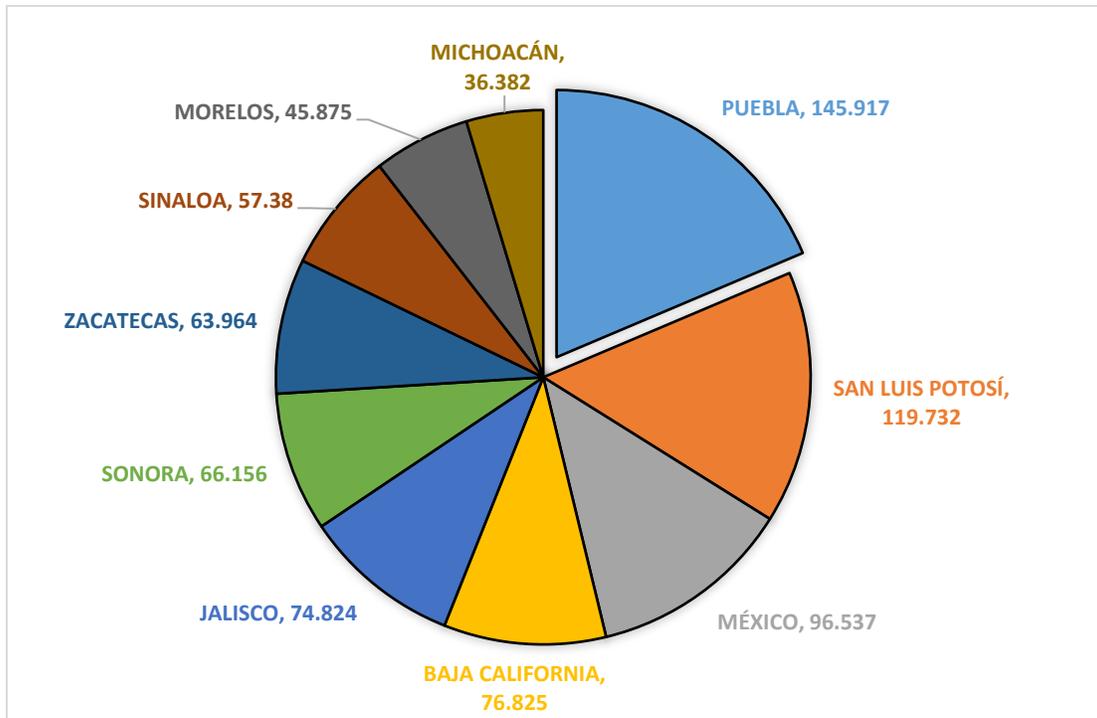


Figura 3 Rendimiento de la producción de tomate por hectárea cosechada de los principales estados productores. Datos expresados en Toneladas/Hectárea. SIAP, año agrícola 2017.

### 1.2.2. Producción mundial de tomate

A nivel mundial el tomate para el año 2016 alcanzó una producción de 233,466,175 toneladas, siendo los principales países productores China, seguido de India, EUA y Turquía. México se encuentra en el décimo lugar con una producción de alrededor de 4,047,171 toneladas (Figura 4) (FAOSTAT, 2018).

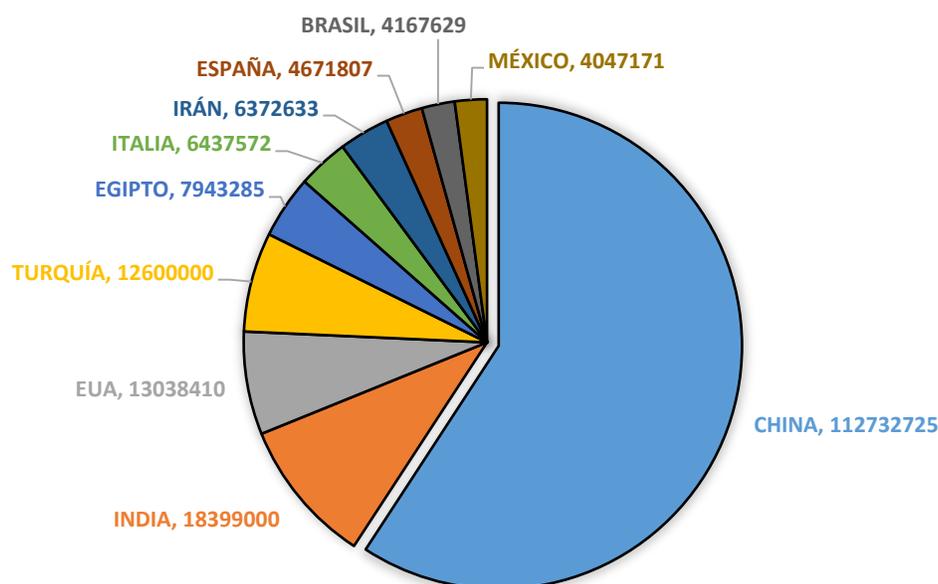


Figura 4 Principales países productores de tomate. Datos expresados en toneladas. FAOSTAT, año agrícola 2016. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.

### 1.3. Problemática

Las plantas son organismos sésiles que carecen de mecanismos de escape a condiciones adversas y se encuentran continuamente afectadas por una gran diversidad de factores ambientales que, dependiendo de su efecto en cuanto a la cantidad e intensidad, resulta en una interacción que puede ser benéfica o perjudicial. Los factores ambientales se han clasificado en dos tipos; los factores bióticos que resultan directa o indirectamente de la interacción con otros organismos vivos (patógenos, herbívoros, parásitos, insectos y otras plantas) y factores abióticos aquellos que se originan de la experiencia de condiciones físicas, químicas y de energía (temperatura, luz, minerales, agua, entre otros). Para un crecimiento óptimo, las plantas requieren de estos factores ambientales en cada etapa de desarrollo, sin embargo, cualquier desviación de las condiciones óptimas externas, un exceso o deficiencia química o física, afecta de manera adversa el crecimiento, desarrollo y productividad de la planta (Figura 5) (Hans-Werner *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2016).

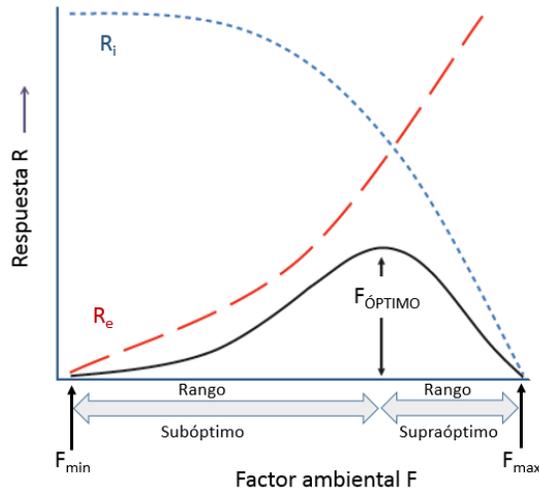


Figura 5 Curva generalizada para la respuesta (R) dado por un proceso biológico expuesto a diferentes intensidades de un factor ambiental (F). Ri: respuesta inhibitoria (línea punteada azul), Re: respuesta estimuladora (línea punteada roja). Tomado y modificado de Hans-Werner *et al.*, 2012.

Los efectos del cambio climático en la agricultura, como fluctuaciones en la frecuencia e intensidad de la temperatura media, precipitaciones, radiación, presión atmosférica, influye significativamente en los recursos de importancia clave para la producción agrícola, tales como como el suelo, el agua, población y distribución de microorganismos, en consecuencia se intensifican sequías, lluvias, desertificación, enfermedades y brotes en los cultivos afectando la producción de insumos agrícolas (Kurukulasuriya y Rosenthal, 2003).

Evolutivamente las plantas han desarrollado habilidades únicas y sofisticadas para responder ante cualquier estrés ambiental. Aquellas plantas que crecen en condiciones hostiles y además sobreviven, involucran el desarrollo de mecanismos de tolerancia, resistencia o evasión, lo que representa un punto clave de investigación es la identificación de estos mecanismos de respuesta a nivel genético y molecular relacionadas con el estrés en plantas, que permitan realizar modificaciones en las vías involucradas con la respuesta de defensa dirigiendo el objetivo principal al mejoramiento de plantas y obtener cultivos con mayores rendimientos, estabilidad, calidad y mayor tolerancia ante condiciones de estrés (Macedo, 2012).

#### **1.4. Estrés en plantas**

El estrés en el sentido del estado fisiológico es la condición causada por factores que tienden a alterar un equilibrio, en plantas comienza con una restricción dada por componentes ambientales o con fluctuaciones altamente impredecibles impuestas en el patrón metabólico regular, que ocasiona tensión en el sistema. El estrés, se presenta por un exceso o déficit de los factores ambientales, tiene la capacidad de causar lesiones, defectos en el crecimiento y desarrollo, así como enfermedad; deteriora el rendimiento de la función vital, y la respuesta a factores ambientales o defectos genéticos inherentes (Gaspar *et al.*, 2002; Mantri *et al.*, 2012). Factores ambientales adversos incluyen la sequía, salinidad, radiación solar (exceso o altas intensidades de luz), temperaturas extremas, contaminantes como metales pesados o agroquímicos, así como enfermedades (Gechev y Hille, 2012).

Los cultivos agrícolas se enfrentan a una gran diversidad de estos factores y tienen la capacidad de afectar en gran medida el rendimiento en la producción de los cultivos, causando un desbalance en su homeostasis, el cual puede llegar o no a ser compensado. El estrés que se ha impuesto en un sistema biológico induce una respuesta con diversos cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos negativos que ponen en riesgo la forma vital del organismo, sin embargo, las plantas tienen la capacidad de hacerle frente a estos cambios a partir de mecanismos altamente desarrollados que le permiten sobrevivir a los cambios fluctuantes presentes en el medio ambiente (Gechev y Hille, 2012; Sewelam *et al.*, 2016). A partir de esto se requiere conocer los efectos que se inducen en las plantas en condiciones estresantes y entender los mecanismos de respuesta que realiza para su defensa y así establecer propuestas que permitan combatir los efectos negativos dadas por las condiciones adversas.

### 1.4.1. Estrés abiótico

El estrés abiótico es ocasionado por factores fisicoquímicos, los principales factores son; temperaturas extremas (calor, frío y congelamiento), muy alta o muy baja irradiación, anegamiento, sequía, nutrientes, minerales inadecuados en el suelo, entre otros (Koyro *et al.*, 2012; Lokhande y Suprasanna, 2012), que influyen negativamente en la supervivencia, la producción y el rendimiento de los cultivos hasta en un 70%, por lo que representan una amenaza en la producción de alimentos a nivel mundial (Mantri *et al.*, 2012). El estrés abiótico dado por déficit hídrico, salinización y temperaturas extremas son los tipos de estrés que limitan en mayor medida el crecimiento y la productividad de los cultivos (Golldack *et al.*, 2011). Se estima que el 45% de suelos agrícolas a nivel mundial experimenta casos de sequía y un 19% es afectado por la salinidad (Koyro *et al.*, 2012), se ha señalado además una alta expectativa para la generación de una grave salinización en tierras cultivables para el año 2050 (Vinocur y Altman, 2005).

El déficit hídrico puede definirse como una situación donde el potencial hídrico y el turgor en plantas se reduce considerablemente para interferir con las funciones vitales (Shao *et al.*, 2008). El estrés hídrico se caracteriza por la reducción en el contenido de agua, la turgencia, el potencial hídrico, el cierre de estomas limitando el intercambio de gases, la disminución en la división y diferenciación celular, la reducción del volumen citosólico, mientras que un estrés progresivo afecta procesos celulares fisiológicos y bioquímicos como la fotosíntesis, causa una alteración en el metabolismo, toma de iones, carbohidratos, nutrientes, así como hormonas y finalmente la muerte (Shao *et al.*, 2008; Cominelli *et al.*, 2013).

Gran parte de los suelos agrícolas que han sido fuertemente irrigados son altamente salinos, se ha demostrado que, en consecuencia, altas concentraciones de sales particularmente de sodio ( $\text{Na}^+$ ) altera la estructura del suelo, disminuyendo su porosidad, capacidad de aeración y conductividad del agua, esto además genera un bajo potencial hídrico en el suelo lo que incrementa la dificultad de las plantas para la adquisición de agua y nutrientes ocasionado un estrés (Mahajan y Tuteja, 2005). Un suelo es considerado salino cuando la conductividad

eléctrica de la zona de la raíz excede ~40mM de NaCl a 25°C y presenta un intercambio de Na<sup>+</sup> del 15% (Das y Strasser, 2013). Se estima que a nivel mundial aproximadamente 800 millones de hectáreas presentan condiciones de salinidad (Cortés y del Real, 2007).

Altas concentraciones de sales, causa estrés osmótico e iónico en las plantas, afectando adversamente su crecimiento y desarrollo en dos fases (Han *et al.*, 2015). Durante la fase inicial, el estrés osmótico predomina e induce estrés hídrico, e induce diversas respuestas fisiológicas como ruptura de membranas, acumulación de solutos compatibles, cierre de estomas y una reducción de la asimilación del carbono (Albacete *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2015). Durante la segunda fase, la entrada directa y excesiva de iones de sodio (Na<sup>+</sup>) y cloro (Cl<sup>-</sup>) dentro de las células por los canales de iones y transportadores inhibe la absorción de minerales vitales lo que resulta en una toxicidad iónica y en un desequilibrio de nutrientes, además desencadena un estrés oxidativo debido a un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS por su siglas en inglés, Reactive Oxigen Species) lo que ocasiona desorganización en las membranas, inhibición de la división y expansión celular, así como una reducción de la fotosíntesis (Albacete *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2015; Mahajan y Tuteja, 2005). El estrés salino inhibe el crecimiento y desarrollo de las plantas, desencadenando una muerte celular programada, dando lugar a un bajo rendimiento o pérdida total de la producción de cultivo (Das y Strasser, 2013).

Temperaturas extremas pueden afectar significativamente el proceso de vida de todos los organismos. El calentamiento global, resultado del cambio climático, deriva en un daño devastador para la producción de los cultivos (Ohama *et al.*, 2017). La temperatura controla el ritmo de los procesos metabólicos de las plantas, que influye directamente en la producción de biomasa y rendimiento (Teixeira *et al.*, 2013). Altas temperaturas ocasionan estrés por calor, esto además de incrementar el riesgo de sequía en los cultivos, limita la tasa fotosintética, y reduce la intercepción de la luz lo que promueve una aceleración en el desarrollo fenológico de la planta, principalmente la polinización (Teixeira *et al.*, 2013;

Hatfield y Prueger, 2015; Prasad *et al.*, 2017). Se ha determinado que temperaturas que oscilan entre 30 y 40°C resultan perjudiciales para un gran número de cultivos en etapas reproductivas afectando la viabilidad del polen, fertilización y la formación de granos y frutos (Prasad *et al.*, 2017; Hatfield y Prueger, 2015) y en la mayoría de las especies la tasa fotosintética decae cerca de los 35°C (Redondo-Gómez, 2013).

En cuanto al estrés dado por bajas temperaturas, este ocurre cerca a los 0°C y por debajo de esta (Redondo-Gómez, 2013). Su efecto o intensidad del estrés dependerá del grado de severidad y la duración de su exposición, pues se ha reportado la presencia de lesiones por bajas temperatura entre los 15 y 0°C, siendo la etapa de germinación de una planta la más susceptible a esta condición, con síntomas como lesiones superficiales, deshidratación, decoloración y descomposición de los tejidos, senescencia acelerada, entre otros (Sharma *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. Estrés biótico**

El estrés biótico en plantas es ocasionado por organismos vivos, que pueden ser microorganismos patógenos, insectos y nematodos herbívoros, así como otras plantas (Pye *et al.*, 2013). Cabe destacar que este tipo de estrés se encuentra altamente relacionado con factores abióticos ya que estos pueden influir de manera importante en el comportamiento, morfología, abundancia, ciclo de vida y por lo tanto en su interacción y susceptibilidad (Chakraborty, 2005; Kissoudi *et al.*, 2014).

La relación que resulta en la interacción de la planta con algún microorganismo hogos o bacterias puede ser benéfica, neutra o perjudicial, por lo que es importante para la planta reconocer y clasificar la interacción, y así modular la respuesta para establecer una relación positiva o negativa y desencadenar mecanismos de defensa (Moënne-Loccoz, 2015).

Los microorganismos patógenos que establecen una relación perjudicial para las plantas pueden clasificarse en función a su forma de nutrición. Los organismos biotróficos penetran la pared celular, colonizando los espacios intracelulares utilizando estructuras de alimentación que permiten la absorción de nutrientes sin afectar la membrana plasmática, empleando mecanismos altamente regulados que permiten invadir al hospedero impidiendo su detección, lo que resulta de un efectivo balance de factores de virulencia y patogenicidad (Laluk y Mengiste, 2010; Cao *et al.*, 2011). En contraste, los organismos necrotróficos presentan estrategias de patogénesis altamente destructivas, que derivan en una extensa necrosis, maceración y pudrición de tejidos, gracias a la secreción de agentes fitotóxicos y enzimas que degradan la pared celular antes y durante la colonización (Laluk y Mengiste, 2010; De Wit, 2007). Un tercer grupo, son los organismos hemibiotróficos, los cuales presentan un comportamiento biotrófico y necrotrófico que depende del estado de su ciclo de vida, así como de las condiciones ambientales (Cao *et al.*, 2011).

Los microorganismos necrotróficos son considerados los patógenos más perjudiciales para los cultivos, durante el desarrollo de su enfermedad ocasionan el mayor impacto económico en la producción, por ejemplo, se estiman pérdidas de hasta 200 millones de dólares anuales por la infección de *Sclerotinia sclerotiorum* agente causal del moho blanco y de 10-100 billones de euros anuales por la infección *Botrytis cinerea* en diferentes cultivos (Laluk y Mengiste, 2010).

Cabe destacar que las plantas tienen la capacidad para reconocer un gran número de patógenos a través de señales moleculares asociados con el patógeno y que responde con la reprogramación del sistema de defensa debido al despliegue de señales (Anil *et al.*, 2014). Interacciones planta-patógeno se han estudiado ampliamente en los últimos años, describiendo dos tipos de interacciones de acuerdo a la respuesta inmune que se presenta: la interacción compatible donde la planta es incapaz de montar una respuesta de defensa eficaz, permitiendo que el patógeno se establezca para completar su ciclo de vida; y en la interacción

incompatible, la planta desencadena una serie de respuestas de defensa para prevenir el establecimiento y crecimiento del patógeno (Lodha y Basak, 2012).

El sistema inmune innato en plantas se basa en el uso de receptores de reconocimiento de proteínas (PRRs, por sus siglas en inglés Protein Recognition Receptors) para la detección de moléculas específicas de patógenos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés Pathogen-Assoiated Molecular Patterns), esta respuesta de defensa es llamada inmunidad desencadenada por PAMP (PTI, por sus siglas en inglés, PAMP-Tripped Immunity (Denancé *et al.*, 2013). Los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos capaces de evadir su reconocimiento, al segregar proteínas efectoras que permiten evadir la respuesta PTI y por lo tanto la primera línea de defensa en plantas, sin embargo las plantas para defenderse han desarrollado una línea de defensa secundaria que se activa al reconocer las proteínas efectoras por proteínas de resistencia que desencadenan una respuesta de defensa secundaria que culmina en una respuesta de hipersensibilidad localizada que da lugar a una muerte celular programada, asociada con la respuesta de defensa inducida que bloquea el crecimiento del patógeno (De Wit, 2007; Denancé *et al.*, 2013; Anil *et al.*, 2013).

Los microorganismos patógenos son reconocidos como una fuerza que influye en la estructura, función y dinámica en las plantas; y el desencadenar una respuesta de defensa dispara de manera significativa un incremento en la demanda de una fuente de esqueletos de carbono y nitrógeno, así como de ATP (Adenosín Trifosfato) y NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) para la síntesis de proteínas y metabolitos relacionados con la defensa, comprometiendo el estado físico de la planta por el desvío de recursos para el crecimiento, nutrición y desarrollo por compuestos de defensa (Figura 6) (Park *et al.*, 2015; Moënnelocoz, 2015).

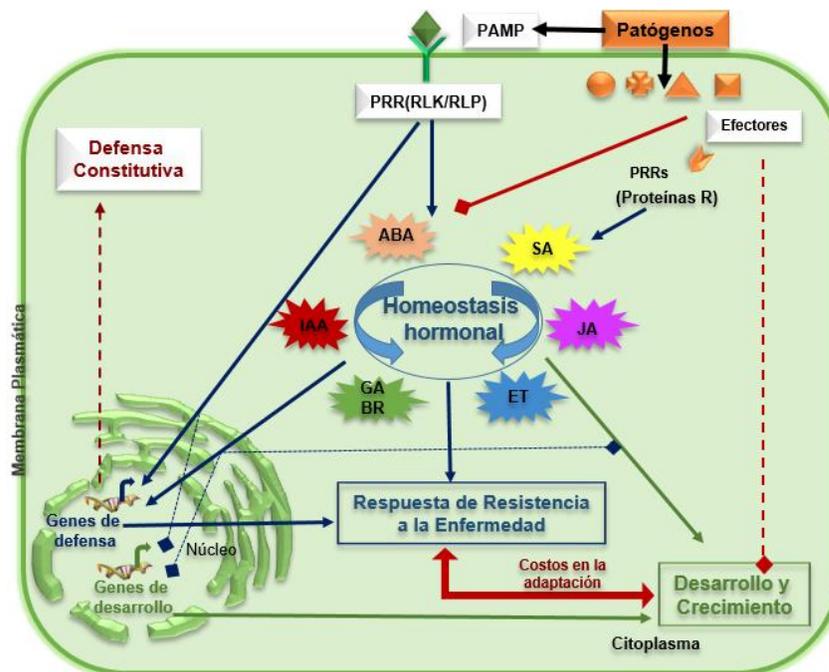


Figura 6 Balance de la respuesta inmune y costo de adaptación del estado físico de la planta. Tomado y modificado de Denancé *et al.*, 2013.

### 1.5. Respuesta de la planta ante el estrés

Las plantas se caracterizan por vivir en ambientes que presentan diferentes tipos de ambientes (Santino *et al.*, 2013) lo que ha permitido a través de la evolución desarrollar mecanismos únicos y sofisticados en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Macedo, 2012), estos mecanismos se activan en respuesta a la percepción de estímulos externos y trabajan en conjunto para disminuir y/o limitar el daño ocasionado y facilitar la recuperación del sistema que ha sido deteriorado, para que esto sea posible se inducen cambios fisiológicos y bioquímicos, así como en los patrones anatómicos y del desarrollo (Cao *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Patakas, 2012; Atkinson *et al.*, 2013).

Los mecanismos de señalización desempeñan un papel crucial e indispensable al actuar como nexo en la unión entre la detección del factor estresante y en generar una respuesta fisiológica y bioquímica apropiada, tomando en cuenta que la respuesta final conlleva un gran número de componentes subyacentes de mecanismos de señalización que incluyen un alto grado de conectividad y

complejidad (Verma *et al.*, 2013; Sewelam *et al.*, 2016). Las plantas integran en todas sus células sistemas de señalización de largo alcance, se despliega mediante una red dinámica no lineal con diversas ramificaciones que presentan un alto grado de interconectividad, diversos niveles espacio-temporal y comunicación cruzada en las diversas vías de transducción de señales (Figura 7) (Singh y Viridi, 2013; Sewelam *et al.*, 2016).

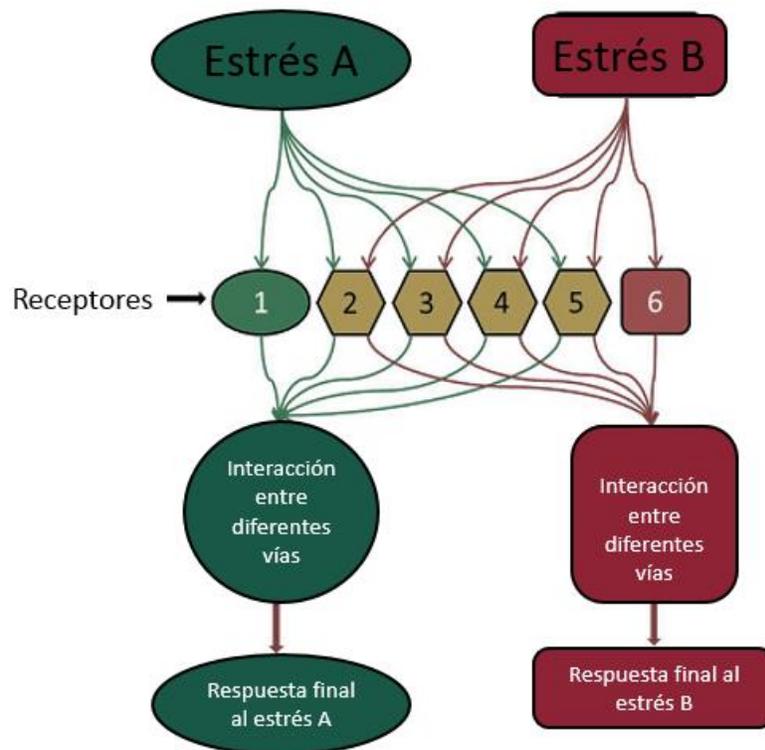


Figura 7 Modelo ilustrativo de la percepción de diferentes estímulos que pueden activar receptores para dar lugar a una respuesta. Tomado y modificado de Sewelam *et al.*, 2016.

Las vías de transducción inician con la percepción de estímulos de factores externos por sensores que son proteínas receptoras localizadas en la superficie celular y que transmiten la señal a elementos blanco de la cascada de señalización, estos elementos son mensajeros moleculares que transducen las señales incrementando su concentración espacio-temporal para una rápida transmisión en forma local y sistémica como el calcio ( $Ca^{2+}$ ), las especies

reactivas de oxígeno (ROS), activación de cinasas y fosfatasas, así como un aumento en las concentraciones de fitohormonas (Singh y Viridi, 2013; Nguyen *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2016, Gilroy *et al.*, 2016). El  $\text{Ca}^{2+}$  es el segundo mensajero más estudiado en la transducción de señales, pues se ha reportado que al activar los sensores de calcio estos se pueden unir a elementos en *cis* en secuencias promotoras de genes de respuesta al estrés e incluso interactuar con proteínas de unión al DNA para regular la activación o supresión de esos genes (Singh y Viridi, 2013; Verma *et al.*, 2016).

Las ROS (anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) presenta un papel dual en la planta, se requieren para importantes de reacciones de señalización, sin embargo, pueden resultar ser subproductos altamente tóxicos (Mittler, 2016). Como moléculas de señalización son versátiles, operan a través de reacciones químicas con residuos específicos de proteínas diana que conducen a modificaciones de proteínas covalentes, cinasas citosólicas, fosfatasas y desencadenar una amplia gama de cambios transcripcionales (Foyer y Noctor, 2013; Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016). Debido a que presentan diversas propiedades que incluyen diferentes niveles de reactividad, sitios de producción y tienen la capacidad de cruzar las membranas biológicas, pueden iniciar e integrarse a las redes de señalización y así regular un amplia gama de procesos, como desarrollo, diferenciación, niveles redox, señalización por estrés, interacción con otros organismos, respuestas sistémicas y muerte celular (Mittler, 2016; Foyer y Noctor, 2013), tomando en cuenta que cada ROS es capaz de propagar la señal a través de distintos compartimientos específicos interconectados, estos eventos, además se encuentran estrechamente relacionados con la respuesta, señalización y síntesis de hormonas (Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016).

Las fitohormonas son elementos clave en la regulación de las vías de señalización, se sintetizan en bajas concentraciones y controlan diversos eventos en todo el ciclo de vida de las plantas que van desde patrones de desarrollo, identidad, diferenciación celular, así como el crecimiento coordinado de varios

órganos reproductivos y la respuesta al estrés (Kohli *et al.*, 2013; Fonseca *et al.*, 2014). Hasta el momento, se han descrito nueve grupos de fitohormonas que participan en la respuesta de defensa, tal como las auxinas (AUX), giberelinas (GA), citocininas (CK), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), jasmonatos (JA), brasinosteroides (BR) y estrigolactonas (SL) (Fonseca *et al.*, 2014). Diversos estudios se han concentrado en conocer el papel regulatorio que presentan estas hormonas, pues son fundamentales en diversas vías de señalización en respuesta al estrés biótico y abiótico, pues se encuentran altamente relacionadas; generalmente se ha descrito a ABA como responsable de la defensa en contra del estrés abiótico, debido a que en condiciones ambientales como sequía, salinidad, frío y calor desencadenan un incremento en las concentraciones de esta hormona principalmente, en contraste con SA, JA y ET que presentan mayor participación en respuesta al estrés biótico, pues se ha reportado un incremento en sus niveles cuando se presenta una infección por patógenos (Verma *et al.*, 2016). Se ha reportado además que SA juega un papel importante en la respuesta de defensa involucrada generalmente en la activación de la respuesta de defensa contra patógenos biotróficos, hemibiotróficos y en el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés Systemic Acquired Resistance), en contraste con JA/ET las cuales se encuentran usualmente asociados con la defensa contra patógenos necrotrofos e insectos herbívoros, además esta vía de defensa es mutuamente antagonista con la vía SA y se han reportado interacciones sinérgicas (Bari y Jones, 2009). Cabe destacar que los mecanismos de respuesta no son exclusivamente de estas hormonas, recientes estudios proveen evidencia de una amplia comunicación cruzada entre ABA, SA, JA, así como ET y AUX, GA y CK, en la respuesta de defensa (Figura 8) (Atkinson *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016).

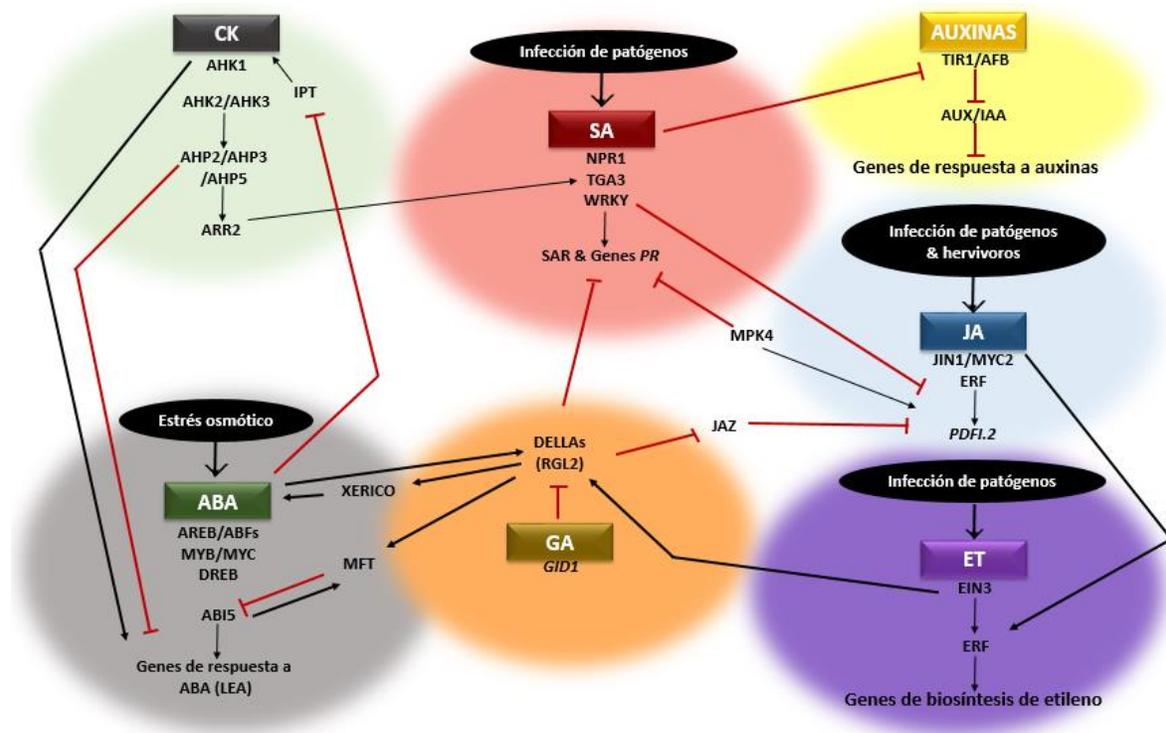


Figura 8 Red hormonal de vías de señalización y comunicación cruzada de ABA, SA, JA, ET en respuesta de defensa en plantas. Tomado y modificado de Verma *et al.*, 2016.

Otro evento importante en el flujo de las vías de señalización son las cascadas de fosforilación, en donde participan las proteínas cinasas como proteínas cinasas relacionadas a Snf1 (SnRKs, por sus siglas en inglés Snf1-Related Kinases, proteínas cinasas dependientes de calcio (CPKs, por sus siglas en inglés (Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinases) y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) (Prasch y Sonnewald, 2015). Las MAPKs son activadas por más de un tipo de estrés, además de diferentes fitohormonas, estas proteínas son altamente conservadas, consideradas componentes reguladores cruciales para la integración de diferentes señales durante la transducción, así como en procesos de crecimiento, diferenciación, proliferación, muerte y estrés (Prasch y Sonnewald, 2015; Tuteja *et al.*, 2007). La cascada MAPK consiste mínimamente en un módulo MAPKKK-MAPKK-MAPK que está conectado entre receptores y objetivos blanco a lo largo de las cascadas de señalización (Nakagami *et al.*, 2005). La activación es

mediada por el receptor de un MAPKKKK que puede ocurrir a través de la interacción física y/o la fosforilación, ya sea por el propio receptor, por factores puente intermedios o por MAPKKKKK interconectados (Nakagami *et al.*, 2005). Después de la activación de MAPK desencadena la activación de factores de transcripción en el núcleo y por lo tanto la activación de genes de respuesta al estrés (Macedo. 2012).

Después, la integración de la señal en la red de regulación es dictada por factores de transcripción y proteínas co-reguladoras asociadas a los complejos transcripcionales, los cuales trabajan en conjunto para decodificar la información de varias maneras que dan lugar a diversos cambios transcripcionales. Esta reprogramación transcripcional en la célula involucra grandes cambios en la expresión de genes a favor de la defensa sobre otros procesos celulares como crecimiento y desarrollo (Buscaill y Rivas, 2014; Tsuda y Somssich, 2015).

## **1.6. Factores de transcripción**

Los factores de transcripción (FT) son proteínas reguladoras que juegan un papel importante en la transducción de señales ya que modulan la expresión mediante la activación o represión de genes específicos a partir de su interacción con sitios de unión en el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) en regiones de acción en *cis*, como las secuencias promotoras o potenciadoras (enhancers), para el control de la expresión de sus genes blanco, además de regular la interacción de diferentes vías de señalización en respuesta a procesos biológicos y su adaptación con el medio ambiente, jugando un papel importante en convertir las señales inducidas en respuestas celulares (Singh y Laxmi, 2015; Inukai *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2011).

Los FT regulan la transcripción de genes involucrados en todas las funciones celulares, lo que significa que tiene un gran impacto en procesos de desarrollo, funciones fisiológicas, respuestas ambientales por la regulación de genes de respuesta al estrés, así como en trayectorias evolutivas de las especies de plantas, lo que los convierte en componentes centrales de un conjunto de

herramientas genéticas que contribuyen a la evolución morfológica, desarrollo y defensa de las plantas (Lehti-Shiu *et al.*, 2016).

Los FT son muy diversos y usualmente se han clasificado en familias que dependen de sus características estructurales y basados en motivos conservados nombrados dominios de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés DNA-Binding Domains) (Liu *et al.*, 1999). Los FT pueden modificar la expresión de genes al influir en la iniciación de la transcripción potenciando o inhibiendo el reclutamiento de complejo de la RNA polimerasa II al núcleo promotor por interacciones directas con el complejo o indirectas con los co-reguladores (Figura 9) (Lehti-Shiu *et al.*, 2016).

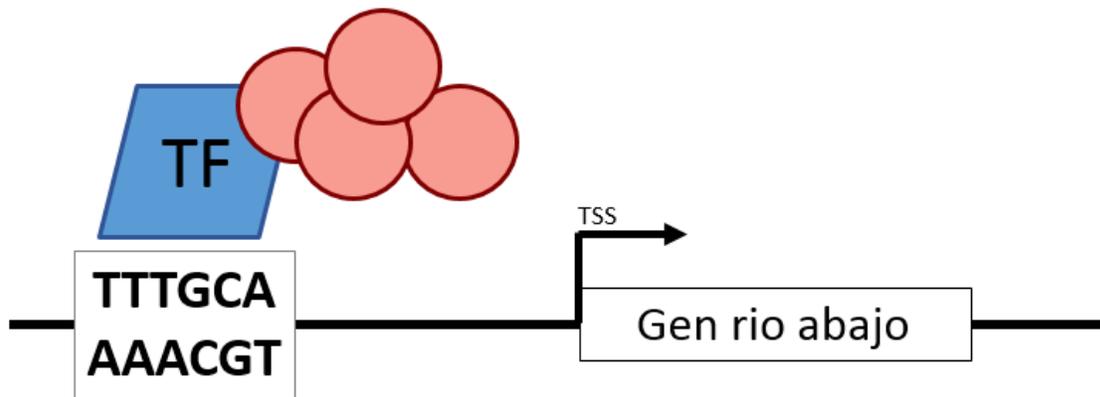


Figura 9 Representación de la interacción de los factores de transcripción con proteínas reguladoras al unirse en un elemento en *cis* en la secuencia promotora de un gen blanco. Tomado y modificado de Lis y Walther, 2016.

En genomas de plantas se sabe que aproximadamente el 7% de las secuencias codificantes están asignados para FT y la mayoría de estos son genes que se inducen en respuesta a diversas condiciones de estrés (Lindemose *et al.*, 2013). Las principales familias de TFs que se encuentran relacionados en la regulación de la respuesta a diversas condiciones de estrés son: WRKY (llamados así por su DBD, una secuencia WRKYGQK), bZIP (basic Leucine Zipper), NAC (NAM/ATAF/CUC), MYB, bHLH (basic Helix-Loop-Helix), y AP2/ERF (Apetala2/Ethylene Response Factor, por sus siglas en inglés) (Figura10) (Chakravarthy *et al.*, 2003; Lindemose *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

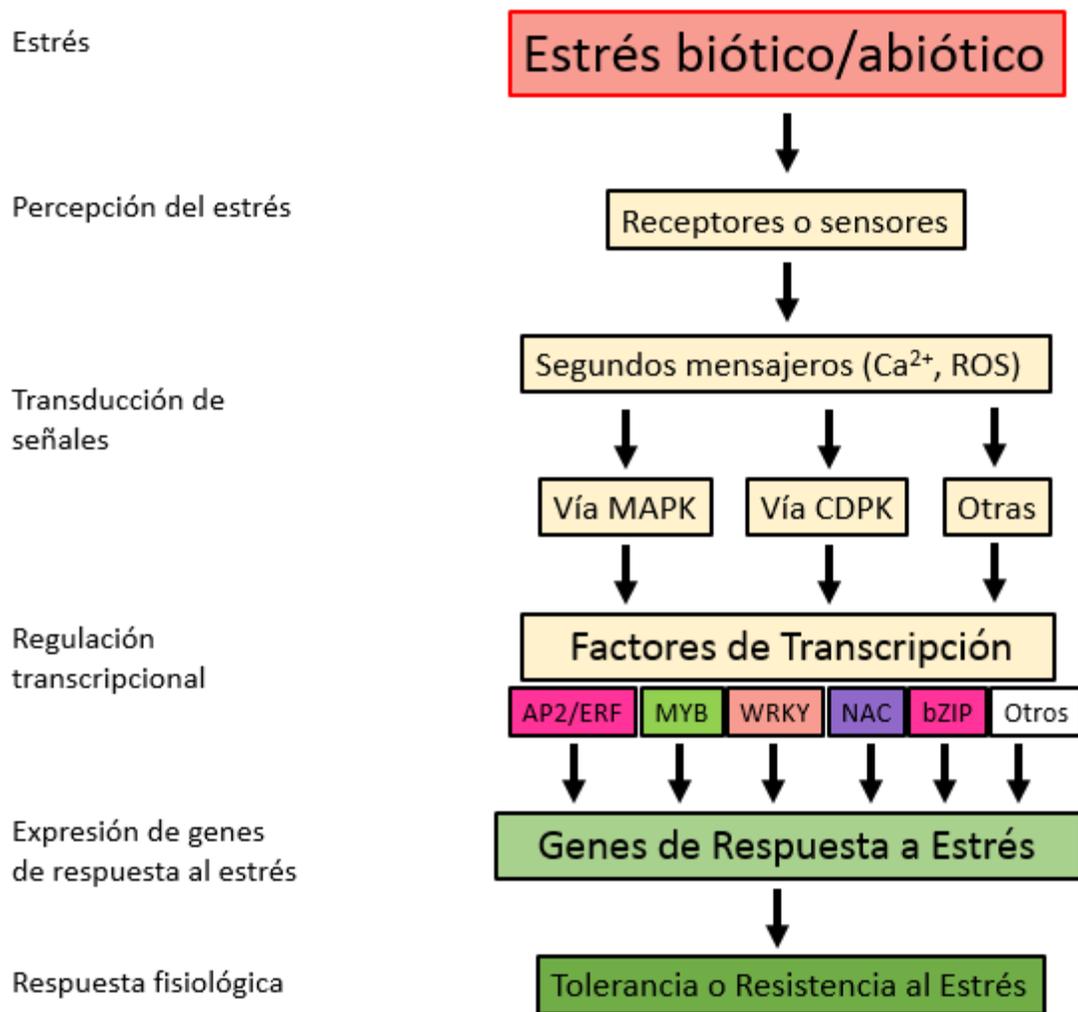


Figura 10 Vía de señalización general que involucra la respuesta de defensa en plantas. Tomado y modificado de Wang *et al.*, 2016.

### 1.6.1. Factores de transcripción AP2/ERF

La familia AP2/ERF de factores de transcripción se caracteriza por la presencia de un dominio AP2/ERF de unión al DNA de 60 aminoácidos que interactúa directamente con elementos de acción *in cis* que se encuentran en las secuencias promotoras de genes blanco, como las cajas GCC (AGCCGCC) y/o DRE/CRT (Dehydration-Responsive Element/C-Repeat Element) (RCCGCC) (Xu *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2017). La caracterización de esta familia por su dominio AP2 ha mostrado su origen por la transferencia horizontal de una endonucleasa bacteriana o viral en la planta en un proceso de transposición y duplicación de genes, que dio

origen a esta familia de factores de transcripción (Magnani *et al.*, 2004), por lo que se ha supuesto que un amplio grupo de miembros con una sola copia del dominio AP2 carecen de intrones (Nakano *et al.*, 2006).

Este dominio AP2/ERF contiene dos elementos conservados, el primero denominado YRG que se encuentra cerca de la región N-terminal del dominio que incluye cerca de 20 aminoácidos de naturaleza básica y que está involucrado en la actividad de unión al DNA; el segundo elemento RAYD se localiza en la región C-terminal de aproximadamente 40 aminoácidos y además contiene una región “core” de 18 aminoácidos que forma una región anfipática  $\alpha$ -hélice que se ha supuesto tiene una papel crucial en las interacciones proteína-proteína (Rehman y Mahmood, 2015). Su activación se basa en eventos de fosforilación por cinasas, las cuales modifican diferentes sustratos, lo que resulta en un cambio funcional de las proteínas blanco al modificar su actividad, localización celular o asociación con otras proteínas (Phukan *et al.*, 2017).

La familia AP2/ERF se ha dividido en cinco subfamilias, AP2 (APETALA2), DREB (Dehydration-Responsive Element Binding Protein), ERF (Ethylene Responsive Factor), RAV (Related to Abscisic acid insensitive3/Viviparous1) y otros (Soloits), basada en el número y similitud del dominio AP2 de unión al ADN (Sakuma *et al.*, 2002). La subfamilia AP2 se caracteriza por contener dos dominios de unión AP2/ERF, y además se ha subdividido en dos grupos monofiléticos: AP2 y ANT (AINTEGUMENTA), los cuales están involucrados en la regulación del desarrollo en órganos vegetativos y reproductivos mediante el control del crecimiento y número de células (Shigyo *et al.*, 2006), además de participar en respuesta al estrés abiótico, como sequía (Li *et al.*, 2011). Miembros de la subfamilia RAV se caracteriza por presentar dos dominios de unión al ADN, un dominio AP2/ERF en la región C-terminal y un dominio B3 en la región N-terminal (Xu *et al.*, 2011), actúa como un regulador negativo en el desarrollo de plantas y es importante para la mediación de las respuestas al estrés biótico y abiótico (Chen *et al.*, 2016). Las subfamilias DREB y ERF contiene un solo dominio AP2/ERF de unión al ADN, este dominio presenta dos residuos de aminoácidos altamente conservados y el

dominio es crucial para reconocimiento de la secuencia de unión, en el caso de los miembros de las subfamilia DREB, estos residuos son valina en la posición 14 y ácido glutámico en la posición 19, a diferencia de la subfamilia ERF los residuos son adenina en la posición 14 y ácido aspártico en la posición 19, lo que implica un divergencia funcional entre ambas familias (Rehman y Mahmood, 2015). Cabe destacar que el dominio tiene un papel crucial en la regulación de la respuesta al estrés biótico y abiótico, así como en el desarrollo de la planta y por lo que la desregularización de su expresión puede ocasionar efectos pleiotrópicos como disminución en el tamaño de las células, biomasa de la planta, elongación del hipocótilo, así como la fertilidad (Xu *et al.*, 2011; Dietz *et al.*, 2010).

### **1.6.2. Factores de transcripción ERF**

La subfamilia de proteínas de FT ERF regula la expresión de genes de respuesta al estrés biótico y abiótico lo que indica una comunicación cruzada en las vías de transducción de señales (Rehman y Mahmood, 2015). Las proteínas ERF pueden unirse a elementos *cis* como la caja GCC situada en secuencias promotoras de genes blanco, sin embargo, estudios recientes sugieren que esta afinidad de unión también puede depender del entorno de los nucleótidos del motivo GCC, así como de la naturaleza de algunos residuos de aminoácidos dentro del dominio de unión (Pirrello *et al.*, 2012). La caracterización de esta caja GCC (AGCCGCC) ha demostrado que G2, G5 y C7 son esenciales para la unión de los factores ERF (Magnani *et al.*, 2004).

Los ERF operan específicamente en tejidos vegetativos y órganos reproductivos, además son esenciales en la vía de señalización por etileno (Et), al ser considerados los últimos componentes de la vía en modular la transcripción de genes de respuesta a Et, sin embargo se ha observado que estos factores ERF pueden ser regulados por otras fitohormonas como ABA, SA, JA y AUX, lo que refuerza su potencial contribución en la comunicación cruzada en las vías de señalización (Xu *et al.*, 2011; Pirrello *et al.*, 2012; Gutterson y Reuber, 2004).

En *Arabidopsis* se han descrito 147 miembros de la familia AP2/ERF, con 122 miembros que pertenecen a la familia ERF, donde la mayoría de estos carecen de intrones y solo cuatro miembros los tienen (Nakano *et al.*, 2006). En tomate (*Solanum lycopersicum*) se han caracterizado 146 miembros de la familia AP2/ERF, de los cuales 77 pertenecen a la subfamilia ERF y la mayor parte de estos carecen de intrones (59 de 77), presentan una señal de localización nuclear canónica, además estas proteínas no solo actúan como activadores o represores, sino que también pueden ser neutrales en los promotores sensibles a Et (Pirrello *et al.*, 2012). Los factores ERF en tomate han sido organizados dentro de 9 subclases (10 subclases (A-J) en *Arabidopsis*) definidas por sus características estructurales; dominio AP2, motivos distintivos aminoácidos específicos, así como en el análisis funcional de su actividad transcripcional en la habilidad de activación o represión de genes (Pirrello *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2006).

Las proteínas ERF están presentes en todo el reino vegetal y sus implicaciones funcionales abarca una amplia gama de procesos que incluyen la transducción de señales hormonales, regulación de vías metabólicas y procesos de desarrollo como formación y maduración de fruto (Pirrello *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016), germinación, senescencia (Gu *et al.*, 2017), así como en respuesta al estrés biótico y abiótico, pues se ha demostrado que algunos ERF no solo se unen a la caja GCC sino que tienen la capacidad de unirse a la caja DRE/CTR (Licausi *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2008).

En cuanto al estrés biótico se ha demostrado que los factores ERF1 y ERF2 inducen la expresión de genes como *b-CHI* y *PDF1* en *Arabidopsis* e incrementa la resistencia a la infección por el patógeno *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo y Molina, 2004; McGrath *et al.*, 2005), la proteína Pti4 de tomate regula la expresión de genes como *PDF1.2* que es regulado por la vía de Et, mientras que *PR2*, *PR3*, *PR4* y *GST1* son genes de respuesta a la vía SA, esta inducción de genes promueve la tolerancia a organismos biotróficos con el hongo *Erysiphe* y la bacteria *Pseudomonas* en plantas de *Arabidopsis* (Gu *et al.*, 2002), ERF5/6 regula positivamente genes como *PDF1.1* y *PDF1.2a* los cuales promueven la resistencia

en *Arabidopsis* durante la infección de *Botrytis cinerea* (Moffat *et al.*, 2012), ERF1 de *Artemisa annua* regula la transcripción de *b-CHI* y *PDF1.2* e incrementa la resistencia durante la infección de *B. cinerea* en *A. annua* y *Arabidopsis* (Lu *et al.*, 2013),

En respuesta al estrés abiótico ERF1 de tomate activa la expresión de genes como *LEA*, *P5CS*, *DREB3-1* y *ltpg2* y promueve la tolerancia al estrés salino (Lu *et al.*, 2011), ERF.B.3 en tomate regula la expresión de genes como *C17* y *Hsp21* e induce una respuesta en condiciones de estrés por frío, calor e inundación en tomate (Klay *et al.*, 2014), RAP2.2 y RAP2.12 son activadores de genes de respuesta a hipoxia, los cuales codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de sacarosa, fermentación anaerobia (*ADH* y *PDC*), regulación de ROS en *Arabidopsis* (Gasch *et al.*, 2016).

### **1.6.3. Factores de transcripción como herramientas biotecnológicas**

La participación que juegan los factores ERF en diferentes condiciones de estrés resulta de gran importancia para el desarrollo de estrategia que permitan la protección de los cultivos ante condiciones adversas, se sabe que el rendimiento de los cultivos está fuertemente afectado por los distintos tipos de estrés y por lo tanto es necesario contar con variedades de cultivos que sean capaces de contener contra las condiciones adversas en las que crecen y se desarrolla sin limitar su rendimiento. Para esto, es necesario aprovechar el conocimiento que se ha generado por décadas en cuanto a cómo responden las plantas ante condiciones de estrés y desarrollar mediante ingeniería genética, variedades resistentes. Los factores de transcripción ERF como se ha mencionado anteriormente, tienen un papel regulatorio muy importante en el crecimiento, desarrollo y tolerancia al estrés biótico y abiótico, muchos ERF son inducidos por SA, JA y Et, lo que indica que los ERF pueden coordinar e integrar las diferentes vías de señalización para modular la respuesta de defensa, por lo que pueden ser puntos clave para el estudio y desarrollo de variedades con rasgos específicos con la tolerancia e inclusive obtención de mayor rendimiento.

Varios ERF han sido incorporados a los cultivos, mostrando un mejoramiento en la tolerancia a estrés biótico y abiótico. Estudios de sobreexpresión de ERF en plantas transgénicas y su tolerancia al estrés abiótico ha sido evaluado por Gao *et al.*, 2008 en el cual demuestran que el factor ERF1 de la planta de tabaco, sobreexpresado en plantas transgénicas de arroz resultó en un incremento en la tolerancia al estrés por sequía y alta salinidad, atribuyendo dicho resultado a un aumento en el contenido de prolina y una disminución en la pérdida de agua. La sobreexpresión de ERF3 de soya en plantas transgénicas de tabaco, promueve la tolerancia a estrés por deshidratación y salinidad, aumentando los niveles de prolina y carbohidratos solubles, además de promover la transcripción de genes como *PR1*, *PR2*, *PR4*, osmotina y *SAR8.2* (Zhang *et al.*, 2009). En plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan el factor ERF1 promueven la tolerancia al estrés salino durante el desarrollo de las raíces y la plántula, esto por mayor contenido relativo de agua, menor contenido de malondialdehído (MDA) uno de los compuesto que se produce como resultado de la peroxidación de lípidos, así como menor pérdida de electrolitos (Lu *et al.*, 2011) y de acuerdo con los estudios de Pan *et al.*, en el 2012; la sobreexpresión del factor ERF5 resultó en una elevada tolerancia a estrés salino y sequía en tomate. Así mismo se ha observado que la sobreexpresión del factor ERF3 en trigo, promueve la tolerancia a estrés salino y sequía, obteniendo un aumento considerable en los niveles de prolina y clorofila y una disminución en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y reducción en los niveles de conductancia estomática (Rong *et al.*, 2014). En cuanto la sobreexpresión del factor inducido por patógenos ERF1 de trigo (TaPIE1) promueve la tolerancia al estrés por frio debido a una reducción significativa de la fuga de electrolitos, peróxido de hidrogeno y un aumento en la acumulación de prolina y azúcares solubles (Zhu *et al.*, 2014). En un trabajo reciente se observó que la sobreexpresión de OsEREBP1 en arroz promueve la tolerancia al estrés biótico causado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, y estrés por sequía; como resultado de un incremento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y genes relacionados con la biosíntesis de jasmonatos, ácido abscísico y genes PR (Jisha *et al.*, 2015).

En cuanto al estudio de los factores de transcripción de respuesta a etileno y su papel ante estrés biótico se conoce que, la sobreexpresión del factor ERF1 en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, confiere resistencia a hongos tales como, *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Alternaria brassicicola*, *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Septoria glycines*, *Fusarium oxysporum* y a bacterias como *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*, (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003; Berrocal-Lobo y Molina, 2004), el factor de transcripción ERF3 de soya y de tomate sobreexpresado en plantas transgénicas de tabaco y arroz promovió la tolerancia al estrés salino y la activación de genes de defensa relacionados con la patogénesis (Wang *et al.*, 2004), mejoró la resistencia en contra de la infección de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, el hongo *Alternaria alternata* y el virus del mosaico de tabaco, además de otorgarle tolerancia a estrés salino y a la deshidratación (Zhang *et al.*, 2009), tolerancia a estrés por sequía y osmótico (Zhang *et al.*, 2010). En cuanto al factor ERF5 de tomate sobreexpresado en tomate resultó en una alta tolerancia a el estrés salino y sequía (Pan *et al.*, 2012) y en *Arabidopsis* incrementa la resistencia contra el hongo *B. cinerea* (Moffat *et al.*, 2012). La sobreexpresión de TaPIE1 en trigo aumenta la resistencia al patógeno *Rhizoctonia cerealis*, aumentado la expresión de genes como *Hva1*, *DHN3*, *ADH*, *POX2*, *PR10*, *DFS*, *CHI2* y *WAKL22* (Zhu *et al.*, 2014). Aunque existe un gran número de estudios relacionados con estos factores de transcripción (Oñate-Sánchez *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Maruyama *et al.*, 2013) la mayoría en respuesta al estrés abiótico, la sobreexpresión de estos factores resulta ser una opción en las estrategias de control para distintos tipos de estrés.

El uso potencial que presenta la sobreexpresión de FT en el campo agrícola resulta ser una estrategia para el mantenimiento y tolerancia a distintos factores estresantes de gran interés, además de ser una herramienta de estudio de los mecanismos moleculares que se llevan a cabo en la planta para hacerle frente a los distintos tipos de estrés. Tomando en cuenta que las condiciones ambientales actuales, resultan ser un problema que revela las necesidades de cambiar las formas de control en la producción agrícola, ya que éstas contribuyen a la

desertificación de los suelos y la generación de patógenos resistentes. Por lo que, los organismos genéticamente modificados (OGM) se han propuesto como una herramienta para mejorar la producción a nivel mundial y el establecimiento de una agricultura sustentable (Speiser *et al.*, 2012).

Por esta razón, la explotación del conocimiento en los mecanismos de resistencia de las plantas, así como la generación de variedades tolerantes resultan ser una alternativa de control para la producción de cultivos agrícolas. Por lo tanto, con los antecedentes descritos anteriormente, se pretende evaluar la sobreexpresión de diversos factores de transcripción de respuesta a etileno pertenecientes a la familia AP2/ERF (ERF1, ERF3b, ERF5 y Pti4) en plantas transgénicas de tomate y la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico como sequía y salinidad, así como su tolerancia contra *Botrytis cinerea*, hongo necrotrófico, capaz de manipular los mecanismos de resistencia de una gran variedad de plantas, entre ellas el tomate, aprovechando esta manipulación de vías de señalización para su establecimiento y desarrollo de la enfermedad.

## 2. Justificación

México ocupa el segundo lugar de exportación mundial de tomate, su importancia del cultivo reside en la aportación de divisas y en la generación de empleos en cada una de las fases de la cadena agroalimentaria en el país, además de ser una hortaliza con propiedades nutricionales de gran interés. Los principales problemas que enfrenta la producción de tomate, así como cualquier otro cultivo, es debido a condiciones ambientales adversas que ponen a prueba el crecimiento, desarrollo y producción óptima de los cultivos. Estas condiciones están dadas por diferentes factores bióticos y abióticos que ocasionan una reprogramación en el metabolismo de la planta y en consecuencia una disminución del vigor de la planta.

Los factores abióticos son los que ocasionan mayores pérdidas en el rendimiento de los cultivos lo que se traduce en pérdidas económicas importantes a nivel mundial, sin embargo, las plantas no solo se enfrentan a este tipo de condiciones sino también están en contacto continuo con microorganismos tanto benéficos como perjudiciales. Las enfermedades causadas por fitopatógenos mantienen un gran interés en la producción agrícola ya que al igual que las condiciones abióticas no solo generan pérdidas importantes sino también tienen un impacto ecológico significativo, ya que para su control se hace un uso excesivo de agroquímicos que además de incrementar los costos de producción, generan cepas resistentes y ocasionan daños al medio ambiente, por lo que actualmente se buscan alternativas que contrarresten dichos efectos.

Una de las alternativas propuestas para el control de enfermedades agrícolas, así como para la tolerancia a distintos tipos de estrés es la transformación genética de plantas de la cual se han obtenido resultados importantes y alentadores en el control de plagas, enfermedades e inclusive en la tolerancia al estrés provocado por factores abióticos. Una estrategia importante en la transformación genética de plantas es la sobreexpresión de genes involucrados en los mecanismos de defensa y tolerancia, que estén implicados directamente en conferir una disminución al daño ocasionado por microorganismos patógenos, estrés salino, hídrico entre otros. Por esta razón, se pretende evaluar el efecto de la

sobreexpresión de diversos factores de transcripción como ERF1, ERF3b, ERF5 y Pti4 en plantas de tomate transgénicas en el control del hongo *Botrytis cinerea*, el cual es considerado como un fitopatógeno de importancia económica a nivel mundial, así como también a diversos factores abióticos que provocan estrés en la planta como sequía y salinidad.

### **3. Hipótesis**

La sobreexpresión de cada uno de los factores de transcripción ERF (ERF1, ERF3b, ERF5 y Pti4) en plantas transgénicas de tomate, promoverá su tolerancia ante al estrés ocasionado por sequía y salinidad, así como al ataque por el hongo *Botrytis cinerea*.

### **4. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de ERF1, ERF3b, ERF5 y Pti4 en diferentes líneas transgénicas de tomate, en condiciones de estrés por sequía y salinidad, así como en la infección por patógenos.

#### **4.1. Objetivos específicos**

- I. Obtener plantas transgénicas de *Solanum lycopersicum* sobreexpresantes de los factores ERF1, ERF3b, ERF5 y Pti4.
- II. Demostrar la transformación genética y la funcionalidad de los transgenes en las líneas transgénicas de tomate.
- III. Evaluar la susceptibilidad a infección por *B. cinerea*.
- IV. Evaluar la tolerancia de las plantas transgénicas de tomate en condiciones de estrés por sequía y salinidad.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Material

Semillas de *Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 50% por 10 minutos en agitación, seguido de tres lavados con agua destilada estéril, las semillas estériles se germinaron en cajas Petri con medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30g/L de sacarosa y 3g/L de agar (GELLAN-Phytotechnology laboratories) en condiciones de fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad de 25°C +/- 2.

### 5.2. Análisis de expresión de los factores ERF1, ERF3b y ERF5 en planta silvestre

Plantas silvestres (WT) de dos semanas de edad se trataron en diferentes condiciones para evaluar cambios en los niveles de expresión de los genes *ERF5*, *ERF3b* y *ERF1* en respuesta a la condición establecida. Se emplearon 10 plantas para cada tratamiento, en el primer tratamiento se colocaron las plantas en un flujo de aire continuo para acelerar la deshidratación, un segundo grupo de plantas se colocaron en una solución de NaCl 50mM (concentración que inhibe la germinación de semillas de tomate) y un tercer grupo de plantas se asperjaron con una solución de trehalosa 10mM, de cada grupo de plantas se tomó muestra a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180min, se colocaron en nitrógeno líquido para su posterior extracción de RNA total y la síntesis de cDNA para su análisis en tiempo real.

### 5.3. Construcción de plásmidos

A partir de las secuencias codificantes de los factores de transcripción *ERF1* (AY192367), *ERF3b* (AY559314), *ERF5* (AY559315) y *Pti4* (U89255) depositadas en la base de datos de GeneBank del National Center for Biotechnology (NCBI) (Anexo 10.1), se diseñaron oligonucleótidos específicos flanqueados con sitios para las enzimas de restricción *XbaI/KpnI* para *ERF1*, *ERF3b* y *Pti4*; *BamHI/KpnI*

para *ERF5* (Tabla 2), los cuales permitieron la amplificación por PCR de los factores a partir de DNA genómico. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial 95°C por 3min; 35 ciclos a 95°C por 45s, alineamiento 65°C por 45s, extensión 72°C por 1min y extensión final 72°C por 5min para *ERF3b* y el factor *ERF5* se amplificó con una temperatura de alineamiento de 60°C.

<b>Tabla 2. Secuencia específica de oligonucleótidos</b>	
<b>Genes</b>	<b>Oligonucleótidos: 5'→3'</b>
<b><i>ERF1</i></b>	F: GCT CTA GAA TG TAT CAA CTT CCC ACT TC
	R: GGG GTA CCC TTA GCT CCA TAT TTT AAC TAA CC
<b><i>ERF3b</i></b>	F: GCT CTA GAA TGG CAA TGG TGA ATT TAA ATG G
	R: GGG GTA CCT CAC ATG TTT TCC GGT GGA GG
<b><i>ERF5</i></b>	F: CGG GAT CCA TGG GTT CTC CAC AAG AGA C
	R: GGG GTA CCT TAT ATC ATA ACA AGC TGA G
<b><i>Pti4</i></b>	F: GCT CTA GAA TGG ATC AAC AGT TAC CAC CG
	R: GGG GTA CCT AAA TGA CCA ATA GTT GAT GG
<b><i>NPT II</i></b>	F: GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC
	R: GAA GAA CTC GTC AAG AAG GC
<b><i>AMV</i></b>	F: CTT TCA AAT ACT TCC ACC ATG G
<b><i>qERF1</i></b>	F: GCT CTA GAA TGT ATC AAC TTC CCA CTT C
	R: CGG CGT CCA TCC GAT ACT A

<b><i>qERF3b</i></b>	F: CTT TCG ATA CTG CGG AGG AG
	R: CCA TAA CCG GAC TCG ATG AC
<b><i>qERF5</i></b>	F: ATC CAT GGG TTC TCC ACA AG
	R: AAC ATG TCG TTT TGC CTC AA
<b>EF1<math>\alpha</math></b> (Giorno <i>et al.</i> , 2010)	F: TGA TCA AGC CTG GTA TGG TTG T
	R: TGG GTC ATC CTT GGA GTT
<b>APx</b> (Murshed <i>et al.</i> , 2014)	F: GTT GAA GGT CGC TTG CCG
	R: CCA AGG TAT GGG CAC CAG
<b>P5CS</b> (Sangu <i>et al.</i> , 2015)	F: CAG GAG CTT AAT TCG CAA GG
	R: ACC AGA GGC TGA GCT GAT GT

Letras en cursiva en la secuencia de nucleótidos representa el sitio de restricción.

F: Forward, R: Reverse representan el sentido de los oligonucleótidos.

Los productos de PCR de *ERF1*, *ERF3b*, *Pti4* y *ERF5* se purificaron empleando el estuche comercial Qiaquick PCR purification kit QiagenII y ligaron en los vectores de clonación pJET1.2/blunt (CloneJET™ PCR Cloning Kit) para *ERF1*, *ERF3b*, *Pti4* y pTZ57R/T (Thermo Scientific InstAclone PCR Cloning Kit) para *ERF5* transformados en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . A partir de DNA plasmídico se realizó un análisis de restricción con las enzimas específicas, empleando *XbaI-KpnI* para *ERF1*, *ERF3b*, *Pti4*, y para *ERF5*, *BamHI-KpnI* para la liberación del fragmento de interés. Posteriormente los productos génicos se purificaron con el Kit de purificación de Qiagen® y se enviaron a la unidad de secuenciación del IBT-UNAM (Cuernavaca, Morelos). Al confirmar la secuencia correcta de cada factor los fragmentos de la restricción *XbaI-KpnI* y *BamHI-KpnI* correspondiente a cada factor, fueron movilizados al vector de transformación p2x35S-Nos dirigidos por el

promotor doble constitutivo 35S-35S y un potenciador transcripcional AMV, estos plásmidos se movilizaron por electroporación (1800V-5s) a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, nuevamente se confirmó por restricción empleando la digestión de los plásmidos con *EcoR*I para 2x35S-ERF1 y 2x35S-Pti4, *Bgl*II para 2x35S-ERF3b, *Hind*III para 2x35S-ERF5, además de liberar el producto de cada factor para la selección correcta de la clona para su posterior uso en la transformación genética de cotiledones de tomate.

#### **5.4. Análisis filogenético**

A partir de las secuencias de los factores de transcripción ERF que fueron obtenidas de la Unidad de secuenciación, estas se compararon con secuencias depositadas en la base de datos Genbank y se realizó un análisis filogenético empleando el método de Neighbor-Joining (N-J) con base a su secuencia nucleotídica y se compararon con otros factores de transcripción ERF mismos de *Solanum lycopersicum*, así como factores ERF de *Arabidopsis* con ayuda del programa MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, por sus siglas en inglés) (Saitou y Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2018). Se emplearon 99 secuencias nucleotídicas de las cuales se eliminaron posiciones ambiguas para cada par de secuencias.

#### **5.5. Transformación genética de tomate**

La transformación genética de tomate se llevó a cabo a partir de explantes de cotiledones de siete días después de la germinación de acuerdo con el método descrito por Cortina y Culiáñez-Macià (2004; 2005) (Anexo10.4) los cotiledones fueron sometidos a un proceso de organogénesis y selección de líneas transformadas resistentes al marcador de Kanamicina.

Cotiledones de ocho días después de la germinación se seccionaron formando un rectángulo, los explantes se colocaron en cajas de Petri en un medio de pre-cultivo

PM (Tabla 3) y se incubaron 2 días a 25°C. Posteriormente los explantes se removieron de las placas de pre-incubación y se co-cultivaron en una agrosuspensión ( $OD_{620}=0.2$ ) para la infección bacteriana durante 15 minutos, después fueron removidos de la suspensión se pasaron sobre papel filtro para eliminar el exceso de bacterias y colocados nuevamente en placas de pre-incubación en posición abaxial hacia abajo en contacto con el medio de cultivo PM adicionado con acetosiringona, se co-cultivaron por 2 días en condiciones de fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad una temperatura de  $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  para permitir la transformación genética. Después, los explantes fueron transferidos a placas con medio RM, el cual contiene cefotaxima para eliminar el crecimiento bacteriano de *A. tumefaciens* y Kanamicina para el inicio de selección de explantes transformados. Los explantes permanecieron en el medio RM hasta la aparición de brotes. Brotes individuales de ~2cm de cada explantes fueron transferidos en medio RTM con para inducir la formación de raíces de las plantas transformadas, las cuales después de un mes fueron transferidas a sustrato y macetas. Las líneas transgénicas (LT) obtenidas se segregaron hasta su línea homociga, donde se llevaron a cabo las pruebas experimentales.

<b>Tabla 3. Medios de cultivo para la transformación genética de tomate</b>			
<b>Componentes</b>	<b>PM</b>	<b>RM</b>	<b>RT</b>
Sales Murashige y Skoog (MS)	4.4g/L	4.4g/L	4.4g/L
Vitaminas (MS) 1000X	1mL/L	1mL/L	1mL/L
6-Bencilaminopurina (BA)	1mg/L	--	--
$\alpha$ -Ácido Naftalenacético	1mg/L	--	--

Ácido Indolacético	--	0.5mg/L	--
Zeatina	--	1mg/L	--
Tiamina	--	0.1mg/L	--
Sacarosa	30g/L	30g/L	30g/L
pH	5.7	5.7	5.7
Agar	8g/L	8g/L	8g/L
Cefotaxima	--	200mg/L	200mg/L
Kanamicina	--	100mg/L	100mg/L

PM: Medio de pre-cultivo, RM: Medio de selección, RTM: Medio de enraizamiento

\*acetosiringona (200µM) se adiciona en medio PM después de la infección.

## 5.6. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Allen *et al.*, 2006). A partir de 200 mg de tejido vegetal se homogenizaron con 500µL de solución buffer de CTAB, se incubó durante 15min a 55°C, en seguida se centrifugó a 12000rpm por 5min, después se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionaron 250µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 13 000rpm durante 2min, nuevamente la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al cual se le añadió 50µL de acetato de amonio (7.5M) seguido de 500µL de etanol absoluto frío, y se mezcló lentamente por inversión hasta precipitar el ADN, en este paso las muestras pueden almacenarse hasta 1h a -20°C. Consecutivamente se centrifugaron a 13 000rpm durante 1min, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN 3 veces con 500µL de etanol frío al 70% y centrifugando a 13 000 rpm durante 1 min y eliminando el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla de ADN durante

15 min y se re-suspendió en 50µL de TE-RNAsa (10µg/mL). Las muestras de ADN se incubaron a 65°C durante 20min y finalmente almacenadas a -20°C hasta su utilización en las reacciones de PCR.

Para corroborar la integridad del ADN así como el tamaño de los productos se empleó gel de agarosa 1%, 1.5 y 2% (de acuerdo con el tamaño esperado) en 100mL de una solución buffer de TAE (1X), adicionado con 2.5µL de bromuro de etidio (10mg/mL).

### **5.7. Análisis molecular de plantas de tomate**

A partir de ADN genómico de tejido fresco de hoja de plantas de tomate silvestre (WT) y líneas transgénicas ERF3b y ERF5 se verificó la inserción del gen *NPTII* de resistencia a Kanamicina y de los genes que codifican para los factores *ERF3b* y *ERF5* utilizado un oligonucleótido específico que se anclan en la región del *enhancer* transcripcional AMV (*Foward*) y otros oligonucleótidos específicos (*Reverse*) para cada uno de los factores con el fin de diferenciar los genes endógenos de la planta con respecto a los del transgen (tabla 2). Las condiciones de amplificación para *NPTII* fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5min, 35 ciclos a 94°C por 45s, alineamiento 57°C por 45s, extensión 72°C por 1min y extensión final 72°C por 5min. Las condiciones de amplificación para la fusión AMV-ERF fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5min, 35 ciclos a 95°C por 45s, alineamiento a 61°C por 45s, y extensión a 72°C por 1min y extensión final a 72°C por 5min.

### **5.8. Extracción de ARN y síntesis de cDNA**

Se realizó la extracción de ARN total de cada muestra utilizando el reactivo TRIZOL y siguiendo el protocolo de fabricante (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) en cinco fases. **1) Homogenización:** Se pulverizaron ~100mg de material vegetal con nitrógeno líquido. Se homogenizo el material vegetal con 1mL

de Trizol y se incubó a temperatura ambiente de 2-3 minutos. Se centrifugó la muestra por 10 min a 12 000rpm a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. **2) Separación:** Se adicionó 200µL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3min. Se centrifugó la muestra por 15 min a 12 000rpm a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. **3) Precipitación:** Se adicionaron 500µL de isopropanol, se agitó y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min, después se centrifugaron por 10 min a 12 000rpm a 4°C. **4) Lavado:** Se eliminó el sobrenadante, y el *pellet* de ARN se lavó con 1mL de etanol al 75%, posteriormente la muestra se agitó por vortex y se centrifugó por 5 min a 7 500rpm a 4°C. **5) Resuspensión:** se dejó secar el *pellet* de RNA en un flujo de aire de 5-10 min, finalmente se disolvió el pellet en 20µL en agua libre de RNasas (DEPC), se incubaron las muestras por 10min a 55°C y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Después de obtener el ARN, se realizó un tratamiento para eliminar cualquier producto de ADN genómico en la muestra. A partir de una alícuota de 2µg de ARN se realizó un tratamiento con DNasa I (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific), adicionando 1µL de Buffer 10X adicionado con MgCl<sub>2</sub>, 0.5µL de DNasa I, y ajustando hasta 10µL con agua tratada con DEPC. Se incubaron las muestras a 37°C por 30 min, posteriormente se adicionó 1µL de EDTA (50mM) y se incubaron a posteriormente a 65°C por 10 min. Finalmente se realizó la síntesis de la primera cadena de cDNA siguiendo el kit RT-PCR (FERMENTAS). Se tomó 1µL de ARN tratado con DNasa, y se adicionó 1µL del *primer* oligo (dT)<sub>18</sub>, y se ajustó hasta un volumen de 12µL con agua DEPC, se mezcló gentilmente y las muestras se incubaron a 65°C por 5 min, después las muestras se enfriaron en hielo y mezclaron para posteriormente adicionar 4µL de solución Buffer 5X, enzima inhibidora de RNasas (RiboLock) 1µL, solución de dNTP (10mM) 2µL, transcriptasa reversa 1µL, obteniendo un volumen final de 20µL. Se incubaron las muestras a 42°C por 60 min y para terminar a reacción se incubaron nuevamente a 70°C por 5min. Cada muestra fue almacenada a -80°C hasta su posterior uso.

### **5.9. Análisis de expresión**

Los niveles de expresión se normalizaron en base a la expresión del factor de elongación 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) de tomate, empleando oligonucleótidos específicos (Giorno *et al.*, 2010) (Tabla 2), los niveles de expresión fueron calculados con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y el valor en el cambio de expresión ( $\log_2$ ) se calculó de acuerdo con Ramírez *et al.* (2013). Las reacciones se llevaron a cabo en un formato de 96 pozos con el sistema PCR tiempo real 7300 y el software del sistema 7300. En planta silvestre se evaluó la expresión de *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5*, en diferentes tratamientos; en las líneas transgénicas se evaluó el cambio en los niveles de expresión de *ERF3b*, *ERF5*, *P5CS* (Sangu *et al.*, 2015) y *APx* (Murshed *et al.*, 2014) en comparación con la línea silvestre.

### **5.10. Pruebas de germinación de semillas de tomate**

Semillas estériles de la línea WT y líneas transgénicas homocigas fueron germinadas en placas Petri con medio MS como control y medio MS adicionado con NaCl 35mM y 50mM; LiCl 25mM, sorbitol 70mM y 100mM; y metil viológeno 0.5 $\mu$ M 1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M, en condiciones de 16h luz/8 h oscuridad de 25°C +/-2. Cada caja contenía 20 semillas y cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Se determinó el porcentaje de germinación de semillas durante 15 días para cada tratamiento.

### **5.11. Prueba de estrés en plantas de tomate**

Plantas de cuatro semanas de edad silvestres y transgénicas se crecieron en condiciones de invernadero. Para el tratamiento de salinidad con cloruro de sodio y cloruro de litio se empleó una solución de NaCl 250mM y LiCl (25mM) para el

riego de las plantas durante 2 semanas, con riegos cada tercer día; para el tratamiento de sequía, se eliminó el riego por 15 días, y se tomaron muestras cada semana para la determinación de parámetros indicadores de estrés. Plantas de tres semanas se asperjaron con una solución de Paraquat (100 µL) cuyo compuesto activo el metil viológeno (MV) induce un estrés oxidativo, el cual se empleó para evaluar su tolerancia a esta condición, fueron monitoreadas por dos semanas.

#### **5.12. Determinación del contenido de clorofila en plantas de tomate**

La extracción de clorofila se llevó a cabo por el método descrito por Lichtenthaler y Wellburn en 1983, a partir de discos de hojas, empleando metanol al 100% para su extracción. La micro extracción se realizó manteniendo las muestras en hielo y la mínima cantidad de luz posible. Los discos de hojas se coloraron en tubos Eppendorf de 1.5mL, y se adicionó 1mL de metanol frío y se maceró el tejido vegetal hasta su homogenización, las muestras se centrifugaron durante 5min a una velocidad máxima de 4500rpm, después el sobrenadante se colocó en celdas para espectrofotómetro las cuales se mantuvieron en hielo y en oscuridad hasta la determinación de la lectura en el espectrofotómetro.

Para el contenido de clorofila se determinó su absorbancia en dos longitudes de onda 665.2 y 652nm y su contenido (mg/L) mediante las siguientes formulas:

$$\text{Chl}_a = 16.29 * A_{665.2} - 8.54 * A_{652}$$

$$\text{Chl}_b = 30.66 * A_{652} - 13.58 * A_{665.2}$$

$$\text{Chl}_{a+b} = 22.12 * A_{652} - 2.71 * A_{665.2}$$

#### **5.13. Determinación del contenido de Malondialdehído (MDA) en plantas de tomate**

Los niveles de peroxidación de lípidos se determinaron a partir de tejido vegetal de hojas para cuantificar el contenido de MDA, el cual se estimó empleando el método colorimétrico TBA (ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege y Aust en 1978. A partir de 100mg de tejido vegetal se maceró en un mortero con 1mL del reactivo TCA-TBA-HCL hasta su homogenización, la mezcla fue transferida a tubos de 2mL, posteriormente las muestras se incubaron durante 30min a 90°C, pasado este periodo los tubos se colocaron en hielo para enfriar y después se centrifugaron a 12000g durante 15min, el sobrenadante es transferido a celdas para espectrofotómetro y determinar la absorbancia en dos longitudes de onda 535 y 600nm. El contenido de MDA (nmol MDA/g de Peso fresco) se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$C_{MDA} = ((A_{535} - A_{600})1\text{mmol}/1.56*10^5\text{mL})x(10^6/1\text{mmol})x(1\text{mL}/0.1\text{g})$$

#### 5.14. Crecimiento de *Botrytis cinerea* e infección en hojas de tomate

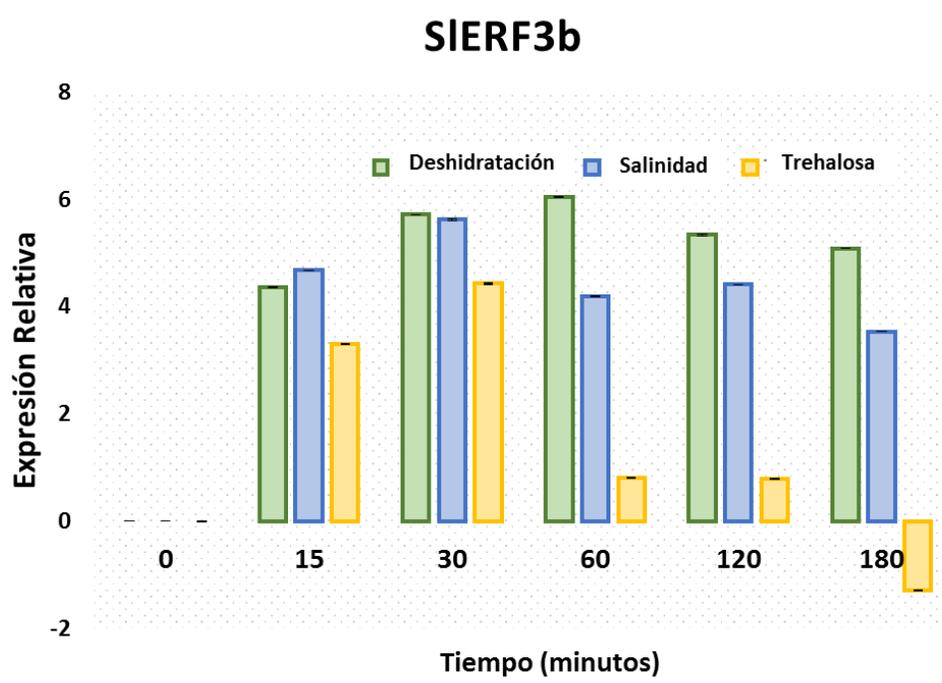
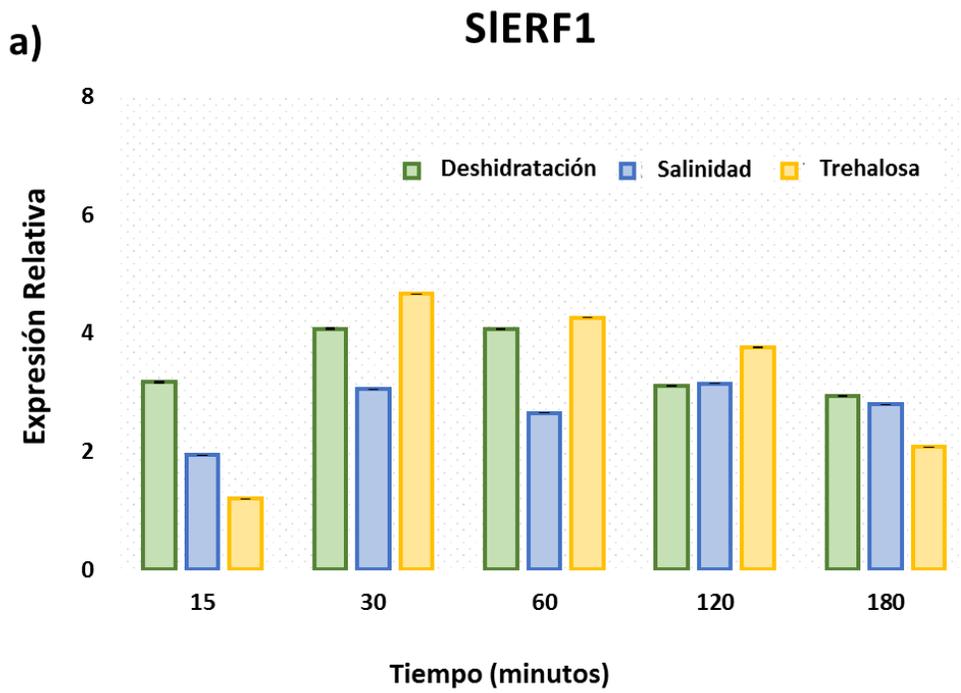
*Botrytis cinerea* B05.10 se creció en placas Petri con medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA) durante dos semanas en oscuridad a 25°C para la obtención de esporas. Las esporas se cosecharon a partir de un raspado suave de la superficie de la caja un asa de platino adicionando 10mL de agua estéril y TWEEN 0.02%, la suspensión de esporas se filtró sobre algodón estéril para eliminar el micelio. Posteriormente se cuantificó la concentración de esporas con ayuda de la cámara de Neubauer (0.0025mm<sup>2</sup>) y un microscopio de luz. Para la infección en plantas se preparó una suspensión de esporas en una concentración de 1x10<sup>5</sup> esporas/mL en medio líquido dextrosa papa (PD) adicionado con Tween al 0.02% para su activación durante 1h. Se colocó una gota de 5µL de la suspensión de esporas por hoja. 5 hojas por planta de 5 a 6 semanas de edad con 5 repeticiones fueron infectadas. El área de infección se determinó empleando el software procesador de imágenes ImageJ-NIH (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Cristescu *et al.*, 2002).

## 6. Resultados

### 6.1. Análisis de expresión espacio-temporal de ERF en plantas silvestres de tomate en diferentes tratamientos

El análisis de expresión de los FT en condiciones de estrés por deshidratación mostró que *ERF5* y *ERF3b* presentaron un patrón de inducción similar, alcanzando su máxima expresión a los 60 minutos, la cual disminuye ligeramente a los 120min. En condiciones de salinidad, los niveles de expresión de *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5* incrementaron a partir de los 15 min, alcanzando su máxima expresión a los 30min de exposición. *ERF3b* mantiene una mayor expresión a partir de los 60min, es inducido preferencialmente en comparación con *ERF1* y *ERF5*, donde la expresión de *ERF3b* disminuye de 2 a 2.5 veces con respecto a los niveles de su máxima expresión, mientras que para el factor *ERF5* se reprime de 3 a 4.5 veces y *ERF1* cambia ligeramente. En presencia de trehalosa exógena, se observaron cambios en los niveles de expresión de *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5*, sin embargo, la respuesta difiere entre los activadores y represores. Los tres factores alcanzan su máxima expresión al minuto 30, después la expresión del represor *ERF3b* se reprime significativamente en comparación con los activadores, *ERF1* y *ERF5* (Figura 11).

Los FT *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5*, son inducidos en condiciones de deshidratación y, salinidad lo que sugiere una activa participación en la regulación positiva en respuesta al estrés abiótico. En presencia de trehalosa, los activadores son significativamente sobrerregulados mientras que el represor *ERF3b* responde a la presencia de la molécula al inicio, sin embargo, después su respuesta se reprime de manera importante por lo que puede jugar un papel diferente con respecto a *ERF1* y *ERF5*.



## SIERF5

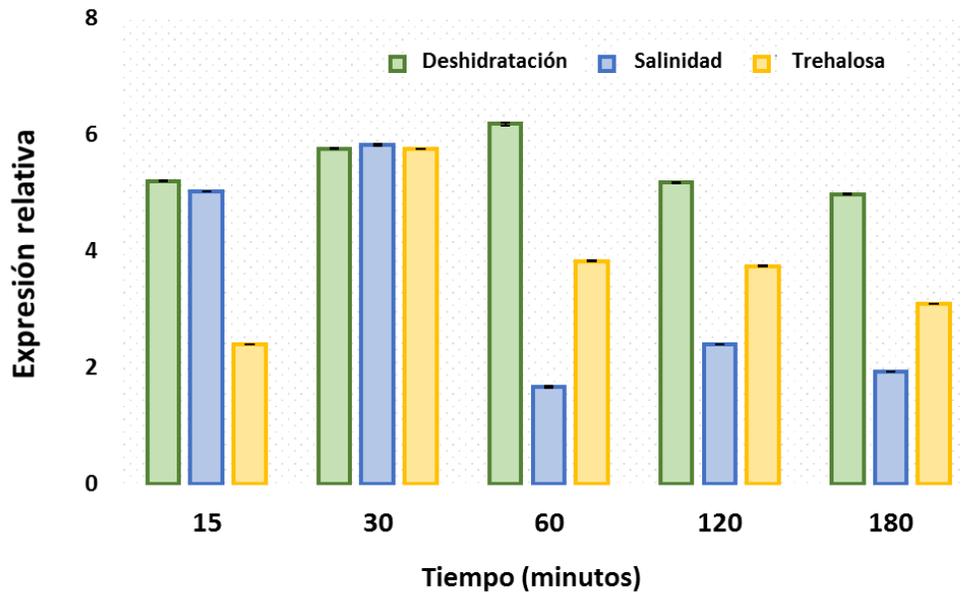


Figura 11 Niveles de expresión espacio-temporal (tratamiento/control) de los factores de transcripción ERF bajo condiciones de deshidratación, salinidad y trehalosa exógena en plantas silvestres de tomate de dos semanas. a) Nivel de expresión de *ERF1*, b) Nivel de expresión de *ERF3b* y c) Nivel de expresión de *ERF5*. Los niveles de expresión de los transcritos fueron analizados por qRT-PCR, datos representan la media  $\pm$  SD de tres repeticiones. La expresión de los ERF fue normalizada con *EF1 $\alpha$* .

## 6.2. Construcción de plásmidos

A partir de ADN genómico de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig se llevó a cabo la amplificación por PCR de los genes *ERF1*, *ERF3b*, *ERF5* y *Pti4*, que se muestra en la figura 12.

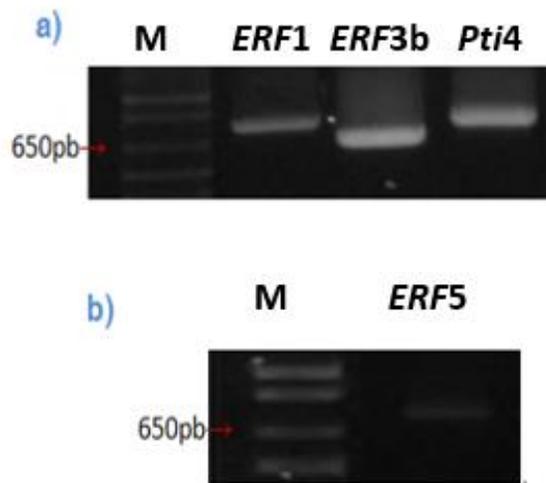


Figura 12 Amplificación de los factores ERF a partir de DNA de tomate silvestre cv. Ailsa Craig. a) amplificación de los factores *ERF1*, *ERF3b* y *Pti4* con una temperatura de alineamiento de 65°C. b) amplificación del factor *ERF5* a una temperatura de alineamiento de 60°C.

Posteriormente a la purificación del producto de PCR de cada gen, se movilizaron a los vectores de clonación y transferidos a células de *E. coli* DH5 $\alpha$  correspondientes. Para corroborar su correcta transferencia, a partir de DNA plasmídico se realizó un análisis por restricción de las enzimas específicas, empleando *XbaI-KpnI* para *ERF1*, *ERF3b* y *Pti4*, y para *ERF5*, *BamHI-KpnI*, en la figura 13 se muestra la liberación de producto esperado para cada gen de cada una de las clonas que correspondieran con el tamaño de producto esperado.

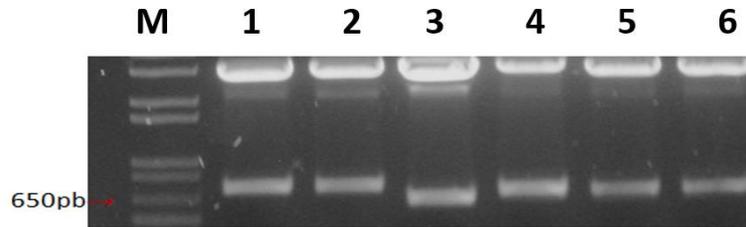


Figura 13 Patrón de restricción de los plásmidos de los diferentes ERF, por la liberación del gen ligado en un vector de clonación. Carril M: Marcador; Carril 1-2: *ERF1* producto de 752pb; Carril 3: *ERF3b* producto de 649pb; Carril 4: *ERF5* producto de 751pb; Carril 5-6: *Pti4* producto de 720pb. Los productos se colocaron en un gel de agarosa 1%.

El producto de la primera clona de cada ERF fue purificado, las muestras de cada producto ERF se enviaron a la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM (Cuernavaca, Morelos), para su secuenciación, las cuales se analizaron mediante un Blastn con secuencias depositadas en la base de datos del Genbank de NCBI, obteniendo un porcentaje de identidad de 98.15, 100, 99.73 y 99.43% para las secuencias génicas de *ERF1*, *ERF3b*, *ERF5* y *Pti4* respectivamente (Anexo10.3). Confirmada la secuencia, los genes del vector de clonación se transfirieron al vector de transformación 2x35S en células competentes de *E. coli* y después a células de *A. tumefaciens* LBA4404, la selección de clonas se realizó mediante una análisis de restricción como se muestra en la figura 14, donde se observa la selección de 3 clonas para cada factor donde se digirieron con las enzimas *EcoR1* para 2x35S-*ERF1* y 2x35S-*Pti4*, *BglII* para 2x35S-*ERF3b*, *HindIII* para 2x35S-*ERF5*, la figura 14a se muestra que dos clonas con el plásmido 2x35S-*ERF1*, liberan el fragmento esperado de 958pb, mientras que una de ellas no y por lo tanto se descarta para su futuro empleo. En el caso del plásmido 2x35S-*ERF3b* se observó que 2 de las clonas presentan 3 de los productos esperados 7858, 3206 y 1988pb, sin embargo, no se logró la visualización en las bandas del producto más pequeño, por lo tanto, para asegurar la correcta transferencia del vector se volvió a digerir una muestra con una mayor cantidad de ADN plasmídico (17.5uL), como se muestra en la figura 14b, se aprecia uno de los productos esperados de aproximadamente 289pb. Para el caso de 2x35S-*ERF5* se observan los productos esperados 12386, 834,325pb y para 2x35S-*Pti4* 12599, 915pb en la figura 14a

respectivamente. Finalmente se realizó una amplificación de cada ERF a partir de DNA plasmídico como se muestra en la figura 14c.

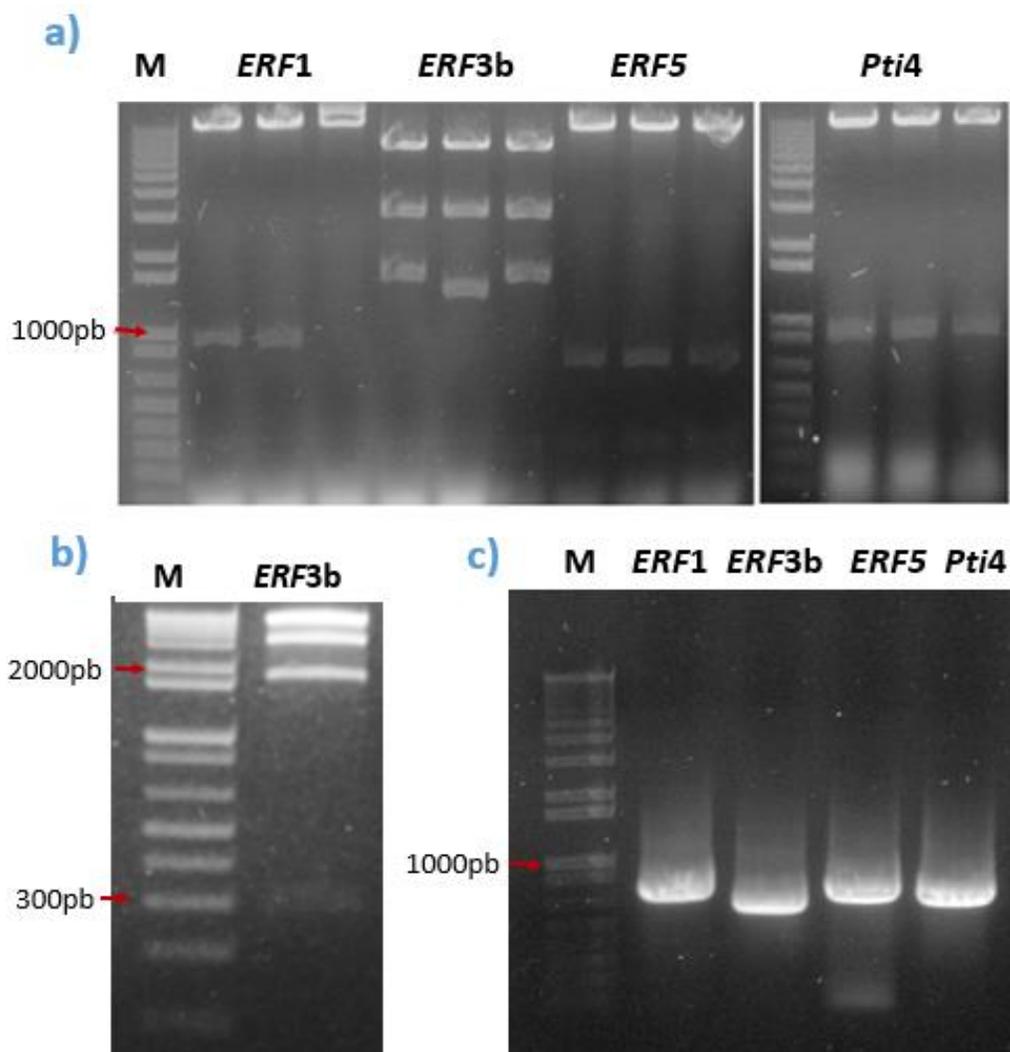


Figura 14 Análisis de restricción y amplificación de los vectores de transformación. a) Análisis de restricción del vector de transformación p2x35S-ERF1/*EcoRI*, p2x35S-ERF3b/*BglII*, p2x35S-ERF5/*HindIII* y p2x35S-Pti4/*EcoRI*. Gel de agarosa 1%. b) Análisis de restricción p2x35S-ERF3b/*BglII* con mayor cantidad de plásmido, en gel de agarosa al 2%. c) Amplificación por PCR de *ERF1*, *ERF3b*, *ERF5* y *Pti4* a partir de DNA plasmídico de cepas de *A. tumefaciens*. M: marcador 1Kb.

### 6.3. Análisis filogenético

El resultado del análisis evolutivo inferido por el método N-J, se muestra un árbol óptimo con la suma de longitud de la rama =44.17160229, las distancias evolutivas se calcularon empleando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de base por lugar. En la figura 15, se observa el resultado del análisis evolutivo, para los genes de tomate se empleó la nomenclatura SI-ERF propuesta por Pirrello *et al* (2012), mientras que para los genes de interés evaluados en esta tesis se muestran de la siguiente manera *SIERF1*, *SIERF3b*, *SIERF5* y *SIPti4* resaltados con una línea color verde (Figura 15).

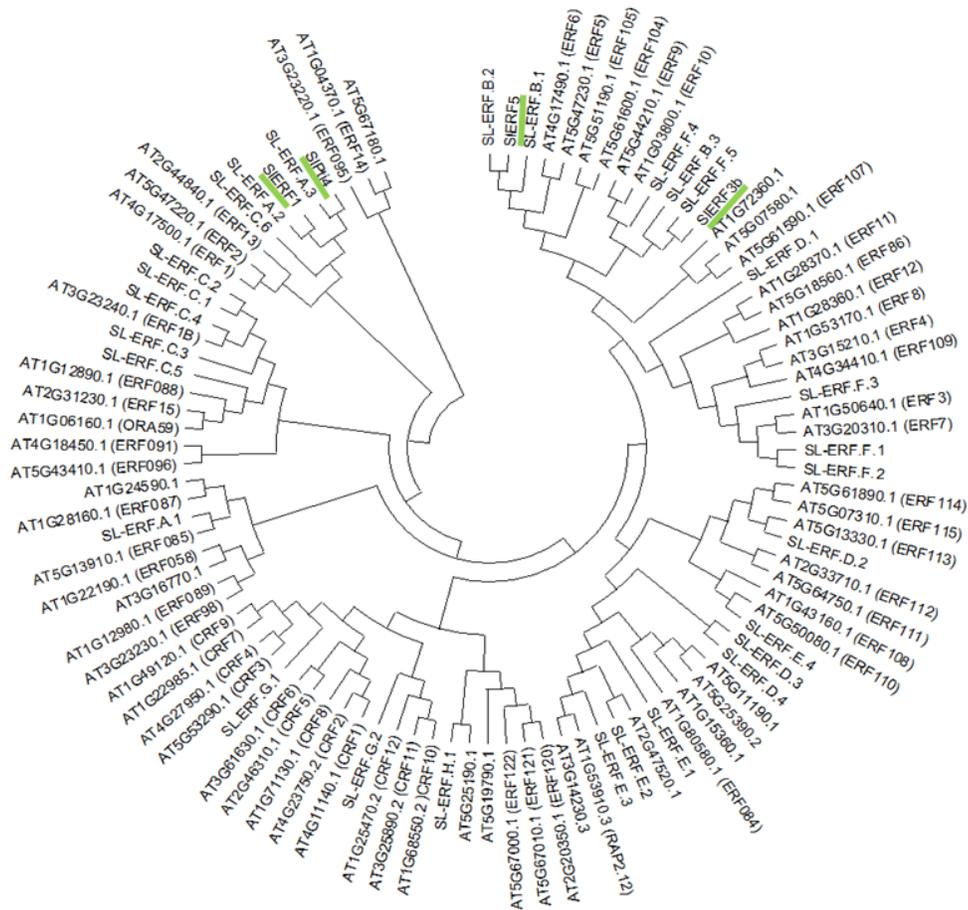


Figura 15 Árbol filogenético de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis*. La construcción del árbol se realizó con secuencia de ADN, empleando el método Neighbour-Joining.

En el árbol filogenético se observa la relación de los genes de interés *ERF1*, *ERF3b*, *ERF5* y *Pti4* cerca de *SI-ERF.A.2*, *SIERF.F.5*, *SI-ERF.B.2* y *SI-ERF.A.3* respectivamente, que corresponde a estos mismos genes reportados para *S. lycopersicum*. Se observa además la cercanía con otros genes, *ERF1* y *Pti4* de tomate están altamente relacionados entre sí, en cuanto a *Arabidopsis* se relacionan con *AtERF1* y *AtERF2*, mientras que *ERF5* de tomate es más cercano a *SI-ERF.B.1*, *AtERF6* y *AtERF5*, en cuando a *ERF3b* es cercano a *SI-ERF.B.3*, *SI-ERF.F.4*, *AtERF9* y *AtERF10*.

#### 6.4. Transformación genética de cotiledones de tomate

Cada vector que incluye los transgenes de interés (2X35S-ERF1-Nos, 2X35S-ERF3b-Nos, 2X35S-ERF5-Nos y 2X35S-Pti4-Nos) fueron transferidos individualmente mediante *A. tumefaciens* a explantes de cotiledones de tomate variedad Ailsa Craig, los tejidos utilizados en cada experimento de transformación se muestran en la tabla 4.

<b>Tabla 4. Transformación de cotiledones de tomate</b>					
<b>Plásmido</b>	<b>Explantes infectados</b>	<b>Formación de callo</b>	<b>Brotes</b>	<b>Plantas R<sup>1</sup></b>	<b>Plantas T<sup>2</sup></b>
<b>p2x35S-ERF1</b>	150	58	55	5	3
<b>p2x35S-ERF5</b>	150	69	47	23	10
<b>p2x35S-Pti4</b>	110	35	23	2	-
<b>p2x35S-ERF3b</b>	100	45	27	15	7
<b>p2x35S</b>	100	29	10	3	2
<b>Control de regeneración</b>	10	10	10	9	0
<sup>1</sup> : Plantas regeneradas; <sup>2</sup> : Plantas transformadas					

En la figura 16, se muestra el crecimiento de uno de los brotes transformados con el vector p2x35S-ERF1, el cual se mantuvo en medio MS con el antibiótico de

selección de kanamicina en una concentración de 100mg/L, hasta la formación de raíces.

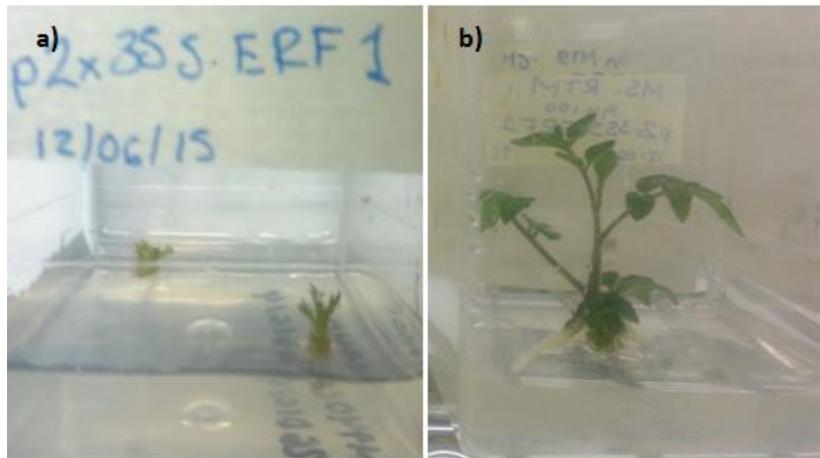


Figura 16 Transformación genética de tomate mediada por *A. tumefaciens*. a) brote obtenido del proceso de cultivo de tejidos posterior a la transformación. b) Proceso de inducción de raíces en medio RTM.

### 6.5. Análisis molecular de las plantas transgénicas

Las líneas regeneradas de la transformación genética se analizaron y seleccionaron en primera instancia solo aquellas plantas verdes sin signos de clorosis, características de resistencia a Kanamicina, posteriormente se analizaron molecularmente seleccionando aquellas que presentaran la inserción del T-DNA el cual se determinó con la amplificación del gen de resistencia a Kanamicina *NPTII* y la fusión *AMV-ERF* para cada línea transformada a partir de ADN genómico. De acuerdo a la tabla 4, las plantas obtenidas se emplearon para el análisis y comprobación de líneas transgénicas de los factores de transcripción, en la figura 17, se observa la amplificación positiva del gen de selección *NPTII*, a partir de ADN genómico de cada una de las plantas que formaron raíz en cultivo *in vitro* dando como resultado 3 líneas positivas para plantas que sobreexpresan el factor *ERF1*, 10 líneas positivas para el factor *ERF5* y 7 líneas para el factor *ERF3b*, y ninguna positiva para el factor *Pti4*, como se muestra en la tabla 4.

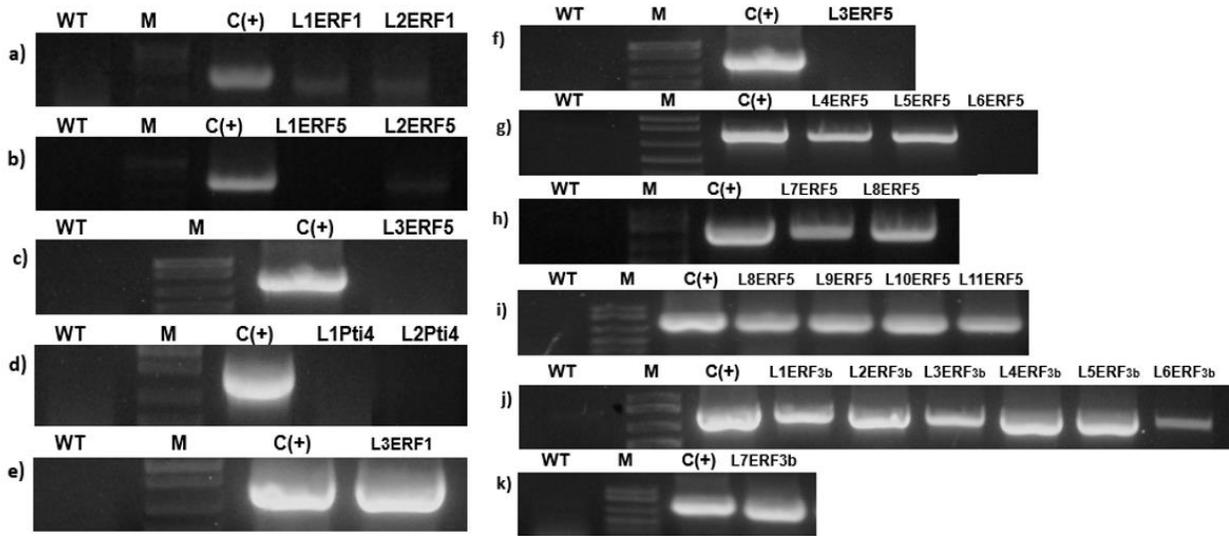


Figura 17 Amplificación por PCR del gen de resistencia a kanamicina *NPTII* en plantas de diferentes líneas transgénicas. a) amplificación positiva del marcador para líneas generadas con el factor L1 y L2ERF1; b) Amplificación del gen marcador para L2ERF5; c) Sin amplificación del gen marcador para L3ERF5; d) Sin amplificación del gen marcador para L1 y L2Pt4; e) amplificación positiva del marcador para la línea L3ERF1; f) Sin amplificación del gen marcador para L3ERF5; g) Amplificación positiva del gen marcador para L4 y L5ERF5; h-i) Amplificación positiva del gen marcador para L7 –L11ERF5; j-k) Amplificación positiva del gen marcador para L1-L7ERF3b-

Además, se realizó la amplificación de los factores ERF transformados en cada una de las líneas positivas, es decir para aquellas que amplificaron el gen de selección, para poder diferenciar el factor de transcripción endógeno del transgen, se diseñó un cebador específico para amplificar desde la región del *enhancer* transcripcional AMV hasta el final de cada factor de transcripción como se muestra en la figura 18

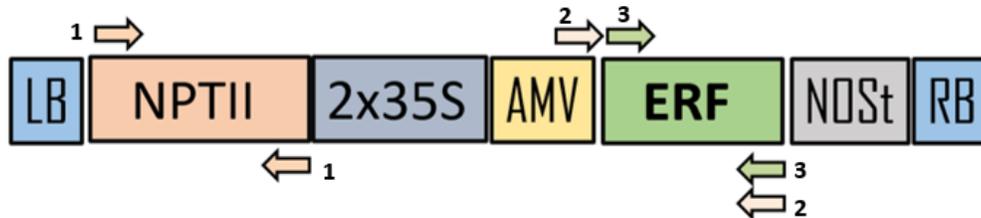


Figura 18 Representación del T-DNA para cada uno de los factores de transcripción y sitios de anclaje de los cebadores (flechas). 1) Oligonucleótidos empleados para amplificar el gen de selección *NPTII*, 2) Oligonucleótidos empleados para amplificar el transgen *ERF*, 3) oligonucleótidos empleados para amplificar el gen endógeno.

Esto permitió la amplificación específica del transgén ya que en la secuencia promotora de los factores nativos no se encuentra la región del AMV, lo que da lugar solo a la amplificación de un fragmento del T-DNA de cada una de las líneas transgénicas como se muestra en la figura 19, que además se corrobora que en las líneas silvestres (WT) no hay amplificación del gen.

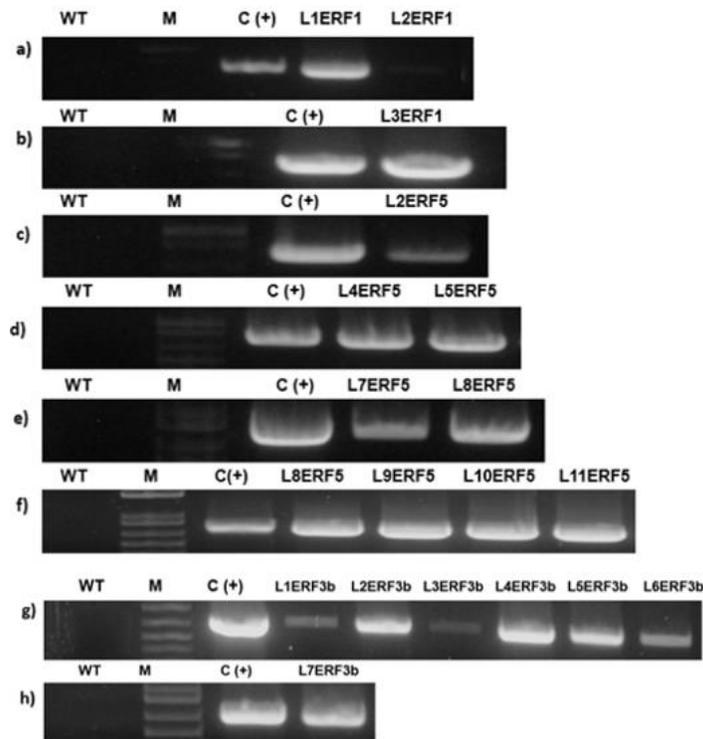


Figura 19 Amplificación por PCR del fragmento AMV-ERF (ERF1/3b/5) a partir de DNA genómico de plantas de diferentes líneas transgénicas de tomate y WT. a-b) líneas transformadas positivas ERF1, c-f) líneas transformadas positivas ERF5 y g-h) líneas transformadas positivas ERF3b.

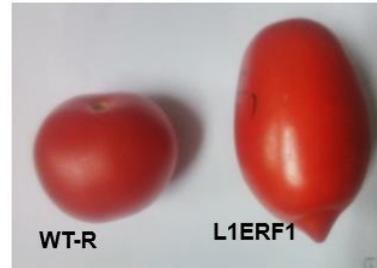
## 6.6. Segregación de líneas transgénicas de tomate

Se generaron líneas transgénicas ERF1, ERF3b y ERF5. Se generaron dos líneas transgénicas ERF1, sin embargo, no fue posible llevarlas a líneas homocigas, frutos de la generación filial 1 y 2 (F1 y F2) presentaron bajo contenido de semillas, así como defectos en el desarrollo debido a que la planta crece más pequeña, de forma arbustiva y con frutos alargados (Figura 20).

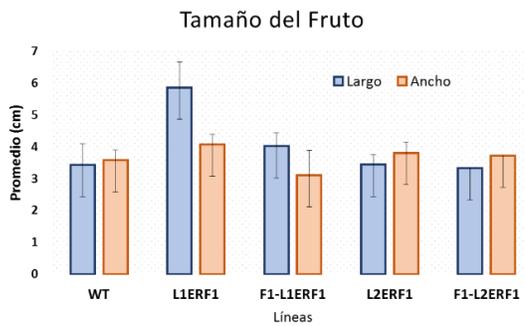
a)



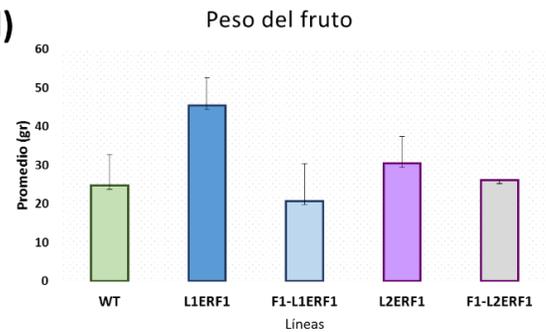
b)



c)



d)



e)

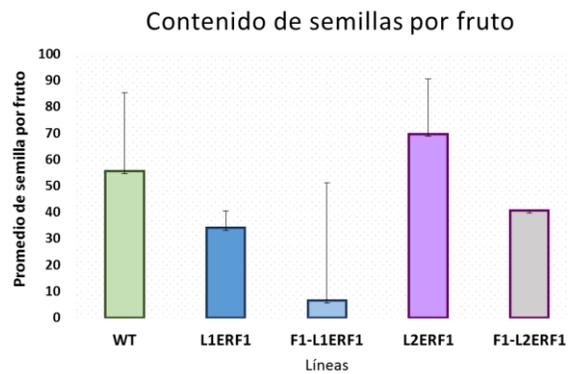


Figura 20 Características de líneas transgénicas de tomate ERF1. a) Fenotipo de líneas de tomate silvestre (WT) y de regeneración (WT-R) y en comparación con la línea transgénica ERF1; b) comparación de fruto de tomate WT y línea transgénica ERF1, c) Promedio del tamaño del fruto de tomate de líneas transgénicas ERF1 (F1 y F2) en comparación con la línea silvestre. d) Promedio del peso de tomate de líneas transgénicas ERF1 (F1 y F2) en comparación con la línea silvestre y e) Promedio en el contenido de semillas por fruto de tomate de líneas transgénicas ERF1 (F1 y F2) en comparación con la línea silvestre.

Sin embargo, al segregar la línea homociga para la amplificación de semillas de *ERF1*, las plantas presentaron defectos en el desarrollo de raíz y no se lograron obtener plantas adultas (Figura 21).



Figura 21 Fenotipo de plantas seleccionadas como línea homociga transformadas con el gen *ERF1*. a) Plantas *ERF1* en medio de selección. b) Aspecto de raíces de plantas en medio de selección. c) Plantas *ERF1* un mes después de ser individualizadas en maceta no se desarrollan de manera normal.

Con estos resultados, a partir de plantas F2 sobreexpresantes de *ERF1* se determinó mediante RT-PCR la expresión de cuatro genes: *ERF1*, *NPTII*, el segmento *AMV-ERF1*, *ERF3b* en comparación con el control de expresión *EF1 $\alpha$* , este análisis se realizó a un nivel de saturación en la amplificación por 30 ciclos (Figura 22), debido a que en un menor ciclaje (25 ciclos) no se observó la amplificación de los genes de interés *ERF1* y *AMV-ERF1*, además de incluir la amplificación de otro gen que no fuera parte del T-DNA.

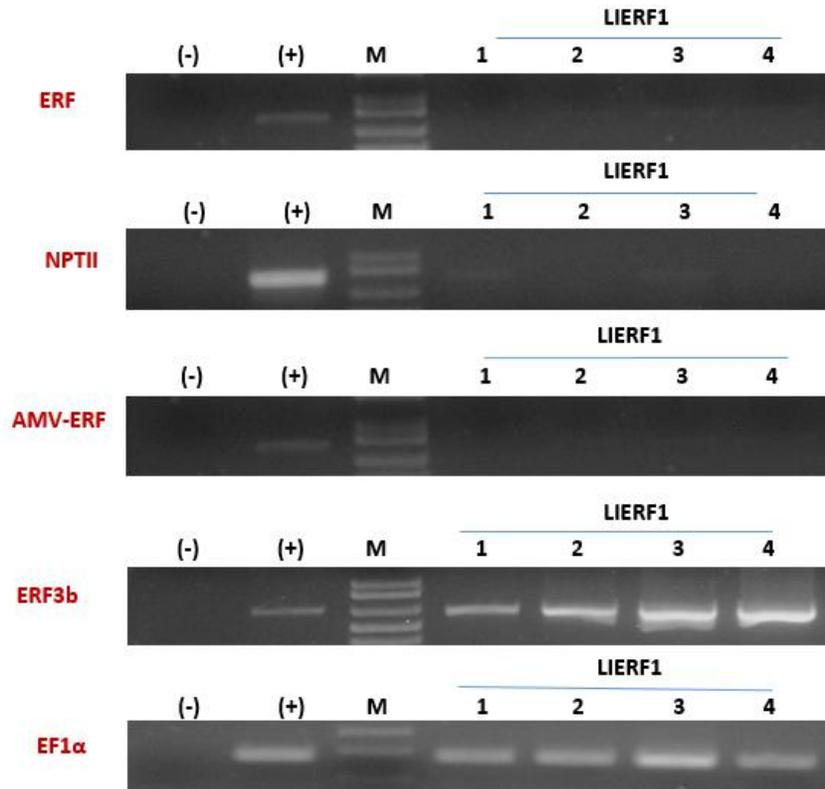


Figura 22 Análisis de expresión mediante RT-PCR de plantas de la línea transformada L1ERF1 (F1). Amplificación por 30 ciclos del gen endógeno *ERF1*, genes que conforman el T-DNA (*NPTII* y *AMV-ERF1*, el gen endógeno *ERF3b* en comparación con el factor de elongación (*EF1α*) empleado como control de expresión.

Del factor *ERF5* se obtuvieron 10 líneas transgénicas y 7 del factor *ERF3b*, estas se cultivaron en condiciones de invernadero hasta la obtención de frutos y semillas, las cuales se emplearon para su segregación (F1). Semillas de cada línea transgénica se germinaron en Kanamicina y se seleccionaron aquellas que presentaron una segregación mendeliana 3:1 con respecto al agente de selección, así como por la amplificación mediante PCR de *NPTII* y la fusión *AMV-ERF*, las líneas positivas se cultivaron y se obtuvieron las semillas de la filial 2 (F2), las cuales se germinaron en medio con Kanamicina y se seleccionaron aquellas líneas que presentaron el 100% de plantas resistentes al antibiótico y positivas para la inserción del T-DNA. Se seleccionó una línea homociga, independiente y sobreexpresante del factor *ERF3b* y una sobreexpresante para el factor *ERF5* (Figura 23) para los análisis posteriores.

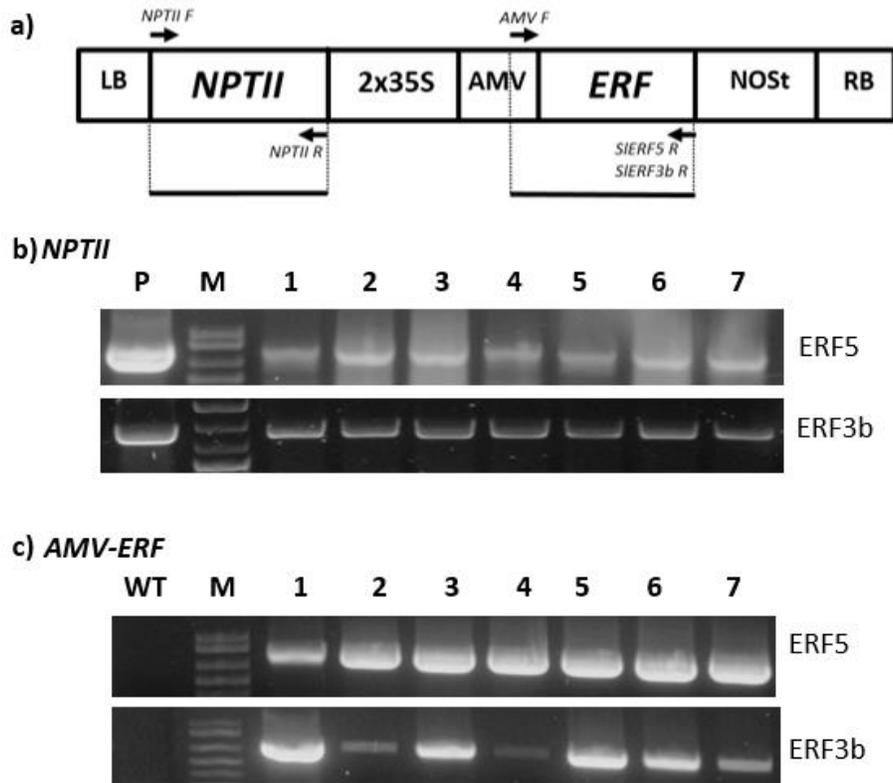
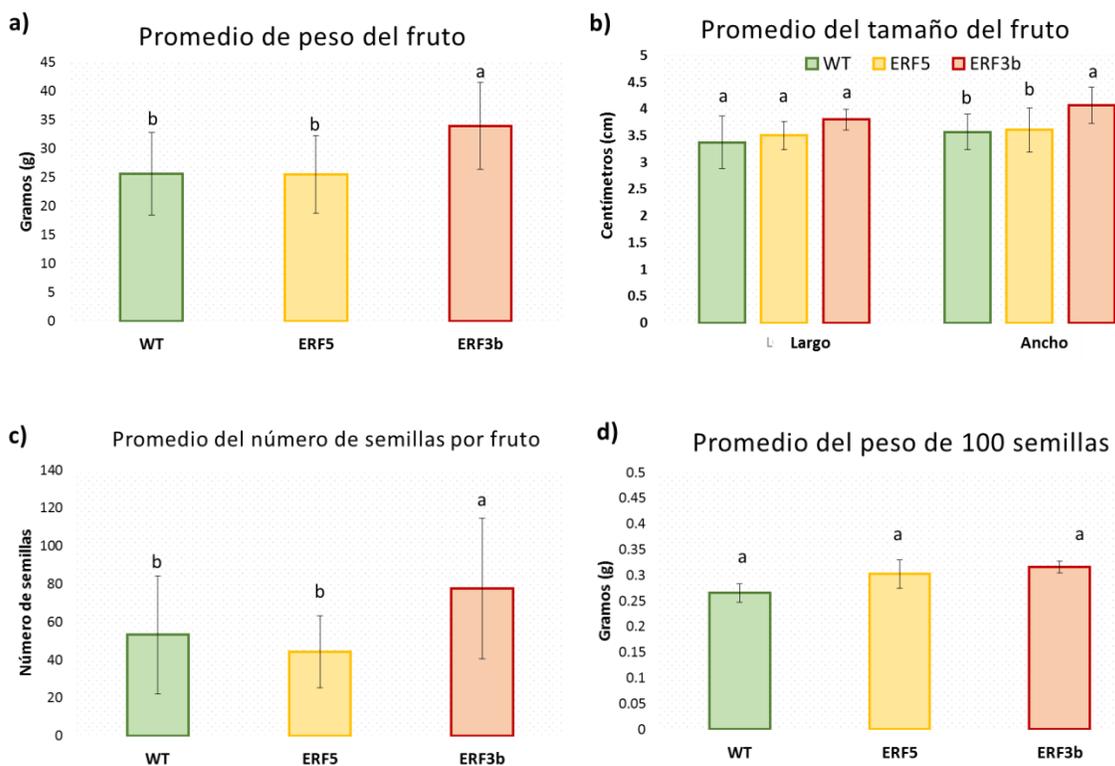


Figura 23 Inserción de T-DNA en las líneas transgénicas ERF3b y ERF5. a) Representación del T-DNA, y sitios de anclaje de oligonucleótidos, para la amplificación de los genes de interés. b) amplificación del gen *NPTII* en 7 plantas de la línea homocigota seleccionada. c) amplificación de la inserción de AMV-ERF en 7 plantas de la línea homocigota ERF5 y ERF3b.

### 6.6.1. Características fenotípicas de líneas transgénicas homocigotas

Se determinó el efecto de la expresión del gen exógeno en las características del fruto de dos líneas transgénicas (ERF5 y ERF3b) con respecto a la línea silvestre, de acuerdo a los resultados (Figura 24), el promedio del peso del fruto, su tamaño (largo y ancho), así como el contenido de semillas por fruto y el promedio del peso de 100 semillas, se observó que los frutos en la línea transgénica ERF5 se comporta de igual forma que la línea silvestre al no mostrar diferencias significativas en peso, tamaño, contenido de semillas del fruto y el peso de las semillas, en cambio la línea ERF3b presenta frutos con mayor peso 33.94g, tamaño con valores de 3.79cm de alto y 4.06 cm de ancho, así como mayor número de semillas por fruto (77.6 ), en comparación con la línea ERF5 y la línea

silvestre que presentan un peso de 25.48 y 25.66g, un tamaño de 3.5 y 3.37cm de largo, 3.6 y 3.56cm de ancho, y en cuanto al número de semillas 44.2 y 53.23 respectivamente; en el peso de semillas ninguna línea presentó diferencias significativas. Con esto podríamos inferir que ERF3b regula positivamente el desarrollo de los frutos de tomates y en la producción de semillas al ejercer represión de genes. Cabe señalar que plantas de las líneas transgénicas se caracterizó por una floración temprana, hasta 23 días antes con respecto a la línea silvestre. Las flores son visiblemente más grandes en las líneas transgénicas y presentan de 5 hasta 8 pétalos, la WT presenta de cinco a seis pétalos (Figura 25).



**Figura 24 Características fenotípicas de frutos de tomate de líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre. a) promedio del peso del fruto de 50 tomates, b) promedio del tamaño del fruto de 50 tomates, c) promedio del número de semillas por fruto de 50 tomates, d) promedio de peso de 100 semillas por triplicado. Los valores representan la media, las diferencias estadísticas fueron determinadas con ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ), donde las medias con misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar.**

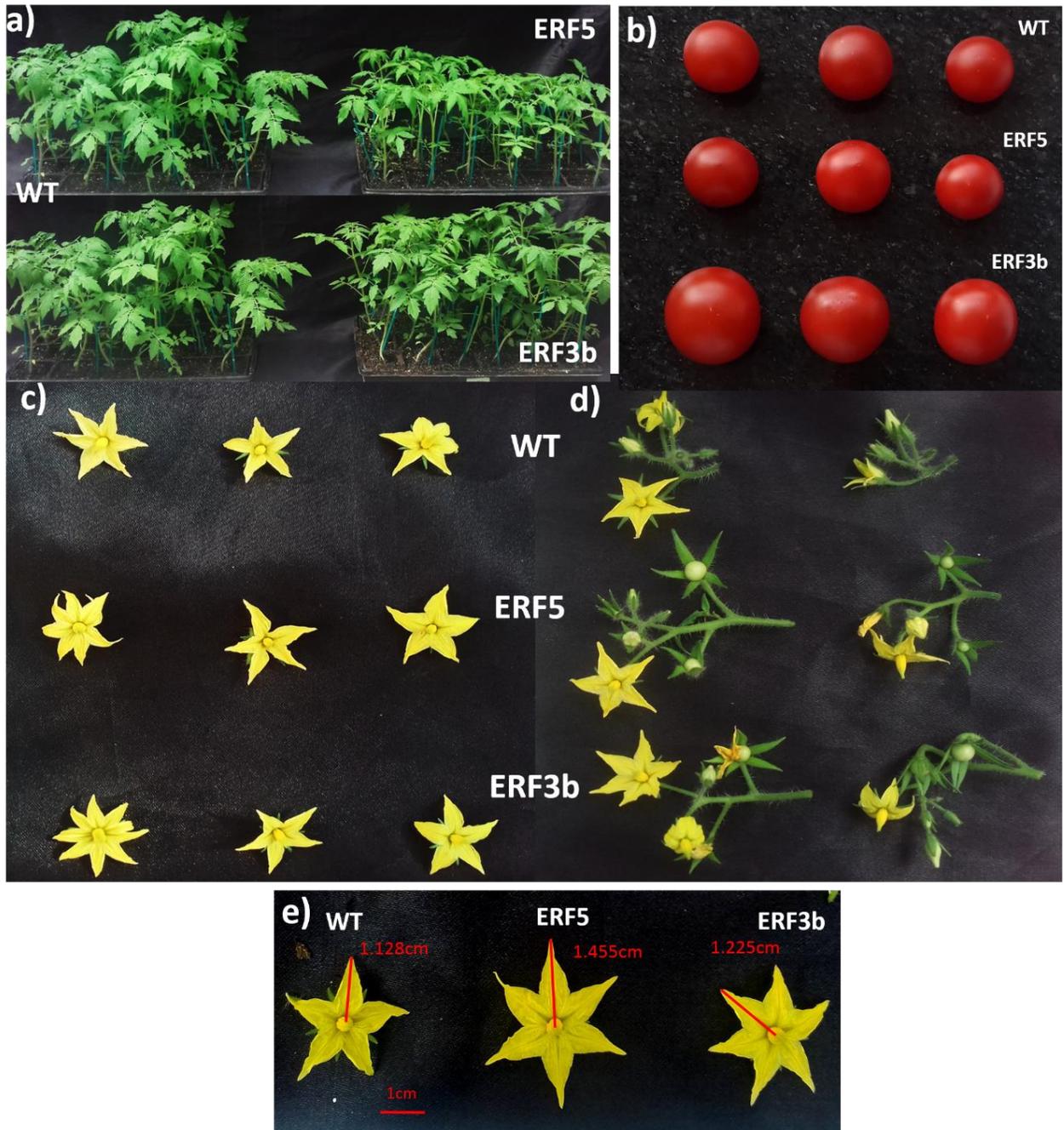


Figura 25 Características fenotípicas de las líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre. a) Plantas de un mes de edad, b) Tamaño del fruto de tomate, c) Flores, d) Grupo de flores, e) tamaño de la flor.

## 6.7. Análisis de expresión de factores ERF y genes blanco

Para cada línea homociga sobreexpresante ERF5 y ERF3b, se analizó la expresión de cuatro genes; los factores *ERF5* y *ERF3b*, así como dos genes de respuesta a condiciones de estrés como *P5CS* y *APx* (pirrolina-5-carboxilato sintetasa y ascorbato peroxidasa, por sus siglas en inglés respectivamente). En base a los resultados (Figura 26), se observó que en la línea transgénica ERF5 los niveles de expresión de *ERF5* fueron de 1.81, lo cual representa un incremento de 0.8 veces con respecto a la línea silvestre, mientras que la expresión del factor *ERF3b* fue de 2.28, es decir 1.28 veces más que la línea WT, demostrando que un aumento en los niveles de expresión de *ERF5* induce ligeramente los niveles de expresión de *ERF3b*, lo que nos sugiere que es un gen blanco en la regulación positiva de ERF5, con respecto a los genes de respuesta *P5CS* y *APx*, se observó una expresión relativa de 8.32 y 6.33 respectivamente, lo que indica un incremento de 7.32 y 5.33 veces más con respecto a la línea WT.

En la línea transgénica ERF3b, el factor *ERF3b* presentó una expresión relativa de 2.1, con respecto a la línea WT presentó un incremento de 1.11 veces más, en cuanto a *ERF5* el nivel de expresión fue de 7.26, lo que representa un incremento de 6.26 veces más que la línea WT y 5.45 veces más que la línea transgénica ERF5, esto significa que el efecto de represión que ejerce ERF3b sobre sus genes blanco, desencadena significativamente la expresión de *ERF5*, por lo que podríamos suponer que ERF3b podría regular la expresión positiva de otros factores ERF; ejerciendo una regulación negativa. La expresión de los genes de respuesta *P5CS* y *APx* en la línea ERF3b fue de 9.14 y 8.14 respectivamente en comparación con la línea transgénica ERF5 la diferencia de expresión fue de 0.83 y 1.81 respectivamente, mientras que el cambio de expresión en comparación con la línea WT fue de 8.14 y 7.14 veces más respectivamente.

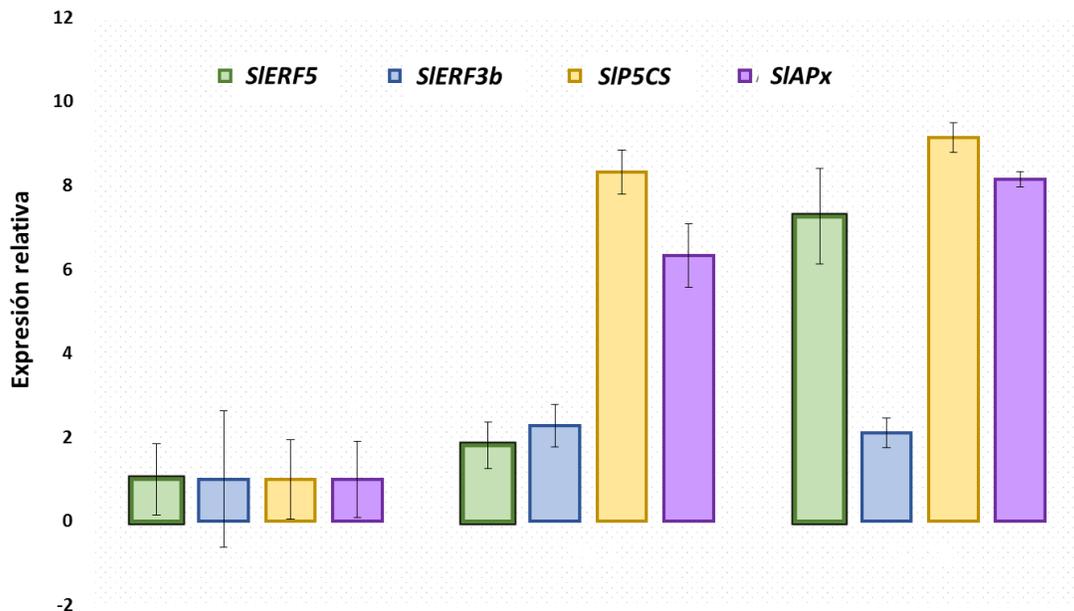


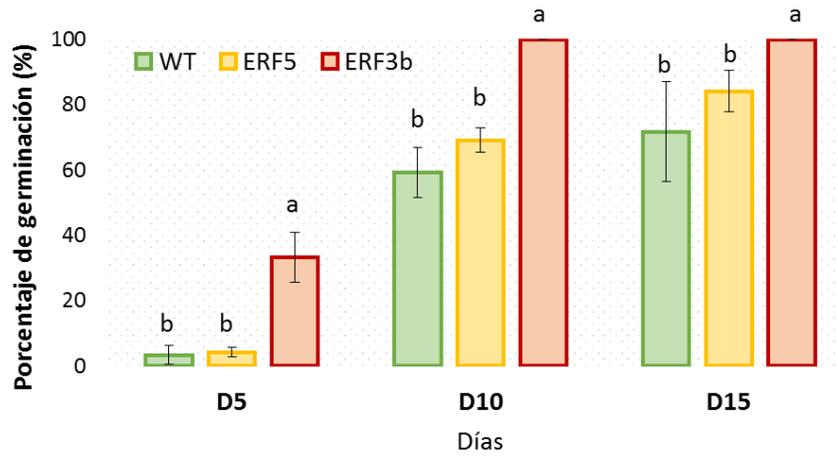
Figura 26 Expresión relativa de factores ERF y genes blanco (*P5CS* y *APx*) de líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre. Los valores representan el  $\Delta\Delta Ct$ , las diferencias estadísticas fueron determinadas con ANOVA de una vía y una prueba T de Bonferroni ( $\alpha= 0.05$ ). Las medias con misma letra no son significativamente diferentes y las barras de error indican la desviación estándar.

### 6.8. Evaluación de la germinación en condiciones de estrés de líneas transgénicas

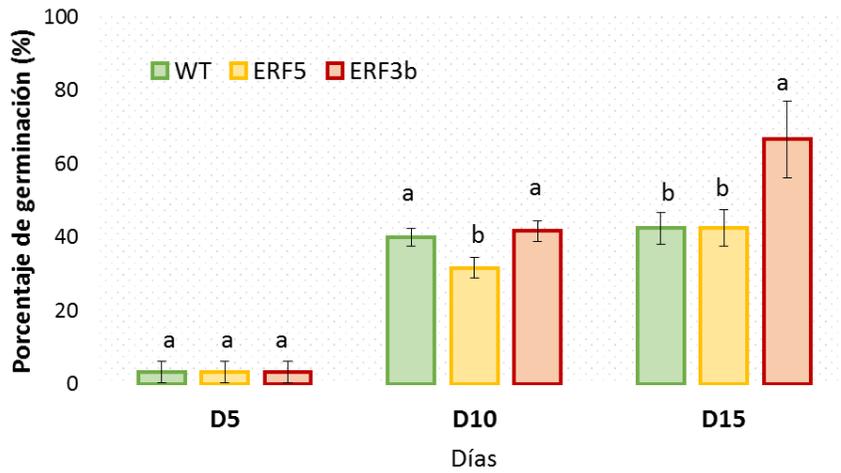
En condiciones normales de crecimiento la línea transgénica ERF3b presentó el 100% de germinación en menor tiempo con respecto a la línea ERF5 y WT que presentaron un menor porcentaje de germinación del 84.16 y 71.66% respectivamente (Figura 27a). En condiciones de estrés salino (NaCl) se observó una disminución en la germinación tanto en las líneas transgénicas como para la línea silvestre (Figura 27b), se observó que para el día 5 y 10 las líneas ERF3b y WT no presentaron diferencias significativas (3.33% para el día 5 en ambas líneas y 41.66% y 40% para el día 10 respectivamente), sin embargo para el día 15 la línea ERF3b presentó el mayor porcentaje de germinación (66.67%) en comparación con la línea ERF5 (42.5%) y WT (42.5%). En cuanto al estrés

causado por LiCl (Figura 27c) se observa que las líneas WT y ERF5 presentan un fenotipo de mayor sensibilidad a esta condición, mostrando un menor porcentaje de germinación al día 15 (13.33% y 6.66% respectivamente), en comparación con otras condiciones de estrés, lo que significa que el LiCl es capaz de afectar significativamente la germinación, sin embargo la línea ERF3b presentó mayor tolerancia con un porcentaje de germinación del 58.33%. En el estrés osmótico causado por sorbitol (Figura 27d) para el día 15 la línea transgénica ERF3b presenta el mayor porcentaje de germinación (46.66%) en comparación con la línea ERF5 (43.33%) y la línea WT (35.83%). El metil viológeno (MV), es un compuesto capaz de desarrollar un efecto de estrés oxidativo en los organismos, en la Figura 27 (e, f y g) se muestra que en las diferentes concentraciones de MV (0.5 1.0 y 2  $\mu$ M), la línea ERF3b presenta tolerancia observándose solo un retraso en la germinación, con respecto a la condición control sin estrés, para alcanzar a partir del día 10 el 100% de germinación. En cuanto a la línea ERF5 y la silvestre, no se mostraron diferencias significativas en los tres tratamientos con MV y se observó un fenotipo de sensibilidad al agente oxidante.

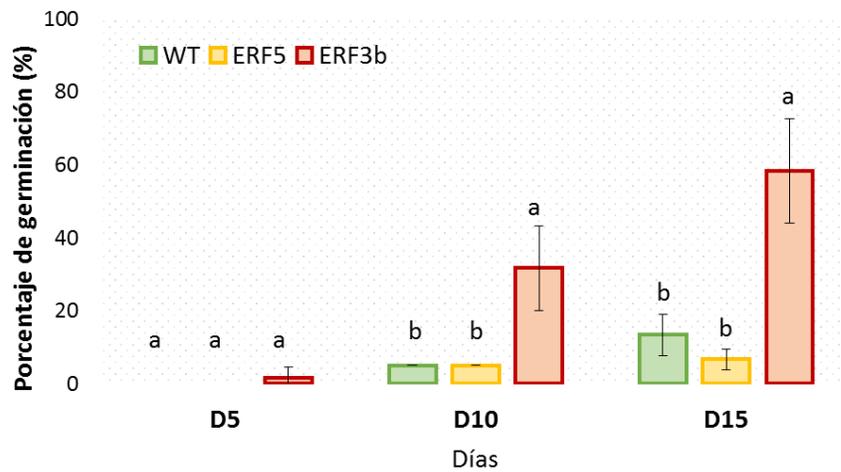
**a) Control de germinación**

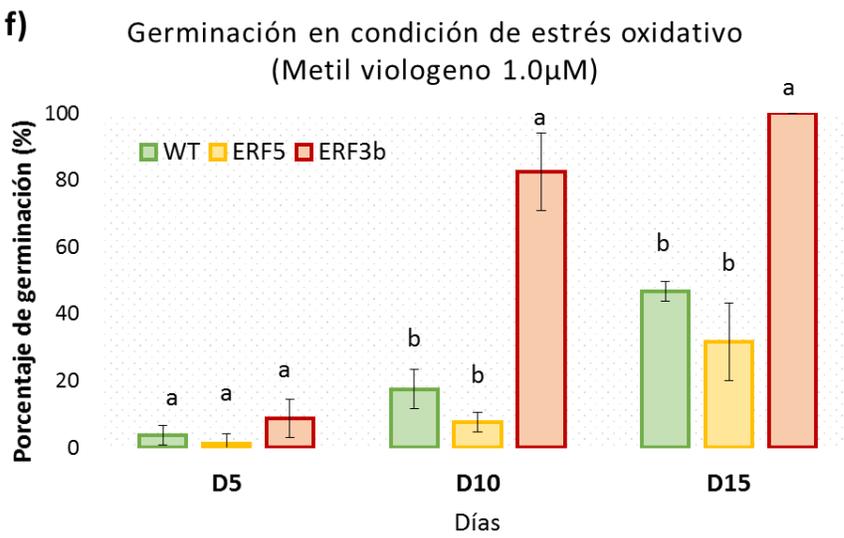
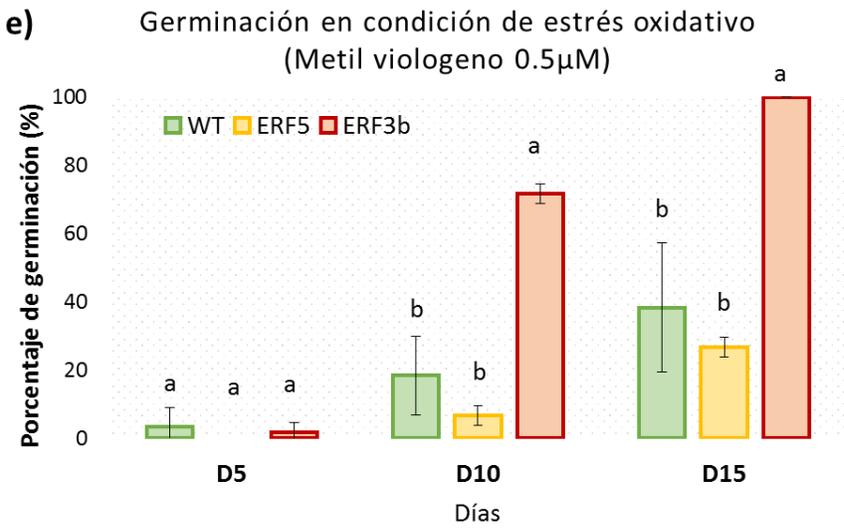
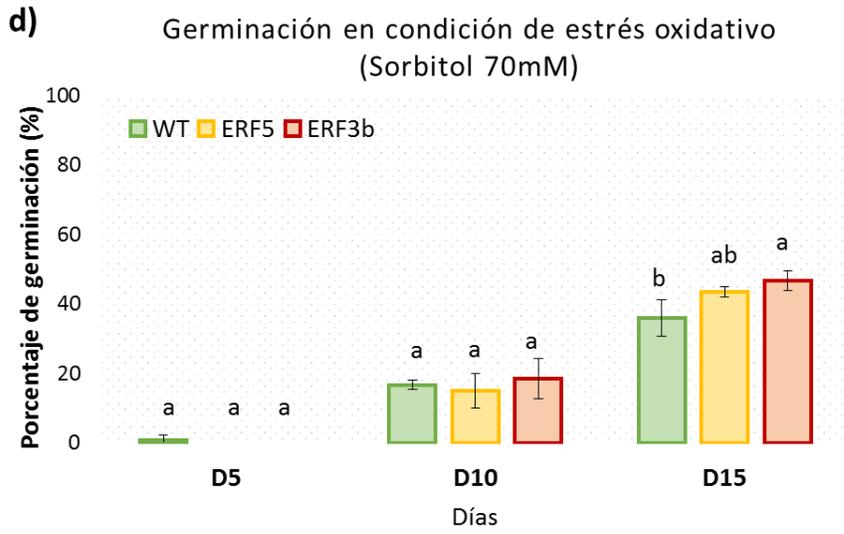


**b) Germinación en condición salina (NaCl 35mM)**



**c) Germinación en condición salina (LiCl 25mM)**





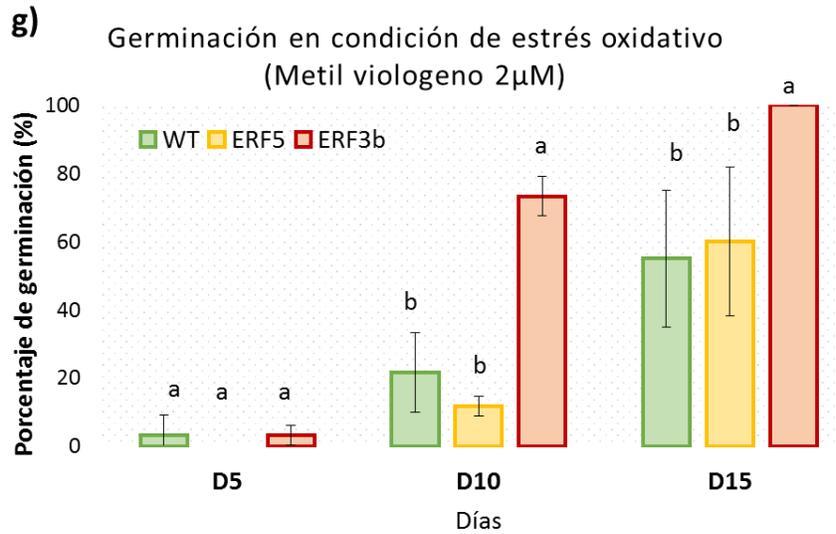


Figura 27 Efecto de la germinación en semillas de las líneas transgénicas comparadas con la línea silvestre. a) Condición sin estrés o control, b) estrés salino por cloruro de sodio (NaCl 35mM), c) estrés salino por cloruro de litio (LiCl 25mM), d) estrés osmótico por sorbitol (sorbitol 70mM), e, f y g) estrés oxidativo por metil viológeno (0.5, 1.0 y 2  $\mu$ M). Los valores representan la media, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ), donde las medias con misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de 3 réplicas con 25 semillas.

### 6.9.Efecto de la sobreexpresión de ERF3b y ERF5 en condiciones de estrés

Plantas de tomate de un mes de edad de las líneas transgénicas ERF3b y ERF5, así como la línea silvestre WT fueron empleadas para evaluar su tolerancia en condiciones de estrés abiótico (salinidad y sequía), empleando el contenido de clorofila y MDA como indicadores para determinar el efecto negativo que ocasionan dichas condiciones, ya que cambios en su concentración pueden afectar significativamente procesos fotosintéticos y establecer el posible daño en membranas celulares. Además, se evaluó el efecto del herbicida Paraquat que ocasiona un fuerte estrés oxidativo en plantas, así como la susceptibilidad a la infección por el hongo *B. cinerea*.

### 6.9.1. Determinación del contenido de clorofila y MDA en condiciones de estrés

En condiciones de crecimiento sin estrés el contenido de clorofila, así como el contenido de MDA en la semana uno y dos no se observaron diferencias significativas para las líneas WT, ERF5 y ERF3b (Figura 28a, 28b, 28i y 28j).

En condiciones de estrés por sequía en la primera semana el contenido total de clorofila en plantas no presenta diferencias significativas, en cuanto al contenido de MDA se observó que la línea ERF3b presenta menor daño oxidativo en comparación con la línea ERF5 y WT con valores de 8.41, 12.96 y 11.58nmoles MDA/gPf respectivamente (Figura 28c y 28d). Para la segunda semana cuando la condición de sequía se ha prolongado, no se presentaron diferencias significativas en el contenido total de clorofila, sin embargo observamos que se presentó un incremento significativo en el contenido de chl*b* de la línea ERF3b (5.88mg/L) y WT (3.46mg/L) con respecto a la línea control sin estrés (Figura 28k), en cuando al estrés oxidativo, se observó que la línea ERF5 presentó menor contenido de MDA (28.08nmoles MDA/gPf), siendo la línea silvestre la más afectada significativamente (63.35 nmoles MDA/gPf) con respecto a las líneas transgénicas (Figura 28l).

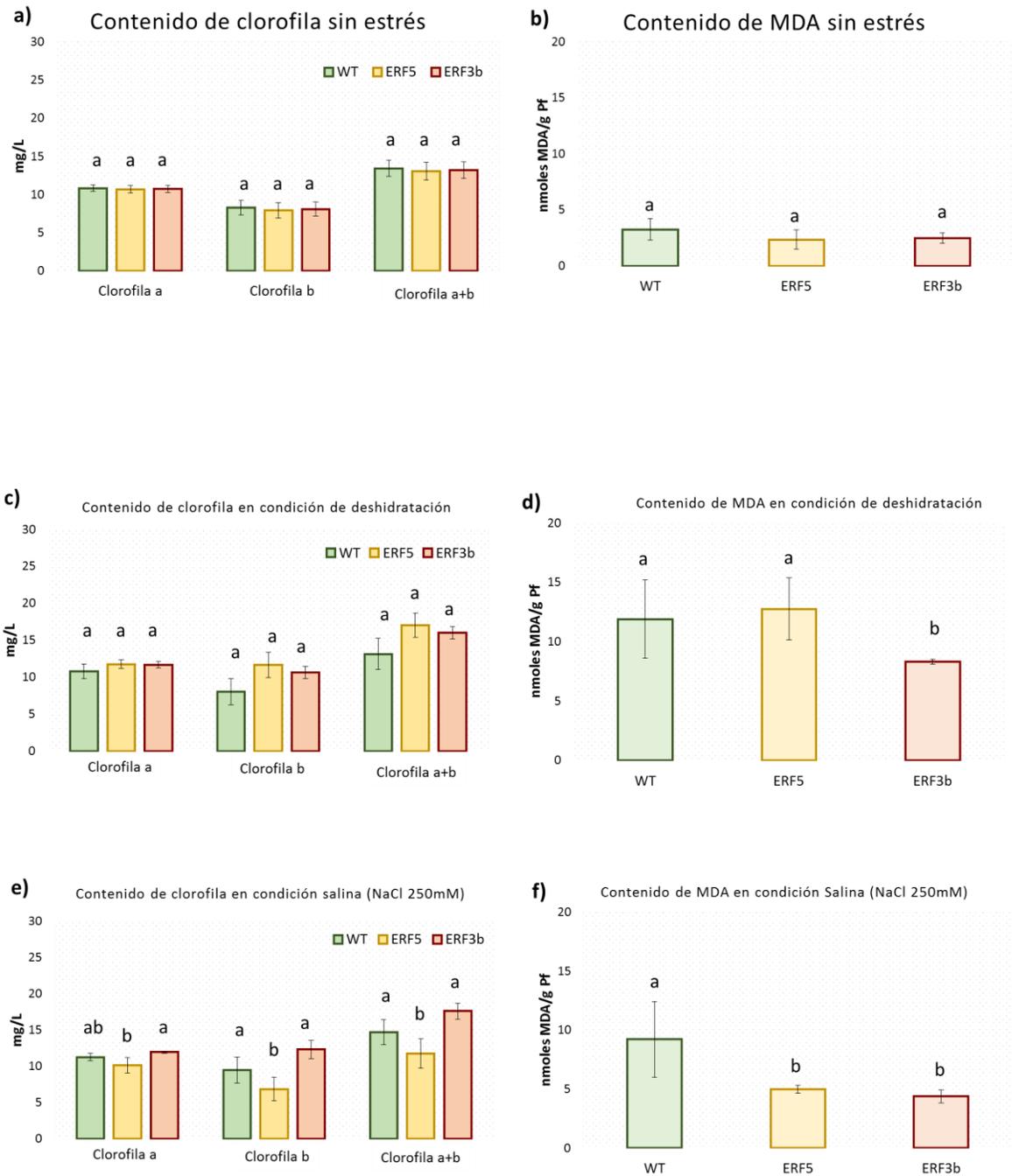
En condiciones de salinidad con riegos de NaCl en la primera semana observamos que la línea ERF5 presentó una menor concentración de clorofila *b* (6.84mg/L), con respecto a la línea WT y ERF3b (9.48 y 12.31 mg/L); pero al comparar el cambio en la concentración de estos pigmentos con respecto a las plantas control sin estrés, observamos que el contenido de clorofila *a* en la línea ERF5 se mantiene, sin embargo disminuye en el contenido de chl*b* (1.26 mg/L), por lo que consideramos que la disminución de clorofila *b* puede deberse a una conversión de clorofila *b* a clorofila *a*, en cuanto a la línea ERF3b y WT se incrementa el contenido chl*a* y chl*b* (1.18 y 4.21 mg/L y 0.42 y 1.2 mg/L respectivamente) (Figura 28e). Se observa también que las líneas transgénicas ERF5 y ERF3b presentan menor contenido de MDA (4.97 y 4.45nmoles MDA/gPf),

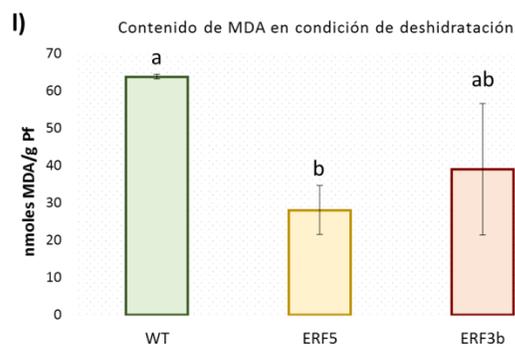
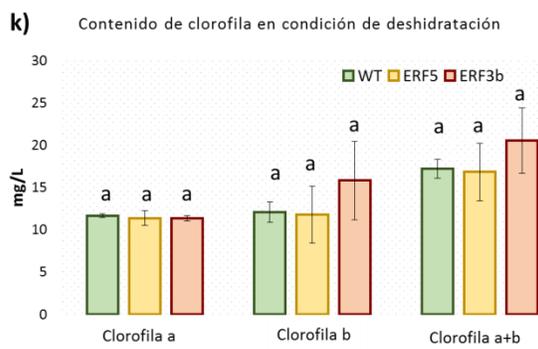
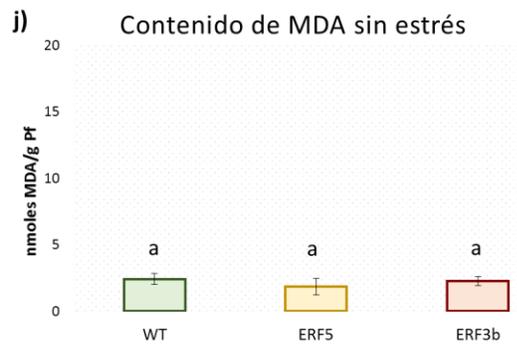
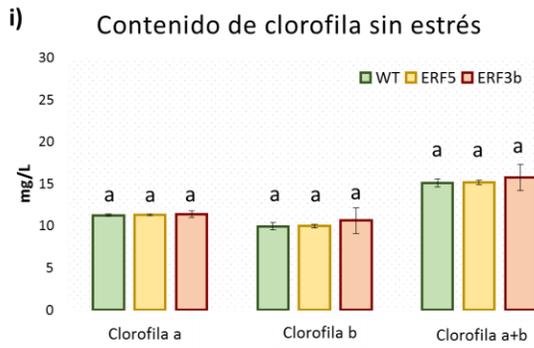
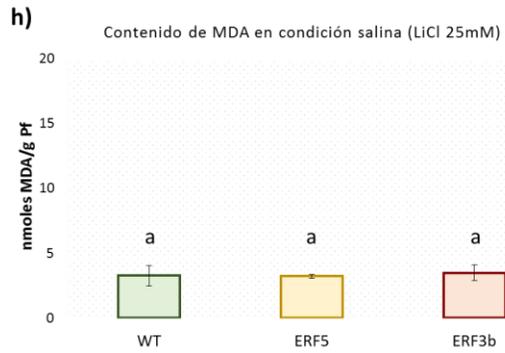
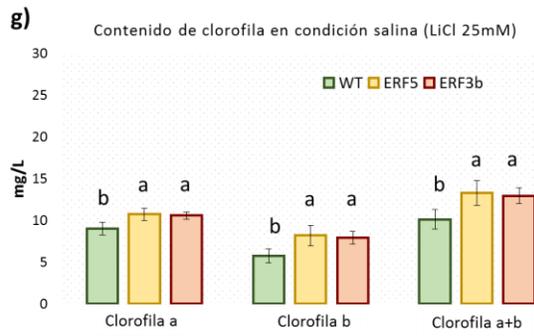
siendo la línea WT la más afectada significativamente (9.85nmoles MDA/gPf) por el estrés oxidativo (Figura 28f).

En la segunda semana de estrés salino (NaCl), las líneas transgénicas ERF3b y ERF5 presentaron mayores concentraciones de clorofila total (18.46 y 18.92 mg/L respectivamente) en comparación con la línea silvestre (11.94 mg/L) (Figura 28m), además se observó un incremento de 7.35 y 3.6 mg/L en el contenido de clorofila en las líneas ERF5 y ERF3b en comparación con plantas sin estrés. Con respecto al contenido de MDA, la línea ERF5 presentó menor daño oxidativo con una concentración más baja de MDA (20.6nmoles MDA/gPf), en comparación con la línea silvestre y ERF3b (34.98 y 41.0nmoles MDA/gPf respectivamente) (Figura 28n). Cabe destacar que las líneas WT y ERF3b presentan mayor sensibilidad al estrés oxidativo por una prolongada exposición a NaCl en comparación con ERF5, sin embargo, las concentraciones de MDA en salinidad son menores en comparación con el estrés por sequía, en cambio, la línea ERF5 presentó mayor oxidación en condiciones salinas en comparación con el estrés hídrico.

El estrés ocasionado por LiCl en la primera semana (Figura 28g) se observó un mayor contenido de clorofila total ( $a+b$ ) en las líneas transgénicas ERF5 y ERF3b (13.29 y 12.96 mg/L respectivamente), mientras que en la línea WT se presentó menor concentración (10.14 mg/L). Para la segunda semana de estrés (Figura 28o), la línea silvestre presentó una disminución en el contenido total de clorofila (3.84 mg/L) con respecto a la línea WT sin estrés, en cuanto a las líneas transgénicas ERF5 y ERF3b, en condiciones de estrés presentaron mayores concentraciones de clorofila (13.19 mg/L y 12.96 mg/L respectivamente), sin embargo en comparación con las plantas sin estrés, la línea ERF3b presentó una reducción de 1.88 mg/L, siendo la línea ERF3b y WT más sensibles a esta condición. En cuanto al efecto de LiCl en el contenido de MDA no se presentaron diferencias significativas entre las líneas transgénicas y WT en las dos semanas de estrés (Figura 28h y 28p), sin embargo, en comparación con el estrés por sequía y salino (NaCl) el daño oxidativo fue significativamente menor lo que podría

indicar que el efecto de estrés por LiCl puede deberse como resultado de la toxicidad del  $\text{Li}^{3+}$ .





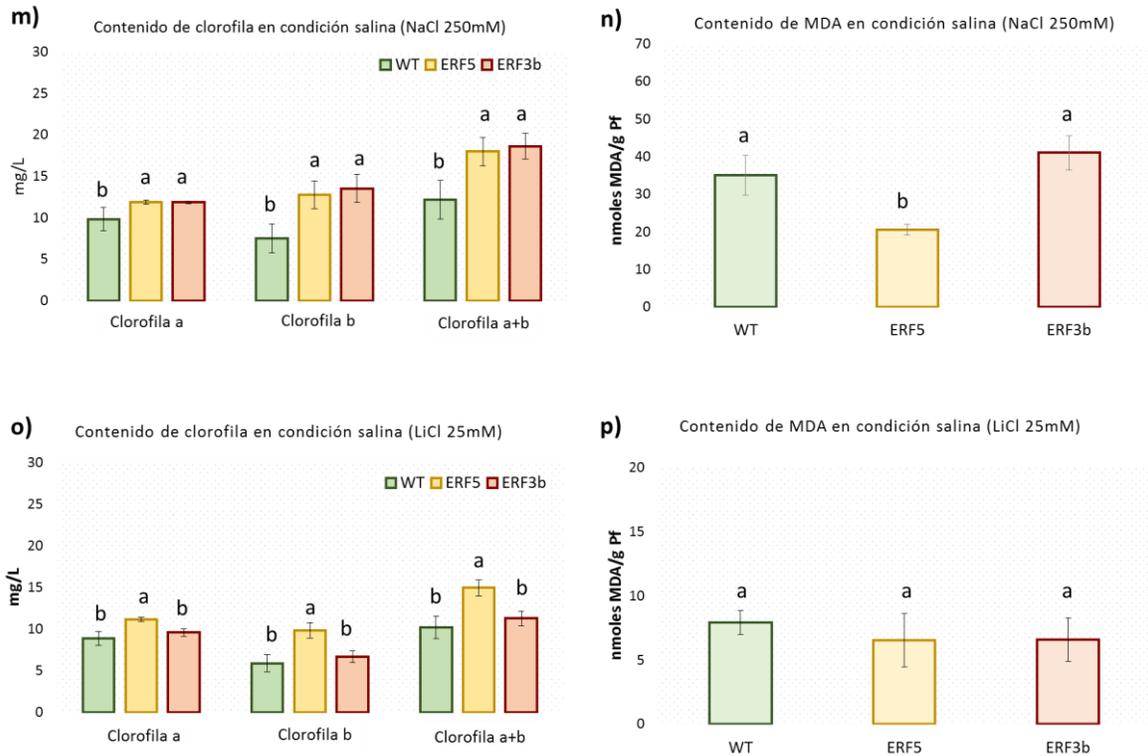


Figura 28 Efecto del estrés abiótico (salinidad y sequía) en el contenido de clorofila y MDA en plantas transgénicas ERF en comparación con la línea silvestre. Semana uno de exposición al estrés. a) Contenido de clorofila, condición sin estrés (control), b) Contenido de MDA, condición sin estrés (control), c) Contenido de clorofila, condición de sequía, d) Contenido de MDA, condición sequía, e) Contenido de clorofila, condición de salinidad (NaCl 250mM), f) Contenido de MDA, condición de salinidad (NaCl 250mM), g) Contenido de clorofila, condición de salinidad (LiCl 25mM), h) Contenido de MDA, condición de salinidad (LiCl 25mM). Semana dos de exposición al estrés. i) Contenido de clorofila, condición sin estrés (control), j) Contenido de MDA, condición sin estrés (control), k) Contenido de clorofila, condición de sequía, l) Contenido de MDA, condición sequía, m) Contenido de clorofila, condición de salinidad (NaCl 250mM), n) Contenido de MDA, condición de salinidad (NaCl 250mM), o) Contenido de clorofila, condición de salinidad (LiCl 25mM), p) Contenido de MDA, condición de salinidad (LiCl 25mM). Los valores representan la media, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), donde las medias con misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de 5 repeticiones.

### 6.9.2. Análisis de tolerancia al herbicida Paraquat

En la secuencia de imágenes se observaron las plantas control antes de estar en contacto con el herbicida, (Figura 29a), seguido de las 24h y 48h (Figura 29b y 29c) donde se muestra el daño fisiológico que ocasiona el metil viológeno compuesto activo del Paraquat, afectando principalmente la línea silvestre. Una semana después (Figura 29d) se observó que las líneas transgénicas presentan una mayor tolerancia al herbicida, mientras que la línea WT presenta un mayor

deterioro, el cual para la segunda semana después de la aspersión (Figura 29 e-f) es imposible su recuperación en la mayoría de la plantas, mientras que las líneas transgénicas presentaron mayor tolerancia al estrés oxidativo, la línea ERF3b mostró un 100% de recuperación, seguida de la línea ERF5 (80%) y la línea silvestre más sensible con un 20% de recuperación.

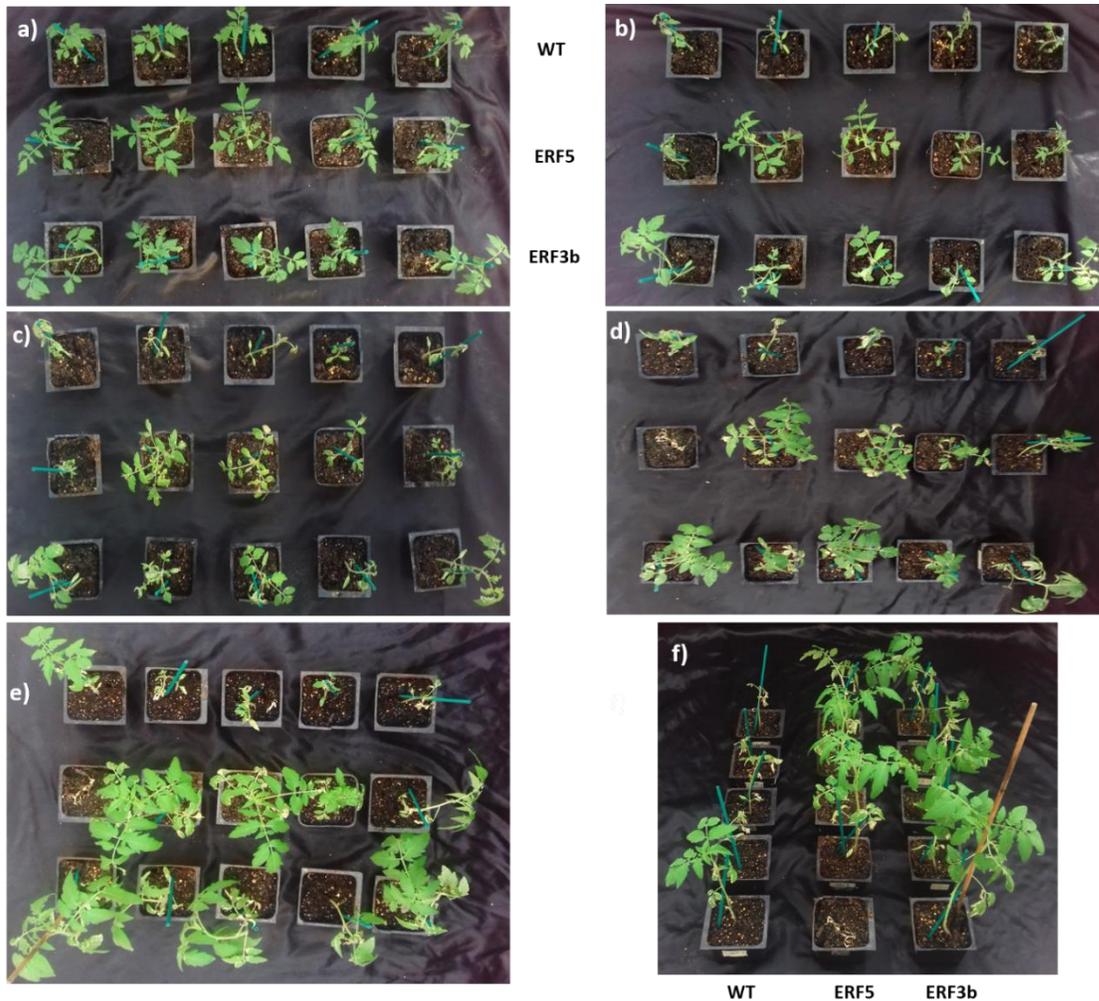


Figura 29 Secuencia del efecto de tolerancia del herbicida Paraquat en líneas transgénicas en comparación con la línea silvestre. a) Plantas control, b) Efecto del Paraquat en plantas después de 24h de su aspersión, c) Efecto del Paraquat en plantas después de 48h de su aspersión, d) Efecto del Paraquat en plantas después de 7 días de su aspersión e) y f) Efecto del Paraquat en plantas, después de 14 días de su aspersión, recuperación.

### 6.9.3. Análisis de tolerancia a la infección de *B. cinerea*

Plantas WT y transgénicas se infectaron con esporas de *B. cinerea*, se monitoreó el proceso de la infección en plantas hasta el día 5, los resultados muestran que las líneas transgénicas presentaron una mayor tolerancia a la infección, apenas desarrollando síntomas de enfermedad en las hojas (Figura 30a) y presentando un área de infección menor al 1% (Figura 30b), representado por una pequeña mancha necrótica en el sitio de infección, mientras que la línea silvestre ha desarrollado los síntomas de la enfermedad partir de las 48h de la inoculación, alcanzando un avance de infección que cubre el 40% del área de las hojas para el día cinco, con crecimiento de micelio, esporulación del hongo y clorosis en las hojas.

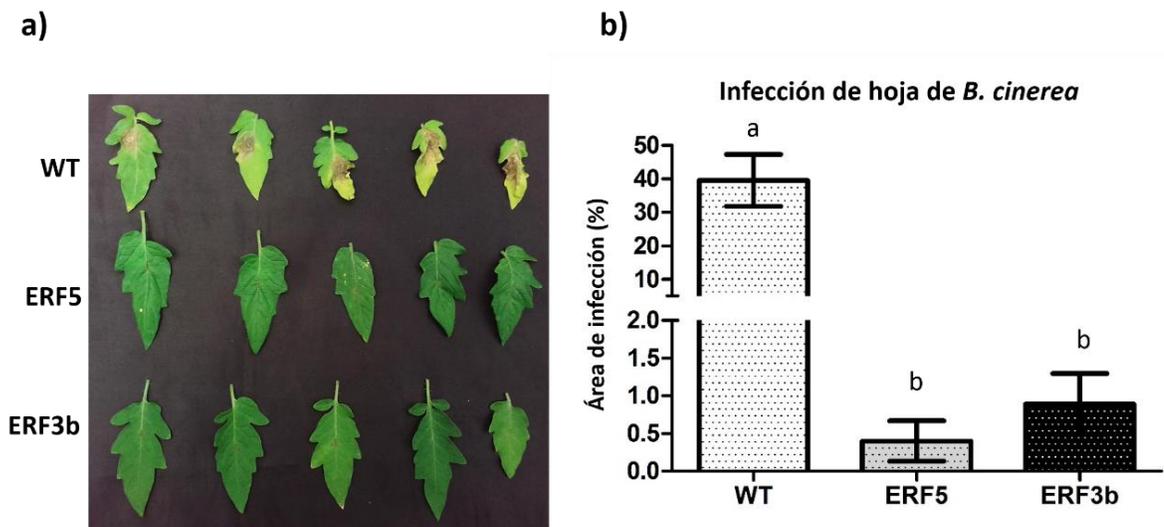


Figura 30 Tolerancia a la infección de *Botrytis cinerea* en plantas transgénicas comparadas con la línea silvestre 5 días después de la inoculación. a) Infección foliar de *B. cinerea*, b) Porcentaje del área de infección. Los valores representan la media, las diferencias estadísticas fueron determinadas con ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ), donde las medias con misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de 5 repeticiones por duplicado.

## 7. Discusión

Diversos estudios se han centrado en obtener información acerca del papel de los FT en diversos procesos de regulación en respuesta a diferentes condiciones de estrés en planta y en la última década en aquellos que pertenecen a la familia AP2/ERF, como los ERF. De acuerdo con los antecedentes se ha demostrado que tienen una importante participación en respuesta a estrés abiótico y biótico (Xu *et al.*, 2008; Mizoi *et al.*, 2012; Licausi *et al.*, 2013), pues se induce su expresión en condiciones estresantes y se ha probado que su sobreexpresión promueve la tolerancia a diferentes tipos de estrés.

### 7.1. Expresión espacio-temporal de factores ERF en diferentes tratamientos de estrés en plantas silvestre de tomate

Los genes de los factores *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5* fueron inducidos en condiciones de deshidratación y salinidad, atribuyendo esto a una participación en la regulación de la respuesta de defensa a estas condiciones de estrés abiótico. Se ha reportado que *ERF1* es inducido en condiciones de sequía en plantas de tabaco y tomate (Zhang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2010), este factor además presenta una alta homología con *ERF1* de *Arabidopsis*, el cual contribuye en la respuesta de defensa en condiciones de salinidad, sequía y temperaturas elevadas (Mao *et al.*, 2016), así como *ERF1* de trigo considerado un regulador positivo en la respuesta al estrés salino (Schmidt *et al.*, 2013). *ERF3b* es clasificado como un represor transcripcional al contener en su estructura un motivo EAR asociado a la represión de genes (Kagale y Rozwadowski, 2011); por lo que suponemos que este factor regula negativamente la respuesta de defensa a condiciones abióticas, se ha reportado que *ERF3b* se induce en condiciones de sequía, así como bajas temperaturas (Chen *et al.*, 2008), además diversos represores ERF juegan diferentes papeles durante el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en respuesta al estrés ambiental, como *AtERF4* (Yang *et al.*, 2005), en respuesta a estrés salino y sequía *GmERF3* (Zhang *et al.*, 2009). Se ha reportado que el factor *ERF5* se induce en condiciones de estrés abiótico, como salinidad, sequía, anegamiento, calor y por heridas en plantas de tomate (Pan *et*

*al.*, 2012), además este factor está altamente relacionado en secuencia de aminoácidos con *NtERF4*, *NsERF4* y *CaEREBP-C4* (Chuang *et al.*, 2010), y se ha reportado que *NtERF4* se induce fuertemente en condiciones de salinidad (Cao *et al.*, 2006), por lo que podemos atribuir su participación en la respuesta a condiciones de estrés abiótico.

De acuerdo con Ma y Bohnert (2007) un análisis en el perfil transcripcional de genes relacionados con el estrés en *Arabidopsis*, mostró que diversos FT presentan una participación dual ante diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico y son pocos aquellos que son específicos a una condición única, por lo que observamos una diversa participación de los factores ERF en respuesta a diferentes condiciones.

La trehalosa es un disacárido que se ha propuesto como un elicitador de la respuesta inmune en plantas (Fernandez *et al.*, 2010), se ha reportado que este disacárido induce la respuesta inmune contra patógenos en plantas; como *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* en trigo y el virus del mosaico del tabaco en *Arabidopsis* e inducir genes PR (Reignault *et al.*, 2001; Tayeh *et al.*, 2014; Golem y Cluver, 2003; Schluepmann *et al.*, 2004). De acuerdo con los resultados los factores *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5* se inducen en presencia del disacárido, por lo que asumimos se encuentran involucrados en la defensa contra el estrés biótico, sin embargo, bajo esta condición, el factor *ERF3b* se reprime considerablemente después de 30 minutos de haber sido inducido, por lo que podría tener un papel modulador más complejo en la respuesta de defensa durante los procesos de infección. Se ha reportado que *ERF1* contribuye en la defensa contra patógenos como *B. cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002) y *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo y Molina, 2004), en cuanto a *ERF3b* se ha descrito su participación en la respuesta en estrés abiótico, pero no en cuanto al estrés biótico, se ha reportado que la sobreexpresión de represores como *GmERF3* y *NtERF3* promueven la resistencia a patógenos en plantas de tabaco (Zhang *et al.*, 2009; Ogata *et al.*, 2012). También que la sobreexpresión de *ERF5*

en *Arabidopsis* induce la expresión de genes involucrados en las vías de señalización de resistencia a enfermedades (Chuang *et al.*, 2010).

## 7.2. Características de las líneas transgénicas

Las líneas transgénicas con el transgen *ERF1*, presentaron cambios fenotípicos como bajo contenido de semillas y frutos más alargados, sin embargo al segregar la línea homociga para la amplificación de semillas, las plantas presentaron defectos en el desarrollo de raíz y no se lograron obtener plantas adultas; de acuerdo con Solano y colaboradores (1998), la sobreexpresión homóloga de *ERF1* de *Arabidopsis* causa enanismo, inhibición del hipocotilo y elongación celular, escasas de semillas y un exagerado gancho apical; tomando en cuenta que resultados del análisis tipo BLAST en la base de datos Plant Transcription Factor (PlantTFDB4.0), *ERF1* de *S. lycopersicum* presenta una alta similitud con *ERF1* de *A. thaliana*, por lo que podríamos suponer que estos efectos se deben a la sobreexpresión del factor *ERF1*, sin embargo, cuando se analizó la expresión de los genes de interés en un filial anterior, la expresión del gen de resistencia fue muy baja con respecto al housekeeping *EF1 $\alpha$* , mientras que para el transgen *AMV-ERF1*, así como para el gen endógeno *ERF1* no se logró visualizar su expresión; por lo que podríamos suponer que para este factor de transcripción, su expresión se encuentra altamente regulada considerando la duplicación de genes en la planta, además se ha reportado anteriormente que las plantas tienen la capacidad de reconocer y modificar estas secuencias homologas, dando lugar a su inactivación, mediante el proceso llamado silenciamiento de genes dependientes de homología (HDGS por sus siglas en inglés), en donde el transgen puede co-suprimir su propia expresión, así como la del gen homólogo endógeno a nivel transcripcional o post-transcripcional (Cogoni *et al.*, 1994; Sijen y Kooter, 2000). En tomate se ha reportado que la introducción de una secuencia trunca del gen que codifica para la poligalacturonasa mostró ser suficiente para silenciar el gen endógeno (Smith *et al.*, 1990). Además de no observar la expresión de los factores de transcripción *ERF1*, endógeno y transgen también se observó una baja

expresión del gen de selección *NPTII* y de acuerdo a Cogoni *et al.*, 1994, se ha reportado que la introducción de una secuencia trunca del gen de la Nopalina sintasa (Nos), así como del gen de resistencia a kanamicina son ejemplos de co-supresión, lo que inactiva su expresión en plantas tabaco (Cogoni *et al.*, 1994), sin embargo para conocer la razón por la cual se dieron dichos resultados, es necesario realizar otros experimentos.

Se ha reportado que ERF5 y ERF3b poseen una importante participación en procesos de regulación en la maduración de frutos de tomate (Liu *et al.*, 2016). De acuerdo con los resultados, observamos que la línea transgénica ERF3b presenta frutos más grandes y con mayor número de semillas con respecto a la línea transgénica ERF5 y WT, esto nos hace suponer que ERF3b participa en una fuerte regulación negativa en promover el desarrollo del fruto, así como del contenido de semillas, y no solo como un factor implicado en el proceso de maduración de fruto y la acumulación de compuestos carotenoides (Liu *et al.*, 2016). El tamaño final del fruto se encuentra fuertemente regulado por giberelinas y auxinas, hormonas que participan en promover la división celular en las primeras etapas del desarrollo del fruto y la formación de semillas (Srivastava y Handa, 2005), además el número de semilla se ha relacionado con el tamaño final de fruto desde hace varias décadas (Varga y Bruinsma en 1976); cabe mencionar que ambos factores ERF5 y ERF3b son regulados por hormonas como Et y Aux aumentando sus niveles de expresión (Pirrello *et al.*, 2012); y considerando que los niveles de Et en las primeras etapas de desarrollo del fruto son bajos e incrementan en la etapa de maduración del mismo (Srivastava y Handa, 2005), suponemos que el efecto en el desarrollo del fruto es llevado a cabo por una vía de respuesta a auxinas, donde se involucra la participación de factores de la familia AP2/ERF, como ERF3b, aparte de la participación de los factores de transcripción de respuesta a auxina (ARF) (Catalá *et al.*, 2000). Tomando en cuenta que la sobreexpresión de ERF3b en las líneas transgénicas da lugar a frutos más grandes con mayor contenido de semillas, la regulación negativa de este factor influye en otro proceso fisiológico importante en tomate y es posible

considerar este factor como un gen potencial a emplearse para el mejoramiento de cultivos agrícolas de interés.

En cambio la sobreexpresión de ERF5 no produce cambios fenotípicos con respecto al fruto, aunque se ha demostrado su participación en el proceso de maduración (Liu *et al.*, 2016), por otra parte las líneas ERF5 y ERF3b presentan floración temprana, hasta 23 días antes con respecto a la línea silvestre y de acuerdo a Pirrello *et al.*, (2012) estos dos factores se expresan en flor, atribuyendo un papel en su desarrollo principalmente ERF3b, además se ha reportado que la sobreexpresión del represor *S/ERF36* en tabaco promueve floración temprana (Upadhyay *et al.*, 2013), por lo que podríamos atribuir este efecto a la sobreexpresión de los factores ERF5 y ERF3b.

La sobreexpresión de ERF5 y ERF3b induce la expresión de genes relacionados con el estrés como *P5CS* y *APx*, los cuales están implicados en promover la tolerancia en plantas (Ashraf y Foolad, 2007; Kavi Kishor *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2005; Gadea *et al.*, 1999), atribuyendo dicho resultado a un aumento en los niveles de prolina y enzimas antioxidantes, cabe mencionar que ERF3b actúa como regulador positivo de *ERF5* incrementando su expresión en la línea transgénica ERF3b, mientras que la expresión de *ERF3b* en la línea transgénica ERF5 se incrementó, sin embargo podemos decir que ERF3b regula preferencialmente la expresión de *ERF5*, mientras ERF5 debilmente induce la expresión de *ERF3b*.

### **7.3. Efecto de la germinación en condiciones de estrés**

La germinación es una de las primeras y más importantes etapas en el ciclo de vida de las plantas que asegura la siguiente generación (Pirrello *et al.*, 2006; Koornneef *et al.*, 2002), bajo condiciones de estrés ésta puede retrasarse o inhibirse completamente dependiendo de la intensidad del estrés y las bases genéticas de la semilla (Foolad *et al.*, 1999). La germinación en tomate, así como en tabaco se ha reportado está asociada a la degradación y movilización de

reservas; además de una interacción entre la radícula embrionaria y la capa del endospermo (Koornneef *et al.*, 2002; Leubner-Metzger, 2003; Fait *et al.*, 2006), así como el contenido de agua y la regulación por hormonas como ABA y GA. Song *et al.*, (2005) y Pirrello *et al.*, (2006), mencionan que la germinación también involucra una vía dependiente de Et, donde factores de tipo ERF como *AtERF7* y *SERF2*, están altamente involucrados en el proceso.

El NaCl y el LiCl provocan un estrés salino el cual está relacionado con el estrés hídrico y la presencia de un exceso de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^{3+}$ ), el sorbitol exhibe un efecto que imita un estrés osmótico y limita la toma de agua debido a un bajo potencial hídrico en el medio y el metil viologeno da lugar a un estrés oxidativo generando principalmente superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Bus *et al.*, 1974; Ashraf y Foolad, 2005; Gibson, 2005; Cortés y del Real, 2007; Aral *et al.*, 2008; Wohlbach *et al.*, 2008). De acuerdo con los resultados observamos que la sobreexpresión de *ERF3b* presenta una mayor tolerancia en el proceso de germinación en todas las condiciones de estrés, así como una mayor velocidad y porcentaje de germinación en condiciones sin estrés, a diferencia de la línea transgénica *ERF5* y WT que no presentaron diferencias significativas en los tratamientos.

Con respecto a la línea *ERF3b*, atribuimos su tolerancia a un posible incremento en los niveles de prolina y de la ascorbato peroxidasa, ya que los genes *P5CS* y *APx* se encuentran sobreexpresados. Se ha demostrado que el gen *P5CS* está involucrado en la síntesis de prolina, y su acumulación en plantas en condiciones de estrés, cuyo papel se ha relacionado como un estabilizador de las estructuras celulares, ayuda a la eliminación de radicales libres y actúa como un amortiguador celular con potencial redox, además induce la expresión de genes de respuesta al estrés salino, se ha reportado que la sobreexpresión de *P5CS* en tabaco resulta en una mayor tolerancia en condiciones de sequía y salinidad (Ashraf y Foolad, 2007; Kavi Kishor *et al.*, 2015), la ascorbato peroxidasa es una enzima que se induce en condiciones de estrés en plantas que dan lugar a un daño oxidativo como la exposición a altos niveles de salinidad o el estrés por frío, debido a un incremento de especies reactivas de oxígeno, además se ha reportado que el

estrés salino en tomate eleva los niveles de enzimas antioxidantes citosólicas como APx, SOD entre otras, en especies tolerantes, por lo que se ha reportado que juegan un papel clave en la germinación eliminando la producción de  $H_2O_2$  que se genera durante la etapa de imbibición de la semilla, protegiendola del daño oxidativo (Wang *et al.*, 2005; Gadea *et al.*, 1999). De acuerdo a lo reportado por Miller *et al.*, (2007) mutantes en APx citosólica da lugar a una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y un retraso en el crecimiento en Arabidopsis. En cuanto a la línea transgénica ERF5 no mostró tolerancia en condiciones de estrés, fenotipo que podría deberse a una desregulación de genes implicados en la germinación.

Como se mencionó anteriormente, ERF3b es un represor de la transcripción al igual que AtERF4, por lo que podríamos suponer un efecto similar de ERF3b en tomate. Se ha reportado que AtERF4 promueve una disminución en las concentraciones de ABA para dar lugar al rompimiento de la dormancia (Yang *et al.*, 2005), así como AtERF12 que actúa como un regulador negativo de la dormancia de la semilla, en una vía independiente de GA y ABA (Li *et al.*, 2019). Además a diferencia de SlERF3b, AtERF4 presenta mayor sensibilidad a condiciones de estrés impuestas por el cloruro de sodio, por lo que suponemos que existe una regulación que difiere en plantas sobreexpresantes de ERF3b en tomate que continúa en la cascada de regulación. Se ha reportado que la SOD se induce en la etapa de imbibición, cuando se produce una alta tasa respiratoria, sin embargo en semillas bajo condiciones de estrés su actividad disminuye (Gidrol *et al.*, 1994); por lo que podríamos atribuir que la tolerancia de la línea ERF3b está ligada a la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y APx, y posiblemente la línea ERF5 presenta una desregulación en SOD, pues se ha reportado que un desbalance en la concentración de SOD y APx, disminuye la capacidad de detoxificación promoviendo la inactivación de estas enzimas que se encuentran altamente relacionadas al trabajar en conjunto y eliminar el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  por SOD, APx (Shigeoka *et al.*, 2002).

#### **7.4. Efecto del estrés en líneas transgénicas sobreexpresantes de los ERF**

#### 7.4.1. Contenido de clorofila en condiciones de estrés

La fotosíntesis es uno de los procesos vitales más importantes que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que es donde se genera la energía química necesaria para llevar a cabo diferentes procesos metabólicos, sin embargo esto no sería posible si la luz no es absorbida por los pigmentos antenas, los cuales transfieren la energía de excitación al centro de reacción de los dos fotosistemas, considerando que más del 90% del quanta de luz absorbida es utilizada para la fotosíntesis (Krause, 1991; Ashraf y Harris, 2013). Los pigmentos antena están conformados por clorofila y carotenos que interactúan con proteínas y conforman la antena receptora de luz; donde la energía lumínica es absorbida, transferida y balanceada hacia los centros de reacción (Lichtenthaler y Rinderle, 1988). La clorofila *a* (chl*a*) y clorofila *b* (chl*b*) son algunos de los pigmentos más importantes, considerándose a la chl*a* el principal receptor de luz, por lo que cambios en su concentración y fluorescencia podrían considerarse como un indicador de estrés, ya que se ha reportado que bajo condiciones de estrés hídrico y salino se compromete de manera importante la fotosíntesis, debido a un exceso en la generación y acumulación de ROS que causa daño oxidativo en el apoplasto, interfiriendo en el flujo de iones que en consecuencia da lugar al deterioro de la maquinaria fotosintética, produciendo cambios en los componentes y pigmentos fotosintéticos como la clorofila, que forma parte importante del centro de reacción del fotosistema II (Chen y Murata, 2002; Farooq *et al.*, 2008; Saibo *et al.*, 2008; Gollack *et al.*, 2014; Ayaz *et al.*, 2015).

De acuerdo con nuestros resultados, observamos que en condiciones sin estrés, el contenido de clorofila total (chl *a+b*) no presentan diferencias significativas entre la línea WT y las líneas transgénicas, por lo que podríamos suponer que, el efecto de la sobreexpresión de los factores *ERF5* y *ERF3b* en las líneas transgénicas no están involucrados en la síntesis de pigmentos fotosintéticos como la clorofila, sin embargo se ha reportado que tienen una participación en su degradación durante la maduración del fruto en tomate y *ERF3b* en la acumulación de carotenos (Liu *et*

*al.*, 2016). En situaciones de estrés, observamos que en condiciones de sequía las concentraciones de clorofila sufren ligeros cambios, sin embargo, esto no son significativos entre la línea WT y las líneas transgénicas, además no se presenta una disminución que nos haga sugerir que bajo estas condiciones los niveles de chl *a+b* se vean afectados por el estrés hídrico. El efecto en condiciones de salinidad con NaCl en la primera semana se observa un incremento en el contenido de chl *b* en la línea silvestre y ERF3b, mientras se reduce significativamente en la línea ERF5, cuando el estrés se prolonga hasta la semana dos observamos que el contenido de chl *a+b* es significativamente menor en la WT y las líneas transgénicas se recuperan, lo que sugiere que se encuentran más protegidas, debido a que el cloruro de sodio genera un estrés osmótico que cuando se prolonga da lugar a un estrés oxidativo y además se establece un efecto de ion tóxico por Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, los cuales se acumulan en el cloroplasto promoviendo la degradación clorofila *a* y *b* por niveles elevados de catión de Na<sup>+</sup> (Ashraf y Harris, 2013); por lo que suponemos que el papel de los factores, está relacionado en la protección con ayuda de un sistema antioxidativo eficiente que no permite la generación y acumulación de ROS, además de la detoxificación de iones que están implicados en la degradación de la clorofila y la protección de moléculas como la participación de osmolitos y enzimas antioxidantes. El estrés ocasionado por LiCl resulta interesante, pues se sabe que el Li<sup>3+</sup> cuando se acumula en plantas provoca un deterioro en el organismo por su elevada toxicidad, se ha reportado que este compite con otros elementos esenciales como el Mg<sup>2+</sup> y el Al<sup>3+</sup>, además de interactuar con el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup>, así como enzimas que requieren Mg<sup>2+</sup> como cofactor (Aral *et al.*, 2008) esto sugiere que el efecto observado en plantas de tomate tanto en líneas transgénicas y silvestre puede deberse por efecto de acumulación de litio más que por el efecto salino, razón por la que observamos un menor contenido de Chl *a+b* desde la primera semana principalmente en la línea silvestre, mientras que para la segunda semana la línea WT y ERF3b presentan una mayor reducción en la concentración de chl *a+b* con respecto a la línea ERF5, esta reducción puede deberse al estrés oxidativo que se presenta en las células seguido de un efecto por el Li<sup>3+</sup>, que podría estar

compitiendo con el  $Mg^{2+}$  de las moléculas de clorofila, así como enzimas que dependen de este cofactor, lo que disminuye su acumulación en plantas y contribuye en limitar la captura de luz y en consecuencia afectar la transducción de la energía (Ohmiya *et al.*, 2014). Con esto podemos decir que la acumulación de clorofila en las líneas transgénicas en condiciones de salinidad es mayor con respecto a la línea silvestre por lo que asumimos que los niveles de expresión de *P5CS* y *APx* en las líneas transgénicas promueve una menor degradación de esta molécula, ya ha sido reportado que la prolina, así como la ascorbato peroxidasa se encargan de proteger y estabilizar estructuras subcelulares, eliminación de radicales libres y así promover un ajuste osmótico, por lo que se ha propuesto que una acumulación de clorofila es considerado un potencial bioquímico que indica tolerancia a salinidad en diferentes cultivos (Ashraf y Foolad, 2007; Ashraf y Harris, 2013; Kavi Kishor *et al.*, 2015). También existen reportes de la sobreexpresión de *StBREB* en papa que promueve la tolerancia salina asociada a un incremento en los niveles de expresión de *P5CS*, además de un mayor contenido de clorofila (Bouaziz *et al.*, 2015), mientras que la sobreexpresión de *TERF2* induce tolerancia al frío en tabaco, tomate y arroz induciendo la expresión del gen *P5CS* y promoviendo la acumulación de prolina, así como una reducción de ROS y la acumulación de clorofila (Tian *et al.*, 2011), en trigo la sobreexpresión de *TaERF3* promueve tolerancia a condiciones de salinidad, atribuyendo esto a altos niveles de prolina y contenido de clorofila así como la eliminación de  $H_2O_2$  (Rong *et al.*, 2014).

#### **7.4.2. Contenido de MDA en condiciones de estrés**

El estrés hídrico, así como el estrés salino estimulan la generación y acumulación de ROS en plantas, desencadenando un estrés oxidativo (Shanker *et al.*, 2014; Cortés y del Real, 2007; Albacete *et al.*, 2008). Se cree que el estrés oxidativo es una de las principales causas de daño y muerte de la célula. Durante la primera etapa de esta condición, las ROS interactúan directamente con proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y da lugar a la peroxidación de lípidos, en la

segunda fase se presenta una cadena de reacción de peroxidación de lípidos, lo que resulta en productos de escisión de reacción química como alcanos, aldehídos, cetonas entre otros, que presentan un potencial tóxico natural (Sunkar *et al.*, 2003). El malondialdehído es un compuesto que se emplea para determinar el daño potencial que ocurre en las membranas celulares, es un compuesto volátil de bajo peso molecular, de cadena corta y moderadamente ácido que se forma como un producto final de la peroxidación de lípidos (Janero, 1990).

De acuerdo con los resultados observamos que las líneas transgénicas presentaron menores concentraciones de MDA en la primera semana en la línea ERF3b, mientras que para la segunda semana las menores concentraciones se presentaron en la línea ERF5 seguida de ERF3b en condiciones de sequía y salinidad. Las plantas han desarrollado estrategias para contender con el estrés oxidativo, cuya función se centra en eliminar las ROS y sus productos tóxicos, esta maquinaria comprende un sistema antioxidante enzimático que incluye la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa entre otras; y un sistema no enzimático que incluye el ácido ascórbico, vitamina E, glutatión reducido, entre otros (Sunkar *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2002; Koyro *et al.*, 2012), por lo que la respuesta antioxidante parece ser una parte integral de la tolerancia en plantas en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Najami *et al.*, 2007). En especies de tomate tolerantes a la salinidad se ha reportado una sobrerregulación en la actividad enzimática, generalmente de ascorbato peroxidasa que juega un papel importante en el metabolismo de  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , considerándose componentes clave para prevenir el estrés oxidativo (Najami *et al.*, 2007; Shigeoka *et al.*, 2002).

De acuerdo al análisis de expresión en las líneas transgénicas, se observó que la sobreexpresión de ERF5 y ERF3b inducen la expresión de genes como *P5CS* involucrado directamente en la síntesis de prolina y *APx* que participa en la eliminación de ROS, con estos datos podemos atribuir que las concentraciones menores de MDA en las líneas transgénicas se debe a la sobrerregulación de estos genes de respuesta al estrés, lo que promueve su protección, aun cuando el

mayor daño oxidativo se presenta en condiciones de sequía, se ha reportado que un déficit hídrico progresivo afecta adversamente la fotosíntesis, a nivel celular provoca cambios perjudiciales en los componentes celulares, un bajo potencial de agua reduce la hidratación de biomoléculas tales como proteínas, lo que ocasiona su desnaturalización y desorganización de las membranas (Koyro *et al.*, 2012; Redondo-Gómez, 2013; Cominelli *et al.*, 2013). Por lo que consideramos que la regulación de *P5CS* y *APx* están relacionadas con menores contenidos de MDA en plantas transgénicas.

En condiciones de salinidad por NaCl, observamos que las líneas transgénicas ERF5 y ERF3b presenta el menor contenido de MDA en la primera semana, sin embargo en la segunda semana la línea ERF3b presenta mayor contenido de MDA, presentando concentraciones similares que en condiciones de sequía, mientras que ERF5 presenta los niveles más bajos de oxidación de las condiciones de estrés, lo que nos hace suponer que presenta una mayor participación respuesta ante esta condición, si bien el estrés salino da lugar a un estrés osmótico en los primeros días de estrés, en la segunda fase se caracteriza por efectos de ion toxico acompañado de un estrés oxidativo (Albacete *et al.*, 2008), suponemos que, el estrés hídrico es menor en esta condición lo que hace que la línea ERF5 promueva una mejor respuesta en un estrés prolongado contra el estrés oxidativo, a diferencia en condiciones de estrés por sequía donde los efectos son más drásticos y la respuesta parece no ser eficiente, esto se puede observar nuevamente en el estrés salino por LiCl, donde en la primera semana el estrés osmótico no ocasiona ningún cambio en la acumulación MDA, pero cuando el estrés se prolonga el efecto de ion tóxico y el estrés oxidativo, se induce un incremento en el contenido de MDA.

### **7.4.3. Tolerancia al herbicida Paraquat**

El Paraquat en plantas ocasiona una falla en el transporte de electrones en la fotosíntesis por competencia y disminución del NADPH, altera las estructuras de los tilacoides, degradación de clorofila e induce peroxidación lipídica que ocasiona una ruptura en la membrana celular y fuga de electrolitos, además del cierre de estomas que limita la toma de CO<sub>2</sub> y en consecuencia la inactivación del ciclo de Calvin necesario para la fijación del carbono (Kirtikara y Talbot, 1996; Perl *et al.*, 1993). En nuestro trabajo observamos que una concentración de 100µM las líneas transgénicas presentan mayor tolerancia y se recuperan en el transcurso de dos semanas, después de una semana de exposición, atribuyendo su tolerancia a la sobreexpresión de los factores ERF5 y ERF3b que regulan la expresión de genes implicados con el estrés, atribuyendo una alta participación de *P5CS* y *APx* en promover la tolerancia al herbicida. Se ha reportado que concentraciones de 10µM de Paraquat ocasiona un daño irreversible en plantas de tomate de 8-10 semanas (Kirtikara y Talbot, 1996). De acuerdo a los antecedentes, se ha reportado que callos de tabaco tolerantes al Paraquat presenta una elevada actividad de SOD (Furusawa *et al.*, 1984) y la sobreexpresión de enzimas como APx y SOD en conjunto en tabaco incrementan la protección a las membranas en presencia de metil viologeno (Kown *et al.*, 2002), además en plantas de papa sobreexpresantes de SOD de tomate, promueven una elevada tolerancia al MV (Perl *et al.*, 1993), mostrando que un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes promueve la tolerancia al estrés oxidativo, aparte de que se sabe que SOD y APX se encuentran altamente relacionadas en trabajar conjuntamente para eliminar las ROS que se generan en planta (Najami *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2002).

### **7.4.4. Tolerancia a la infección de *B. cinerea***

*B. cinerea* es uno de los patógenos de plantas más importante en la agricultura, presenta un amplio rango de hospederos capaz de afectar a más de 200 especies vegetales, causa pérdidas antes y después de la cosecha, y se estima que afecta alrededor del 20% de los cultivos a nivel mundial (Benito *et al.*, 2000; Williamson *et*

*al.*, 2007; Dean *et al.*, 2012, Smit *et al.*, 2014; Nakajima y Akutsu *et al.*, 2014). Antecedentes muestran que la resistencia a este hongo necrotrófico está relacionado con una vía dependiente de JA/Et (Zhang *et al.*, 2016; El Oirdi *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados observamos que las líneas transgénicas de ERF5 y ERF3b presentan una elevada resistencia a la infección por *B. cinerea*, atribuyendo este resultado a la sobreexpresión de estos factores de transcripción, pues de acuerdo a Zhang *et al.*, (2015 y 2016) la sobreexpresión de *AtERF15* y *AtERF014* están implicados en la tolerancia a la infección de *B. cinerea* y *P. syringae*, *AtERF15* por su regulación en respuesta por vías de señalización por JA/Et y SA, mientras que *AtERF014* por su regulación en respuesta a SA y la inducción de genes involucrados con la biosíntesis y deposición de pectina en la pared celular actuando como una barrera estructural que promueve la resistencia a *P. syringae*, además de inducir la expresión de genes de defensas (PR). La sobreexpresión de *AaERF1* en *Arabidopsis*, induce la expresión de genes marcadores de defensa como PLANT DEFENSIN1.2 (PDF1.2) y quitinasas básicas (ChiB).

Línea transgénica ERF3b presentan una elevada resistencia al hongo, se ha reportado que la sobreexpresión del represor *AtERF4* induce resistencia hacia *Fusarium oxysporum* (McGrath *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005), presentado una regulación negativa en respuesta a la expresión de genes de defensa. Se ha reportado que *AtERF3/4/7* son genes redundantes en *Arabidopsis* y presentan alta homología con ERF3b (Li *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2010) por lo que suponríamos funciones similares. Además, se ha reportado que la sobreexpresión del represor *DEAR1* (Maruyama *et al.*, 2013) reprime la expresión de *ERF9* promoviendo la tolerancia a *B. cinerea* en *Arabidopsis*. En cuanto a la sobreexpresión de *ERF3b* podemos decir que regula positivamente la tolerancia a *B. cinerea*, pero se sabe poco en cómo se lleva a cabo su regulación, sí ERF3b está implicado en modular la respuesta entre estrés biótico y abiótico, y considerando que se comporta como el represor *AtERF4*, suponemos entonces que ERF3b reprime genes de respuesta a patógenos en condiciones de estrés abiótico, y cuando se reprime en presencia de trehalosa exógena, los genes que se reprimían quedan “disponibles” para ser

transcritos por los activadores transcripcionales. Cabe destacar que en la línea sobreexpresante ERF3b suponemos que estos genes de respuesta a patógenos están “inactivos” por su efecto represor y esto disminuiría en la tolerancia a las condiciones de estrés, sin embargo en las líneas ERF3b observamos que *ERF5* se induce significativamente por lo que atribuimos que la tolerancia en estas líneas se debe a la regulación negativa de ERF3b desencadena la inducción de *ERF5* y en consecuencia la expresión de genes de relacionados con la defensa contra patógenos.

La sobreexpresión de *ERF5* al igual que el factor ERF3b incrementa también la tolerancia a *B. cinerea*, demostrando que la sobreexpresión de esta clase de factores, promueve la tolerancia a diferentes condiciones de estrés, en el caso del factor ERF5 solo se ha reportado estar implicado en la respuesta condiciones de estrés abiótico como sequía y salinidad, análisis filogenéticos realizados por Pan *et al* (2012) relaciona a este factor con *AtERF5* y *AtERF6* de Arabidosis, y de acuerdo a Moffat *et al.*, (2012), sugieren que estos dos factores actúan como reguladores positivos en respuesta de defensa mediada por la vía JA, y su sobreexpresión promueve la tolerancia a la infección de *B. cinerea* en Arabidopsis, promoviendo la inducción de genes como PDF1.1,PDF1.3, PDF1.2a,b y c, PR4 entre otros, mientras que Son *et al.*, (2012) muestra que *AtERF5* regula negativamente genes de respuesta a quitina pero regula positivamente genes de la vía de SA. Por lo que podemos suponer que la sobreexpresión de *ERF5* en tomate se basa en inducir una respuesta de defensa efectiva al regular genes de la respuesta a JA/ET y detener a *B. cinerea* en el inicio de la infección cuando tiene la capacidad de manipular los mecanismos de defensa en tomate promoviendo una respuesta que induce una vía de señalización por SA (El Ordi *et al.*, 2011).

## 8. Conclusiones

Los factores *ERF1*, *ERF3b* y *ERF5* se inducen y presentan un patrón de expresión diferencial en condiciones de estrés abiótico dado por salinidad y deshidratación, así como en presencia del disacárido trehalosa, donde *ERF3b* es reprimido en planta silvestre de tomate.

El factor *ERF3b* podría ser un modulador de la respuesta al estrés biótico y abiótico en planta silvestre de tomate

La sobreexpresión de *ERF3b* y *ERF5* promueve floración temprana en plantas transgénicas de tomate. Y la sobreexpresión de *ERF3b* genera frutos de tomate más grandes, de mayor peso y contenido de semillas.

La sobreexpresión de *ERF3b* y *ERF5* incrementa la expresión de genes de respuesta al estrés como *P5CS* y *APx*; además *ERF3b* reprime significativamente la expresión de *ERF5*, mientras *ERF5* induce la expresión de *ERF3b*, esto en líneas transgénicas *ERF3b* y *ERF5* respectivamente.

La sobreexpresión de *ERF3b* incrementa la germinación en diferentes condiciones de estrés osmótico, salino y oxidativo.

Las líneas transgénicas *ERF3b* y *ERF5* presentan mayor tolerancia al estrés oxidativo dado por sequía, salinidad y en presencia de metil viologeno (Paraquat), además presentan mayor contenido de clorofila en condiciones de salinidad dado por NaCl y LiCl.

Las líneas transgénicas *ERF3b* y *ERF5* presentan menor susceptibilidad a la infección por *B. cinerea*.

## 9. Perspectivas

Evaluar la susceptibilidad al ataque por agentes causales de enfermedades de tipo bacteriano (*Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).

Realizar cruces de *Solanum lycopersicum* con variedades comerciales de tomate y evaluar la tolerancia al estrés biótico y abiótico en la generación filial.

## 10. Referencias Bibliográficas

Albacete A., Ghanem., M.E., Martínez-Andújar C., Acosta M., Sánchez-Bravo J., Martínez V., Lutts S., Dodd I.C., Pérez-Alfocea F., (2008) Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 4119-4131.

Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasnyanski S., Kumar S., Thompson W.F. (2006) A modified protocol for rapid DNA isolation from plant issues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, **1**, 2320-2325.

Anil K., Das S. N., Podile A. R. (2014) Induced defense in plant: A short overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(3), 669-679.

Aral H., Vecchio-Sadus A. (2008) Toxicity of lithium to humans and the environment- A literature review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**, 349-356.

Ashraf M., Foolad M.R. (2005) Pre-Sowing seed treatment- A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy*, **88**, 223-271.

Ashraf M., Foolad M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 206-216.

Ashraf M., Harris P.J.C. (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, **51**, 163-190.

Atkinson N.J., Lilley C.J., Urwin P.E. (2013) Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stress. *Plant Physiology*, **162**, 2028-2041.

Ayaz M., Ahmad R., Shahzad M., Khan N., Shah M.M., Khan S.A. (2015) Drought stress stunt tomato plant growth and up-regulate expression of *SIAREB*, *SNCED3* and *SIERF024* gene. *Scientia Horticulturae*, **195**, 48-55.

Bari R., Jones J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defense response. *Plant Molecular Biology*, **69**, 473-488.

Barone A., Chiusano M.L., Ercolano M.R., Giuliano G., Grandillo S., Frusciante L. (2008). Estructural and functional genomics of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, **2008**, 1-12.

Benito E., Arranz M., Eslava A., (2000) Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, **17**, 43-47.

Bergougnoux V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, **32**, 170-189.

Berrocal-Lobo M., Molina A. (2004) Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **17**, 763-770.

Berrocal-Lobo M., Molina A., Solano R. (2002). Constitutive expression of ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, **29**(1), 23-32

Bouaziz D., Charfeddine M., Jbir R., Saidi N.M., Pirrello J., Charfeddine S., Bouzayen M., Gargouri-Bouzid R. (2015) Identification and functional characterization of ten AP2/ERF genes in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **123**(1), 155-172.

Buegue J.A., Aust S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology journal*, **2**, 302-310.

Bus J.S., Aust S.D., Gibson E. (1974) Superoxide-and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for Paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **58**, 749-755.

Buscaill P., Rivas S. (2014). Transcriptional control of plant defenses response. *Current Opinion in Plant Biology*, **20**, 35-46.

Candar-Cakir B., Arican E., Zhang B. (2016). Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrnas and their important roles in drought-sensitive and drought-tolerant tomato genotypes. *Plant Biotechnonology Journal*, pp. 1-20.

Cao W.H., Liu J., Zhou Q.Y., Cao Y.R., Zheng S.F., Du B.x., Zhang J.S., Chen S.Y. (2006) Expression of tobacco ethylene receptor NTHK1 alters plants response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, **29**, 1210-1219.

Cao F.Y., Yoshioka K., Desveaux D. (2011). The roles of ABA in plant- pathogen interaction. *Journal Plant Research*, **124**, 489-499.

Catalá C., Rose J.K.C., Bennett A.B. (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiology*, **122**, 527-34.

Chakraborty S. (2005). Potential impact of climate change on plant-pathogens interaction. *Australasian Plant Pathology*, **34**, 443-448.

Chakravarthy S., Tuori R.P., D'Ascenzo M.D., Forbert P.R., Després C., Marin G.B. (2003) The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and Non-GCC box *cis* elements. *The Plant Cell*, **15**, 3033-3050.

Chen T.H.H., Murata N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Physiology and metabolism*, **5**, 250-257.

Chen L., Zhang Z.Y., Liang H.X., Liu H.X., Du L.P., Xu H., Zhiyoung X. (2008) Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 4195-4204.

Chen T., Yang Q., Zhang X., Ding W., Gruber M. (2012). An alfalfa (*Medicago sativa* L.) ethylene response factor gene, MsERF11, enhances salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, **31**, 1737-1746.

Chen L., Han J., Deng X., Tan S., Li L., Li L., Zhou J., Peng H., Yang G., He G., Zhang W. (2016) Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon*. *Scientific Reports*, **6**(1), 1-14.

Choi W.G., Hilleary R., Swanson S.J., Kim S.H., Gilroy S. (2016). Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plant. *Annual Review of Plant Biology*, **67**, 287-307.

Chuang H.W., Harnrak A., Chen Y.C. Hsu C.M. (2010) A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **402**, 414-420.

Cogoni C., Romano N., Macino G. (1994). Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **65**, 205-209.

Cominelli E., Conti L., Tonelli C., Galbiati M. (2013). Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*, **30**(4), 355-361.

Cortés G.V., del Real S.G. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA*, **25**(3), 47:58.

Cortina C., Culiáñez-Macià F. (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **76**, 269–275.

Cortina C., Culiáñez-Macià F. (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, **169**, 75-82.

- Cristescu S.M., De Martinis D., Te Lintel Hekkert S., Parker D.H., Harren F.J. (2002) Ethylene production by *Botrytis cinerea* *in vitro* and in tomatoes. *Applied and environmental microbiology*, **68**, 5342-5350.
- Das A.B., Strasser R.J. (2013) Salinity-induced genes and molecular basis of salt-tolerant strategies in mangroves. Rout G.R., Das A. B. *In: Molecular Stress Physiology of Plants. Springer*, pp 53.
- De Wit P.J.G.M. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 2726-2732.
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 414-430.
- Denancé N., Sánchez-Vallet A., Goffner D., Molina A. (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontier in Plant Science*, **4**(155), 1-12.
- Dietz J.K., Vogel M.O., Viehhauser A. (2010) AP2/EREBP transcription factor are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma*, **245**, 3-14.
- El Oirdi M., El Rahman T.A., Rigano L., El Hadrami A., Rodriguez M.C., Daayf F., Vojnov A., Bouarab K. (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effect between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell*, **23**, 2405-2421.
- Fait A., Angelovici R., Less H., Ohad I., Urbanczy-Wochniak E., Fernie A.R., Galili G. (2006) Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, **142**, 893-854.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. (2008) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, **29**, 185-212.
- Fernandez O., Béthencourt L., Quero A., Sangwan R.S., Clément C. (2010) Trehalose and plant stress response: friend of foe? *Trends in Plant Science*, **15**, 409-417.
- Fonseca S., Rosado A., Vaughan-Hirsh J., Bishopp A. (2014). Molecular locks and keys: the role of small molecules in phytohormone research. *Frontiers In Plant Science*, **5**(709), 1-16.
- Foolad M.R., Lin G.Y., Chen F.Q. (1999) Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding*, **118**, 167-173.

- Foolad M.R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, **2007**, 1-52.
- Foyer C.H., Noctor G. (2013) Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**(16), 2087-2090.
- Furusawa I., Tanaka K., Thanutong P., Mizuguchi A., Yazaki M., Asada K. (1984) Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant and Cell Physiology*, **25**, 1247-1254.
- Gadea J., Conejero V., Vera P. (1999) Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plant. *Molecular and General Genetics*, **262**, 212-219.
- Gao S., Zhang H., Tian Y., Li F., Zhang Z., Lu X., Chen X., Huang R. (2008) Expression of *TERF1* in rice regulates expression of stress- responsive gene and enhances tolerance to drought and high-salinity. *Plant Cell Reports*, **27**, 1787-1795.
- Gasch P., Fundinger M., Müller J.T., Lee T., Bailey-Serres J., Mustroph A. (2016) Redundant ERF-VII transcription factor bind to an evolutionarily conserved *cis*-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in Arabidopsis, **28**, 160-180.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F., Dommes J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, **37**(3), 263-385.
- Gechev T., Hille J. (2012). Molecular basis of plant stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**:3161-3163.
- Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T., Kononowicz A.K. (2014) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **120**(3), 881-902.
- Gibson S.I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 93-102.
- Gidrol X., Lin W.S., Dégousée N., Yip S.F., Kush A. (1994) Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *European Journal of Biochemistry*, **224**, 21-28.
- Gilroy S., Bialasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R., Karpiński S., Mittler R. (2016) ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology*, **171**, 1606-1615.
- Giorno F., Wolters-Arts M., Grillo S., Scharf K.D., Vriezen W.H., Mariani C. (2010) Developmental and heat stress-regulate expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 453-462.

Golldack D., Lüking I., Yang O. (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factor and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, **30**, 1383-1391.

Golldack D., Li C., Mohan H., Probst N. (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 151-161.

Golem S., Culver J.N. (2003) Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 681-688.

Gu Y.Q., Wildermuth M.C., Chakravarthy S., Loh Y.T., Yang C., He X., Han Y., Martin G.B. (2002) Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **14**, 817-831.

Gu C., Guo Z.H., Hao P.P., Wang G.M., Jin Z.M., Zhang S.L. (2017) Multiple regulatory role of AP2/ERF transcription factor in angiosperm. *Botanical Studies*, **58**, 1-8.

Gutterson N., Reuber T.L. (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 465-471.

Hans-Werner K., Parvaiz A., Geissler N. (2012) Abiotic stress responses in plants: an overview. Parvaiz A., Prasad M.N.V. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the Era of climate change. Springer, pp 1-28.

Han Y., Yin S., Huang L. (2015) Towards plant salinity tolerance-implications from ion transporters and biochemical regulation. *Plant Growth Regulation*, **76**, 13-23.

Hatfield J.L., Prueger J.H. (2015) Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, **10**, 4-10.

Huang G.T., Ma S.L., Bai L.P., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z. F. (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stress in plants. *Molecular biology reports*, **39**(2), 969-987.

Inukai S., Kock K.H., Bulyk M.L. (2017) Transcription factor-DNA binding: beyond binding site motif. *Current Opinion in Genetics & Development*, **43**, 110-119.

Janero D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, **9**, 515-540.

Jisha V., Dampanaboina L., Vadassery J., Mithöfer A., Kappara S., Ramanan R. (2015) Overexpression of an AP2/ERF type transcription factor OsEREBP1 confers biotic and abiotic stress tolerance in rice. *PLoS ONE*, **10**, 1-24.

Kagale S., Rozwadowski K. (2011) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics*, **6**, 141-146.

Kavi Kishor P.B., Kumari P.H., Sunita M.S.L., Sreenivasulu N. (2015) Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science*, **6**(544), 1-17.

Klay I., Pirrello J., Riahi L., Bernadac A., Cherif A., Bouzayen M., Bouzid S. (2014) Ethylene response factor *Sl-ERF.B.3* is responsive to abiotic stress and Mediates salt and cold stress response regulation in tomato. *The Scientific World Journal*, **2014**, 12.

Kimura S., Neelima S. (2008) Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, **3**(11), 1-9.

Kirtikara K., Talbot D. (1996) Alteration in protein accumulation, gene expression and ascorbate-glutathione pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under Paraquat and ozone stress. *Journal of Plant Physiology*, **148**, 752-760.

Kissoudis C., van de Wiel C., Visser R.G., van der Linden G. (2014) Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, **5**(207), 1-20.

Kohli A., Sreenivasulu N., Lakshmanan P., Kumar P.P. (2013) The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plant respond to abiotic stresses. *Plant Cell Report*, **32**, 945-957.

Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H. (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 33-36.

Koyro H.W., Ahmad P., Geissler N. (2012) Abiotic stress response in plants: An overview. Ahmad P., Prasad M.N.V. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the Era of climate change. pp. 1-28.

Krause G.H. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**, 313-349.

Kumar S., Stecher G., Li.M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**,1547-1549.

Kurukulasuriya P., Rosenthal S. (2003) Climate changes and agriculture: A review of impacts and adaptations. *Agriculture and Rural Development Department*, chapter 1, pp 3.

Kwon S.Y., Jeong Y.J., Lee H.S. Kim J.S., Cho K.Y., Allen R.D., Kwak S.S. (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*, **25**, 873-882.

- Laluk K., Mengiste T. (2010) Necrotroph attacks on plants: Wanton destruction or convert extortion? *The Arabidopsis book*, **8**, 1-34.
- Lasserre E., Jobet E., Llauro C., Delseny M. (2008) *AtERF38 (At2g35700)*, an AP2/ERF family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stem and seed that undergo suberization. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 1051-1061.
- Lehti-Shiu M.D., Panchy N., Wang P., Uygun S., Shiu S.H. (2017) Diversity, expansion, and evolutionary novelty of plant DNA-binding transcription factor families. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1890**(1), 3-20.
- Leubner-Metzger G. (2003) Functions and regulation of  $\beta$ -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*, **13**, 17-34.
- Li J., Zhang Y., Gu J., Guo C., Wen S., Liu G., Xiao K. (2011) Molecular characterization and roles of AP2 transcription factor on drought tolerance in plants. *Frontiers of Agriculture in China*, **5**(4), 463-472.
- Li X., Chen T., Li Y., Wang Z., Cao H., Chen F., Li Y., Soppe W. JJ., Li W., Liu Y. (2019) ETR1/RDO3 regulates seed dormancy by relieving the inhibitory effect of the ERF12-TPL complex on *DELAY OF GERMINATION1* expression. *The Plant Cell*, **31**, 832-847.
- Licausi F., Ohme-Takagi M., Perata P. (2013) APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factor: mediator of stress response and developmental programs. *New Phytologist*, **199**, 639-649.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.A. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, *ac.* **603**, 591-592.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **19**, S29-S85.
- Lindemose S., O'Shea C., Jensen M.K., Skriver K. (2013) Structure, function and networks of transcription factor involved in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 5842-5878.
- Liu M., Lima-Gomes B., Mila I., Purgatto E., Peres L.E.P., Frasse P., Maza E., Zouine M., Roustan J.P., Bouzayen M., Pirrello J. (2016) Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulator of fruit ripening in tomato. *Plant physiology*, **170**, 1732-1744.
- Liu L., White M.J., MacRae T.H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry*, **262**(2), 247-257.

Liu M., Lima-Gomes B., Mila I., Purgatto E., Peres L., Frasse P., Maza E., Zouine M., Roustan J.P., Bouzayen M., Pirrello J. (2016) Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulator of fruit ripening in tomato. *Plant physiology*, **170**, 1732-1744.

Lodha T.D., Basak J. (2012) Plant-pathogen interaction: what microarray tells about it? *Molecular Biotechnology*, **50**(1), 87-97

Lokhande V.H., Supranna P. (2012) Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. Ahmad P., Prasad M.N.V. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the Era of climate change. *Springer*, 1-28

Lorenzo O., Piqueras R., Sánchez-Serrano J.J., Solano R. (2003) Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, **15**, 165-178.

Lu C.W., Shao Y., Li L., Chen A.J., Xu W.Q., Wu K.J., Lou Y.B., Zhu B.Z. (2011) Overexpression of *SlERF1* tomato gene encoding an ERF-type transcription activator enhancer salt tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*, **58**, 118-125.

Lu X., Jiang W., Zhang L., Zhang F., Zhang F., Shen Q., Wang G., Tang K. (2013) *AaERF1* Positively regulates the resistance to *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua*. *PLoS ONE*, **8**, e57657.

Ma S., Bohnert H.J. (2007) Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profile, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology*, **8**, R49.

Macedo A. (2012) Abiotic stress responses in plants: metabolism to productivity. Ahmad P., Prasad M.N.V. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the Era of climate change. *Springer*, 41-62.

Magnani E., Sjölander K., Hake S. (2004) From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *The Plant Cell*, **16**, 2265-2277.

Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **444**, 139-158,

Mantri N., Patade V., Penna S., Ford R., Pang E. (2012) Abiotic stress responses in plants: Present and future. Ahmad P., Prasad M.N.V. In: *Abiotic stress response in plant*. Springer, 1-13.

Maruyama Y., Yamoto N., Suzuki Y., Chiba Y., Yamazaki K., Sato T., Yamaguchi J. (2013) The *Arabidopsis* transcriptional repressor ERF9 participates in resistance against necrotrophic fungi. *Plant Science*, **213**, 79-87.

McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.R., Udvardi M.K., Kazan K. (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via

genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, **139**, 949-959.

Mao J.L., Miao Z.Q., Wang Z., Yu L.H., Cai X.T., Xiang C.B. (2016) Arabidopsis ERF1 mediates cross-talk between ethylene and auxin biosynthesis during primary root elongation by regulating *ASA1* expression. *PLoS Genetics*, **12**(1), 1-20.

Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idänheimo N., Hoerberichts F.A., Mühlenbock P., Brosché M., Breusegem F.V., Kangasjärvi J. (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, **67**(13), 3831-3844.

Miller G., Suzuki N., Rizhsky L., Hegie A., Koussevitzky S., Mittler R. (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology*, **144**, 1777-1785

Mittler R. (2016) ROS are good. *Trends in Plant Science*, **22**, 11-19.

Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2012) AP2/ERF family transcription factor in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1819**, 86-96.

Moënne-Loccoz Y., Mavingui P., Combes C., Normand P., Steinberg C. (2015) Microorganisms and biotic interactions. Bertrand J.C., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P., Sime-Ngando T. In: *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology*, Springer, pp 395-445.

Moffat C.S., Ingle R.A., Wathugala D.L., Saunders N.J., Knigh H., Knight M.R. (2012) ERF5 and ERF6 play a redundant roles as positive regulators of JA/Et-Mediated defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. *PLoS ONE*, **7**, 1-11.

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

Murshed R., Lopez-Lauri F., Sallanon H. (2014) Effect of salt stress on tomato fruit antioxidants systems depends on fruit development stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **20**, 15-29.

Najami N., Janda T., Barriah W., Kayam G., Tal M., Guy M., Volokita M. (2007) Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. *Molecular Genetics and Genomics*, **279**, 171-182.

Nakajima M., Akutsu K. (2014) Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, **80**(1), 15-23.

Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005) Emerging MAP kinase pathway in plant stress signalling. *Trends in Plant Science*, **10**(7), 1360-1385.

- Nakano T., Suzuki K., Fujimura T., Shinshi H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, **140**(2), 411-432,
- Nguyen D., Rieu I., Mariani C., van Dam N. (2016) How plant handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Molecular Biology*, **91**(6), 727-740.
- Nowak K., Wójcikowska B., Gaj M.D. (2015) *ERF22* impacts the induction of somatic embryogenesis in Arabidopsis through the ethylene-related pathway. *Planta*, **241**, 967-985.
- Ogata T., Kida Y., Arai T., Kishi Y., Manago Y., Murai M., Matsushita Y. (2012) Overexpression of tobacco ethylene response factor *NtERF3* gene and its homologues from tobacco and rice induces hypersensitive response-like cell death in tobacco. *Journal of general Plant Pathology*, **78**, 8-17.
- Ohama N., Sato H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2017) Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in Plant Science*, **22**, 400-109.
- Ohmiya A., Hirashima M., Yagi M., Tanase K., Yamamizo C. (2014) Identification of genes associated with chlorophyll accumulation in flower petals. *PLoS ONE*, **9**, 1-16.
- Oñate-Sánchez L., Anderson J.P., Young J., Singh K.B. (2007) AtERF14, a member of the ERF family of transcription factor, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiology*, **143**, 400-409.
- Pan I.C., Li C.W., Su R.C. Cheng C.P., Lin C.S., Chan M.T. (2010) Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of *SlERF3* enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Planta*, **232**(5), 1075-1086.
- Pan Y., Seymour G.B., Lu C., Hu Z., Chen X., Chen G. (2012) An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Report*, **31**, 349-360.
- Park H.C., Lee S., Park B., Choi W., Kim C., Lee S., Chung W.S., Lee S.Y., Sabir J., Bressan R. A., Bohnert H. J., Mengiste T., Yin D.J. (2015) Pathogen associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity is compromised under C-limited growth. *Molecules and Cells*, **38**(1), 40-50.
- Patakas A. (2012) Abiotic stress-induced morphological and anatomical changes in plants. Ahmad P., Prasad M.N.V. In: *Abiotic stress response in plant*. Springer, 21-36
- Perl A., Perl-Treves R., Galili S., Aviv D., Shalgi E., Malkin S., Galun E. (1993) Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**, 568-576
- Phukan U.J., Jeena G.S., Tripathi V., Shukla R.K. (2017) Regulation of Apetala2/Ethylene Response Factors in Plants. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1-18.

- Pirrello J., Jaimes-Miranda F., Sanchez-Ballesta M.T., Tournier B., Khalil-Ahmad Q., Regar F., Latché A., Pech J.P., Bouzayen M. (2006) SI-ERF2, a Tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiology*, **54**, 1195-1205.
- Pirrello J., Narasimha-Prasad B.C., Zhang W., Chen K., Mila I., Zouine M., Latché A., Pech J.C., Ohme-Takagi M., Regad F., Bouzayen M. (2012) Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factor provide insight on the molecular bases of plant differential response to ethylene. *BMC Plant Biology*, **12**, 190.
- Prasad P.V.V., Bheemanahalli R., Jagadish S.V.K. (2017) Field crops and the fear of heat stress-Opportunities, challenges and future directions. *Field Crops Research*, **200**, 114-121.
- Prasch C.M., Sonnewald U. (2015) Signaling events in plants: Stress factor in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, **114**, 4-14.
- Pye M.F., Hakuno F., MacDonald J.D., Bostock R.M. (2013) Induced resistance in tomato by SAR activators during predisposing salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, **4**(116), 1-9.
- Ramírez M., Guillén G., Fuentes S.I., Íñiguez L.P., Aparicio-Fabre R., Zamorano-Sánchez D., Encarnación-Guevara S., Panzeri D., Castiglioni B., Cremonesi P., Strozzi F., Stella A., Girard L., Sparvoli F., Hernández G. (2013) Transcript profiling of common bean nodules subjected to oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, **149**, 389-407.
- Redondo-Gómez S. (2013) Abiotic and biotic stress tolerance in plants. Rout G.R., Das A. B. *In: Molecular Stress Physiology of Plants. Springer*, pp 1.
- Rehman S., Mahmood T. (2015) Functional role of DREB and ERF transcription factor: regulating stress-response network in plants. *Acta Physiology Plant*, **37**, 178.
- Reignault Ph., Cogan A., Muchembled J., Lounes-Hadj Sahraoui A., Durand R., Sancholle M. (2001) Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist*, **149**, 519-529.
- Rong W., Qi L., Wang A., Ye X., Du L., Liang H., Xin Z., Zhang, Z. (2014) The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt drought stresses in wheat. *Plant Biotechnology journal*, **12**, 468-479.
- Saibo N.J.M., Lourenço T., Oliveira M.M. (2008) Transcription factor and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, **103**, 609-623.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.

- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factor involved in dehydration- and cold- inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290**, 998-1009.
- Sangu E., Tibazarwa F.I., Nyomora A., Symonds R.C. (2015) Expression of genes for the biosynthesis of compatible solutes during pollen development under heat stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Plant Physiology*, **178**, 10-16
- Santino A., Taurino., De Domenico S., Bonsega S., Poltronieri P., Pastor V., Flors V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plan Cell Reports*, **32**(7), 1085-1098.
- Schluepmann H., van Dijken A., Aghdasi M., Wobbes B., Paul M., Smeekens S. (2004) Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology*, **135**, 879–890.
- Schmidt R., Mieulet D., Hubberten H.M., Obata T., Hoefgen R., Fernie A.R., Fisahn J., Segundo B.S., Guiderdoni E., Schippers J.H.M., Mueller-Roeber B. (2013) SALT-RESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen species-dependent signaling during the initial response to salt stress in rice. *The plant cell*, **25**, 2115-2131.
- Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. (2016) Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cress-road. *Frontiers in Plant Science*, **7**(187), 1-21.
- Shanker A.K., Maheswari M., Yadav S.K., Desai S., Bhanu D., Attal N.B., Venkateswarlu B. (2014) Drought stress response in crops. *Functional and Integrative Genomics*, **14**, 11-22.
- Shao H.B., Chu L.Y., Jaleel C.A.,m Zhao C.X. (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, **331**(3), 215-225.
- Sharma P., Sharma N., Deswal R. (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays*, **27**(10), 1048-1059.
- Sharma M.K., Kumar R., Solanke A.U., Sharma R., Tyagi A.K., Sharma A.K. (2010) Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, **284**(6), 455-475.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Taketa T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1305-1319.
- Shigyo M., Hasebe M., Ito M. (2006) Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene*, **366**(2), 256-265.

Sijen T., Kooter J.M. (2000) Post-transcriptional gene-silencing: RNA on the attack or on the defense? *BioEssays*, **22**, 520-531.

Singh D., Laxmi A. (2015) Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factor. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 895-906.

Singh P., Virdi A.S. (2013) Ca<sup>2+</sup>, calmodulin and plant-specific calmodulin-binding protein: Implication. Sarwat M., Ahmad A. *In: Stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective*. Springer, pp 1.

Smith C.J.S., Watson C.F., Bird C.R., Ray J., Schuch W., Grierson D. (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular and General Genetics*, **224**, 477-481

Smith J.E., Mengesha B., Tang H., Mengiste T., Bluhm B.H. (2014) Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming. *BioMed Central Genomics*, **15**, 334.

Solano R., Stepanova A., Chao Q. (1998) Nuclear events in ethylene signalling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*, **12**, 3703-3714.

Son G.H., Wan J., Kim H.J., Nguyen X.C., Chung W.S., Hong J.C., Stacey G. (2012) Ethylene-responsive element-binding factor 5, ERF5, is involved in chitin-induced innate immunity response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 48-60.

Song C.P., Agarwal M., Ohta M., Guo Y., Halfter U., Wang P., Zhu J.K. (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREB-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell*, **17**, 2384-2396.

Speiser B., Stolze M., Oehen B., Gessler C., Weibel F.P., Bravin E., Kilchenmann A., Widmer A., Charles R., Lang A., Stamm C., Triloff P., Tamm L. (2012) Sustainability assessment of GM crops in a Swiss agricultural context. *Agronomy for Sustainable Development*, **33**(1), 21-61.

Srivastava A., Handa A.K. (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, **24**, 67-82.

Sunkar R., Bartels D., Kirch H.H. (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, **35**, 452-464.

Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 11030-11035.

- Tayen C., Randoux B., Vincent D., Bourdon N., Reignault P. (2014) Exogenous trehalose induces defenses in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology*, **104**, 293-305.
- Teixeira E.I., Fischer G., Velthuisen H.V., Walter C., Ewert F. (2013) Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, **170**, 206-215.
- Tian W., Zhang H., Pan X., Chen X., Zhang Z., Lu X., Huang R. (2011) Overexpression of ethylene response factor *TERF2* confers cold tolerance in rice seedlings. *Transgenic Research*, **20**, 857-866.
- Tsuda K., Somssich I.E. (2015) Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist*, **206**(3), 932-947.
- Tuteja N. (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants. Häussinger D., Sies H. In: *Osmosensing and osmosignaling*, *ELSEVIER*, pp419-438.
- Upadhyay R.K., Soni D.K., Singh R., Dwivedi U.N., Pathre U.V. Nath P., Sane A.P. (2013) SIERF36, an EAR-motif-containing ERF gene from tomato, alters stomatal density and modulates photosynthesis and growth. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 3237-3247.
- Varga A., Bruinsma J. (1976) Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **80**, 95-104.
- Verma S., Nizam S., Verma P.K. (2013) Biotic and abiotic stress signaling in plant. Sarwat, M. and Ahmad, A. In: *Stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective*. Springer, **1**, 25-50.
- Verma V., Ravindran P., Kumar P.P. (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BioMed Central Plant Biology*, **16**, 86.
- Vinocur B., Altman A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 123\*132
- Wang H., Huang Z., Chen Q., Zhang Z., Zhang H., Wu Y., Huang D., Huang R. (2004) Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Molecular Biology*, **55**, 183-192.
- Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Cui M., Webb R., Fuchigami L. (2005) Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **130**, 167-173.
- Wang L., Wang C., Qin L., Hu P., Wang Y. (2016) ThERF1 from *Tamarix hispida* confers decreased tolerance to oxidative and drought stress and is regulated by a WRKY protein. *Journal of Forestry Research*, **27**(4), 767-772.

- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J.A.L. (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, **8**(5), 561-580.
- Wohlbach D.J., Quirino B.F., Sussman M.R. (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell*, **20**, 1101-1117.
- Xu Z.S., Chen M., Li L.C., Ma Y.Z. (2008) Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany*, **86**, 969-977.
- Xu Z.S., Chen M., Li L.C., Ma Y.Z. (2011) Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53**, 570-585.
- Yang Z., Tian L., Latoszek-Green M., Brown D., Wu K. (2005) *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology*, **58**, 585-596.
- Zhang X., Zhang Z., Chen J., Chen Q., Wang X.C., Huang R. (2005) Expressing *TERF1* in tobacco enhance drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta*, **222**, 494-501.
- Zhang G., Chen M., Li L., Xu Z., Chen X., Guo J., Ma Y. (2009) Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Biology*, **60**, 3781-3796.
- Zhang H., Liu Wu., Wan L., Li Fang., Dai L., Li D., Zhang Z., Huang R. (2010) Functional analyses of ethylene response factor JERF3 with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice. *Transgenic Research*, **19**, 809-818.
- Zhang H., Hong Y., Huang L., Li D., Song F. (2016) *Arabidopsis* AtERF014 acts as a dual regulator that differentially modulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Botrytis cinerea*. *Nature Scientific Reports*, **6**, 30251.
- Zhang H., Huang L., Dai Y., Liu S., Hong Y., Tian L., Huang L., Cao Z., Li D., Song F. (2015) *Arabidopsis* AtERF15 positively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 686.
- Zhu X., Qi L., Liu X., Cai S., Xu H., Huang R., Li J., Wei X., Zhang Z. (2014) The wheat ethylene response factor transcription factor PATHOGEN-INDUCED ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. *Plant Physiology*, **24**, 1499-1514.

## 11. Anexos

### 11.1. Secuencia nucleotídica de los factores ERF (GenBank)

#### >ERF1 (S1-ERF.A.2) (AY192367)

ATGTATCAACTTCCCACCTTCTACTGAGTTAACTTTTTTTCCGGCAGAATTCCCAGGTGTATTGCCGG  
AGTTCAAGTTTCAGTAGTCTCATGCCATGTTTAACCGAATCATGGGGTGACTTGCCGTTAAAAGTT  
AACGATTCGGAAGATATGGTAATTTATGGGTTTCTACAAGACGCTTTTAGTATCGGATGGACGCCG  
TCAAATTTAACGTCCGAGGAAGTGAAACTCGAGCCGAGGGAGGAGATTGAGCCAGCTATGAGTACT  
TCTGTTTTCTCCGCCGACAGTGGCTCCAGCGGCTTTGCAGCCTAAAGGAAGGCATTACAGGGGCGTT  
AGACAAAGGCCATGGGGAAAATTTGCAGCGGAAATAAGAGATCCGGCTAAAAACGGCGCACGGGTT  
TGGCTTGGAACCTACGAGTCGGCTGAGGAAGCCGCACTCGCTTATGGTAAAGCCGCTTTTAGGATG  
CGCGTACTAAGGCTCTATTGAATTTCCCGCATAGAATTGGTTTAAATGAGCCGGAGCCGGTTAGA  
GTGACGGTTAAGAGACGATTATCTGAATCGGCTAGTTCATCGGTATCATCAGCTTCGGAAAGTGGC  
TCGCCTAAGAGGAGGAGAAAGGGTGTAGCGGCTAAGCAAGCCGAATTAGAAGTTGAGAGCCGGGGA  
CCAAATGTTATGAAAGTTGGTTGCCAAATGTTCCAGTTGGCGAGCAGCTATTGGTTAGTTAAAATA  
TGGAGCTAAG

#### >ERF3b (S1-ERF.F.5) (AY559314)

ATGGCAATGGTGAATTTAAATGGAATTTCGAAAAGAGGTGCATTATAGAGGTGTAAGGAAGAGGCCA  
TGGGGGAGATACGCGGCGGAGATTAGAGATCCTGGGAAAAAAGTAGGGTTTGGTTAGGTACTTTC  
GATACTGCGGAGGAGGCGGCTAGAGCTTATGATAACGCTGCTAGAGAATTTCTGGAGCGAAAGCG  
AAAATAATTTTCCGAAATTAGAAATGAAAAAGAGGAAGATCTGAAATTCGCTGTGAAAAATGAA  
ATCAATCGGAGTCCGAGTCAGACTAGTACTGTGGAGTCATCGAGTCCGGTTATGGTTGATTCATCA  
TCGCCGTTAGATCTAAGTCTCTGTGGATCAATCGGCGGGTTTAAATCATCATAACGGTTAAGTTCCCG  
AGCTCCGGTGGAGGTTTTACCGGTTCCGGTACAGGCGGTGAATCATATGTACTATATAGAAGCACTT  
GCACGCGCCGGAGTTATAAAGTTAGAAACAAATCGGAAGAAAACGGTAGATTACCTCGGTGGTGGT  
GACTCTGATTCATCAACGTAATTGATTTTATGCGTGTTGACGTGAAATCAACCACCGCCGGTTTA  
AATCTGGATCTCAACTTTCTCCACCGGAAAACATGTGA

#### >ERF5 (S1-ERF.B.2) (AY559315)

ATGGGTTCTCCACAAGAGACTTGTACTTCACTTGATTTGATTAGGCAACATCTTTTTGATGAATCT  
CTGGACCAGACTTGTTTCTCTTTTGAACAACCTCAAATCTTGAATGACATCGCAAGCTTC  
TTTAATGCTACTTCAAAAACAGAGTATGATGGTTTTTTTTCGAATTTGAGGCAAAAACGACATGTTATC  
CATTCAAATTTCTCCGAAACAGAGTAACTTGAGAGAACGGAAGCCATCTCTGAACGTAGCAATACCG  
GCGAAGCCTGTTGTTGTTGTAGAGAAGGTTGAGATTGAGAAGAAGCATTACAGGGGAGTTAGACAG  
AGGCCATGGGGGAAGTTTGCAGCGGAGATTTCGTGACCCAAATAGAAAGGGGACTCGAGTTTGGTTA  
GGAACATTTGATACTGCTGTGGATGCGGCAAAGGCATATGACAGGGCAGCGTTTAAAGCTTAGAGGA  
AGCAAAGCAATATTGAATTTCCCACTCGAAGTTGCAAACCTTAAAGCAACAAAATGATGAGACTAAA  
ACAGAGACGAAGTCGTCAGGCAGTAAAAGGGTGAGAGGAGAAACAGAGGAATTAGTAATCAAGAAG  
GAAAGGAAAATAGAAGAAGAAAGAGTACTCCAACGGCGGCGCTCCATTAACACCGTCAAGTTGG

TCGACGATTTGGGATGAAAAGGGTATTTTTGAGGTGCCACCATTGTCACCATTATCTCAGCTTGT  
ATGATATAA

**>Pti4 (Sl-ERF.A.3) (U89255)**

ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACCTCCCGGTAGATTTTCCGGTGTATCGCCGGAATTCAAGC  
TTCAGTCGTCTAATTCCTGTTAACTGAAAAATGGGGAGATTTACCACTAAAAGTCGACGATTCC  
GAAGATATGGTAATTTACGGTCTATTTAAAAGACGCTCTAAGCGTCGGATGGTCGCCGTTTAAATTC  
ACCGCCGGCGAAGTAAAATCGGAGCCGAGAGAAGAAATTGAATCGTCGCCTGAATTTTCACCTTCT  
CCGGCGGAGACCACGGCAGCTCCGGCGGCTGAAACACCGAAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGA  
CAGCGTCCGTGGGGGAAATTTGCGGCGGAGATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG  
CTTGGAACGTACGAAACAGCTGAAGAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGAATGAGA  
GGATCAAAAGCACATTTGAATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGGAACCGGTTTCGAGTT  
ACGGCGAAAAGGCGAGCATCGCCGGAACCGGCAAGCTCGTCGGGAAACGGTTCCATGAAACGGAGA  
AGAAAAGCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAGATCAAGTGTGATGCAAGTTGGATGT  
CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGTCATTTAA

**11.2. Secuencias ERF de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig  
obtenidas mediante secuenciación**

**>ERF1**

ATGGCTCGAGTTTTTTAGCAAGATGCTCTAGAATGTATCAACTTCCCACTTCTACTGAGTTAACTTT  
TTTTCCGGCAGAAATCCCGGTGTATTGCCGGAGTTCAAGTTTCAGCAGTCTCATGCCATGTTTAAAC  
CGAATCATGGGGTGAAGTTGCCGTTAAAAGTTAACGATTCCGAAGATATGGTAATTTATGGGTTTCT  
ACAAGACGCTTTTAGTATCGGATGGACGCCGTCAAATTTAACGTCCGAGGAAGTGAAACTCGAGCC  
GAGGGAGGAGATTGAGCCAGCTATGT  
GTACTTCTGTTTCTCCGCCGACAGTGGCTCCAGCGGCTTTGCAGCCTAAAGGAAGGCATTACAGGG  
GCGTTAGACAAAGGCCATGGGGAAAATTTGCAGCGGAAATAAGAGATCCGGCTAAAACGGCGCAC  
GGTTTTGGCTTGGAACCTACGAGTCGGCTGAGGAAGCCGCACTCGCTTATGATAAAGCCGCTTTTA  
GGATGCGCGGTACTAAGGCTCTATTGAATTTCCCGCATAGAATTGGTTTAAATGAGCCGGAGCCGGT  
TAGAGTGACGGTTAAGAGACGATTATCTGAATCGGCTAGTTCATCGGTATCATCAGCTTCGGAAAG  
TGGCTCGCCTAAGAGGAGGAGAAAGGGTGTAGCGGCTAAGCAAGCCGAATTAGAAGTTGAGAGCCG  
GGACCAAATGTTATGAAAGTTGGTTGCCAAATGGAACAATTTCCAGTTGGCGAGCAGCTATTGGT  
TAGTTAAAATATGGAGCTAAGGGTACCCCATCTTTCAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCC  
ATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTATTCTCTCAAGATTTTCACGCTGTATATTTAAACTTATATTA  
AGAACTATGCTAACCCCTCATCAGAACCGTTGTAGGTGCGGTGGTTTTCTTGGCAATCGACTCT  
CATGAAAACCTACGAGCCTAAATATTCATATGATGCTTCTTGACAACCTTTATCTGCATTTTTTTTGG  
CGAGGATTAAGAAGCA

**>ERF3b**

ATGGCTCGAGTTTTTTAGCAAGATGCTCTAGAATGGCAATGGTGAATTTAAATGGAATTTTCGAAAAGA  
GGTGCATTATAGAGGTGTAAGGAAGAGGCCATGGGGGAGATACGCGGCGGAGATTAGAGATCCTGG  
GAAAAAAGTAGGGTTTTGGTTAGGTACTTTTCGATACTGCGGAGGAGGCGGCTAGAGCTTATGATAA  
CGCTGCTAGAGAATTTTCGTGGAGCGAAAGCGAAAAC TAATTTTCCGAAATTAGAAATGGAAAAAGA  
GGAAGATCTGAAATTCGCTGTGAAAAATGAAATCAATCGGAGTCCGAGTCAGACTAGTACTGTGGA  
GTCATCGAGTCCGGTTATGGTTGATTCATCATCGCCGTTAGATCTAAGTCTCTGTGGATCAATCGG  
CGGGTTTAATCATCATACGGTTAAGTTCCCGAGCTCCGGTGGAGTTTTTACCGGTTCCGGTAAGGCG  
GTGAATCATATGTACTATATAGAAGCACTTGCACGCGCCGGAGTTATAAAGTTAGAAACAAATCGG  
AAGAAAACGGTAGATTACCTCGGTGGTGGTGACTCTGATTCATCAACGGTAATTGATTTTTATGCGT  
GTTGACGTGAAATCAACCACCGCCGGTTTTAAATCTGGATCTCAACTTTCCTCCACCGGAAAACATG  
TGAGGTACCCCATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTT  
TTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTA AAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCCAC  
CTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAAC TACGAGC  
TAAATATTCAATATGTTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGC  
AAGCTTCAGAAACTGAGACAGGGAATTTTTTTATTA AAAAAAATTTAAATTTTTGAAGAAAGTTCCAGG  
TCATAGCATCCATTTTTTTTGCTTTGCCAGTCTTCAGCATCTACCAAAGAACGTCCTCTTTTGGGA  
C

**>ERF5**

ATGCTCTAGATTCGGGATCCATGGGTTCTCCACAAGAGACTTG TACTTCACTTGATTTGATTAGGC  
AACATCTTTTTGATGAATCTCTGGACCAGACTTGTTTCTCTTTTGAACAAC TCAAAC TTTCAAATC  
TTGATGACATCGCAAGCTTCTTTAATGCTACTTCAAAAACAGAGTATGATGGTTTTTTTCGAATTTG  
AGGCAAAACGACATGTTATCCATTCAAATTTCTCCGAAACAGAGTAACTTGAGAGAACGGAAGCCAT  
CTCTGAACGTAGCAATACCGGCGAAGCCTGTTGTTGTTGTAGAGAACGTTGAGATTGAGAAGAAGC  
ATTACAGGGGAGTTAGACAGAGGCCATGGGGGAAGTTTGCAGCGGAGATTTCGTGACCCAAATAGAA  
AGGGGACTCGAGTTTGGTTAGGAACATTTGATACTGCTGTGGATGCGGCAAAGGCATATGACAGGG  
CAGCGTTTTAAGCTTAGAGGAAGCAAAGCAATATTGAATTTCCCACTCGAAGTTGCAAAC TTTAAGC  
AACAAAATGATGAGACTAAAACAGAGATGAAGTCGT CAGGCAGTAAAAGGGTGAGAGGAGAAACAG  
AGGAATTAGTAATCAAGAAGGAAAGGAAAATAGAAGAAGAAAGAGTACTCCAACGGCGGCGGCTC  
CATTAACACCGTCAAGTTGGTTCGACGATTTGGGATGAAAAGGGTATTTTTTTGAGGTGCCACCATTG  
TCACCATTATCTCAGCTTGTATGATATAAGGTACCCCAATCGGATCCCGGGCCCGT C GACTGCAG  
AGGGCCTGCATGCAAGCTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCCTTGGCGTAATCATGGTCATAG  
CTGGTTCCCTGTGTGAAATTGGTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCGGAAGCATAAGTG  
TAAGGCTGGCGTACCTATGATGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCAATTACA  
GGTCGGGGAACCTTGAATACATGAATAGC

**>Pti4**

ATGGCTCGAGTTTTTTAGCAAGATGCTCTAGAATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCCGGT  
AGATTTTCCGGTGTATCGCCGGAATTCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTGAAAAATG  
GGGAGATCTACCACTAAAAGTCGATGATTCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCTATTTAAAAGACGC  
TCTAAGCGTCGGATGGTCGCCGTTTAATTTACCGCCGGCGAAGTAAAATCGGAGCCGAGAGAAGA  
AATTGAATCGTCGCTTGAATTTTCACCTTCTCCGGCGGAGACCACGGCAGCTCCGGCGGCTGAAAC  
ACCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGTCCGTGGGGGAAATTTGCGGCGGAGATTAG  
AGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTTGGCTTGAACGTACGAAACAGCTGAAGAAGCTGCAAT  
TGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGAATGAGAGGATCAAAAGCACATTTGAATTTCCCGCACCGGAT  
CGGTTTGAATGAACCGAACC GGTTTCGAGTTACGGCGAAAAGGCGAGCATCGCCGGAACCGGCAAG  
CTCGTCGGGAAACGGTTCATGAAACGGAGAAGAAAAGCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGC  
GAGTAGATCAAGTGTTCATGCAAGTTGAATGTCAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATT  
GGTCATTTAGGTACCCCATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAAATCG  
ATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTTCAGGCTGTATATTTAAACTTATATTAAGAACTATGCT  
AACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACT  
ACGAGCTAAATATTC AATATGTTCCCTCTTGACCAACTTTAATTCCTGCATTTTTTTTTGACCGAAGG  
ATTAGAGCCAGCCTTTCAAGCAAACCTGGAGACAGGCAAGTTTTATTCAAAAATTTCAAATTTTTGCAG  
GGAAG

## 11.3. Resultados del análisis tipo Blast con las secuencias obtenidas de los factores ERF

>ERF1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Lycopersicon esculentum ethylene response factor 1 (ERF1) mRNA, complete cds**  
 Sequence ID: [AY192367.1](#) Length: 931 Number of Matches: 1

Range 1: 9 to 756 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1312 bits(710)	0.0	743/757(98%)	9/757(1%)	Plus/Plus
Query 28	CAAGATGCTCTAGAATGATCAACTTCCCACCTTCTACTGAGTTAACTTTTTTCCGGCAG			87
Sbjct 9	CAA-ATACTC-ATAATGATCAACTTCCCACCTTCTACTGAGTTAACTTTTTTCCGGCAG			66
Query 88	AATCCCAGGTATTGCCGGAGTTCAAGTTTTCAGCAGTCTCATGCCATGTTAACC GAAT			147
Sbjct 67	AATCCCAGGTATTGCCGGAGTTCAAGTTTTCAGTAGTCTCATGCCATGTTAACC GAAT			126
Query 148	CATGGGGTGACTTGCCGTTAAAAGTAAACGATTCCGAAGATATGGTAATTTATGGGTTTC			207
Sbjct 127	CATGGGGTGACTTGCCGTTAAAAGTAAACGATTCCGAAGATATGGTAATTTATGGGTTTC			186
Query 208	TACAAGACGCTTTTAGTATCGGATGGACGCCGTCAAAATTTAACGTCGAGGAAGTGAAAC			267
Sbjct 187	TACAAGACGCTTTTAGTATCGGATGGACGCCGTCAAAATTTAACGTCGAGGAAGTGAAAC			246
Query 268	TCGAGCCGAGGGAGGAGATTGAGCCAGCTATGTGTACTTCTGTTTCTCCGCCGACAGTGG			327
Sbjct 247	TCGAGCCGAGGGAGGAGATTGAGCCAGCTATGTGTACTTCTGTTTCTCCGCCGACAGTGG			306
Query 328	CTCCAGCGGCTTTGCAGCCTAAAGGAAGGCATTACAGGGGCGTTAGACAAAGGCCATGGG			387
Sbjct 307	CTCCAGCGGCTTTGCAGCCTAAAGGAAGGCATTACAGGGGCGTTAGACAAAGGCCATGGG			366
Query 388	GAAAAATTTGCAGCGGAAATAAGAGATCCGGCTAAAAACGGCGCACGGGTTTGGCTTGGAA			447
Sbjct 367	GAAAAATTTGCAGCGGAAATAAGAGATCCGGCTAAAAACGGCGCACGGGTTTGGCTTGGAA			426
Query 448	CTTACGAGTCGGCTGAGGAAGCCGCACTCGCTTATGATAAAGCCGCTTTTAGGATGCGCG			507
Sbjct 427	CTTACGAGTCGGCTGAGGAAGCCGCACTCGCTTATGATAAAGCCGCTTTTAGGATGCGCG			486
Query 508	GTAATAAGGCTCTATTGAATTTCCCGCATAGAATGGTTTAAATGAGCCGGAGCCGGTTA			567
Sbjct 487	GTAATAAGGCTCTATTGAATTTCCCGCATAGAATGGTTTAAATGAGCCGGAGCCGGTTA			546
Query 568	GAGTGACGGTTAAGAGACGATTATCTGAATCGGCTAGTTTCATCGGTATCATCAGCTTCGG			627
Sbjct 547	GAGTGACGGTTAAGAGACGATTATCTGAATCGGCTAGTTTCATCGGTATCATCAGCTTCGG			606
Query 628	AAAGTGGCTCGCTAAGAGGAGGAGAAAGGGGTAGCGGCTAAGCAAGCCGAATTAGAAG			687
Sbjct 607	AAAGTGGCTCGCTAAGAGGAGGAGAAAGGGGTAGCGGCTAAGCAAGCCGAATTAGAAG			666
Query 688	TTGAGAGCCGGGACCAAATGTTATGAAAGTTGGTTGCCAAATGGAACAATTTCCAGTTG			747
Sbjct 667	TTGAGAGCCGGGACCAAATGTTATGAAAGTTGGTTGCCAAATG-----TTCCAGTTG			719
Query 748	GCGAGCAGCTATTGGTTAGTTAAAATATGGAGCTAAG		784	
Sbjct 720	GCGAGCAGCTATTGGTTAGTTAAAATATGGAGCTAAG		756	

>ERF3b

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Lycopersicon esculentum ethylene response factor 3 (ERF3) mRNA, complete cds**  
 Sequence ID: [AY559314.1](#) Length: **1125** Number of Matches: **1**

Range 1: 36 to 668 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1170 bits(633)	0.0	633/633(100%)	0/633(0%)	Plus/Plus
Query 41	ATGGCAATGGTGAATTTAAATGGAATTTGAAAGAGGTGCATTATAGAGGTGTAAGGAAG	100		
Sbjct 36	ATGGCAATGGTGAATTTAAATGGAATTTGAAAGAGGTGCATTATAGAGGTGTAAGGAAG	95		
Query 101	AGGCCATGGGGGAGATACGCGGCGGAGATTAGAGATCCTGGGAAAAAAAAAGTAGGGTTTGG	160		
Sbjct 96	AGGCCATGGGGGAGATACGCGGCGGAGATTAGAGATCCTGGGAAAAAAAAAGTAGGGTTTGG	155		
Query 161	TTAGGTACTTTCGATACTGCGGAGGAGGCGGCTAGAGCTTATGATAACGCTGCTAGAGAA	220		
Sbjct 156	TTAGGTACTTTCGATACTGCGGAGGAGGCGGCTAGAGCTTATGATAACGCTGCTAGAGAA	215		
Query 221	TTTCGTGGAGCGAAAGCGAAAACTAATTTTCCGAAATTAGAAATGGAAAAAGAGGAAGAT	280		
Sbjct 216	TTTCGTGGAGCGAAAGCGAAAACTAATTTTCCGAAATTAGAAATGGAAAAAGAGGAAGAT	275		
Query 281	CTGAAATTCGCTGTGAAAAATGAAATCAATCGGAGTCCGAGTCAGACTAGTACTGTGGAG	340		
Sbjct 276	CTGAAATTCGCTGTGAAAAATGAAATCAATCGGAGTCCGAGTCAGACTAGTACTGTGGAG	335		
Query 341	TCATCGAGTCCGGTTATGGTTGATTCATCATCGCCGTTAGATCTAAGTCTCTGTGGATCA	400		
Sbjct 336	TCATCGAGTCCGGTTATGGTTGATTCATCATCGCCGTTAGATCTAAGTCTCTGTGGATCA	395		
Query 401	ATCGGCGGGTTAATCATCATACGGTTAAGTTCGAGCTCCGGTGGAGGTTTACCGGT	460		
Sbjct 396	ATCGGCGGGTTAATCATCATACGGTTAAGTTCGAGCTCCGGTGGAGGTTTACCGGT	455		
Query 461	TCGGTACAGGCGGTGAATCATATGTACTATATAGAAGCACTTGCACGCGCCGGAGTTATA	520		
Sbjct 456	TCGGTACAGGCGGTGAATCATATGTACTATATAGAAGCACTTGCACGCGCCGGAGTTATA	515		
Query 521	AAGTTAGAAACAAATCGGAAGAAAACGGTAGATTACCTCGGTGGTGGTACTCTGATTCA	580		
Sbjct 516	AAGTTAGAAACAAATCGGAAGAAAACGGTAGATTACCTCGGTGGTGGTACTCTGATTCA	575		
Query 581	TCAACGGTAATTGATTTTATGCGTGTGACGTGAAATCAACCACCGCCGGTTAAATCTG	640		
Sbjct 576	TCAACGGTAATTGATTTTATGCGTGTGACGTGAAATCAACCACCGCCGGTTAAATCTG	635		
Query 641	GATCTCAACTTTCCTCCACCGAAAACATGTGA	673		
Sbjct 636	GATCTCAACTTTCCTCCACCGAAAACATGTGA	668		

>ERF5

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Solanum lycopersicum ethylene response factor 5 (ERF5), mRNA**  
 Sequence ID: [NM\\_001330445.2](#) Length: 863 Number of Matches: 1  
[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 4 to 738 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1347 bits(729)	0.0	734/736(99%)	1/736(0%)	Plus/Plus
Query 37	ATGGGTTCTCCACAAGAGACTTGTACTTCACCTTGATTTGATTAGGCAACATCTTTTGGAT	96		
Sbjct 4	ATGGGTTCTCCACAAGAGACTTGTACTTCACCTTGATTTGATTAGGCAACATCTTTTGGAT	63		
Query 97	GAATCTCTGGACCAGACTTGTCTCTTTTGAACAACCTCAAATCTTCAATCTTGATGAC	156		
Sbjct 64	GAATCTCTGGACCAGACTTGTCTCTTTTGAACAACCTCAAATCTTCAATCTTGATGAC	123		
Query 157	ATCGCAAGCTTCTTTAATGCTACTTCAAAAACAGAGTATGATGGTTTTTCGAATTTGAG	216		
Sbjct 124	ATCGCAAGCTTCTTTAATGCTACTTCAAAAACAGAGTATGATGGTTTTTCGAATTTGAG	183		
Query 217	GCAAAACGACATGTTATCCATTCAAATCTCCGAAACAGAGTAACTTGAGAGAACGGGAA	276		
Sbjct 184	GCAAAACGACATGTTATCCATTCAAATCTCCGAAACAGAGTAACTTGAGAGAACGGGAA	243		
Query 277	CCATCTCTGAACGTAGCAATACCGGCGAAGCCTGTTGTTGTTGTAGAGAACGTTGAGATT	336		
Sbjct 244	CCATCTCTGAACGTAGCAATACCGGCGAAGCCTGTTGTTGTTGTAGAGAACGTTGAGATT	303		
Query 337	GAGAAAGCATTACAGGGGAGTTAGACAGAGGCCATGGGGGAAGTTTGCAGCGGAGATT	396		
Sbjct 304	GAGAAAGCATTACAGGGGAGTTAGACAGAGGCCATGGGGGAAGTTTGCAGCGGAGATT	363		
Query 397	CGTGACCCAAATAGAAAAGGGGACTCGAGTTTGGTTAGGAACATTTGATACTGCTGTGGAT	456		
Sbjct 364	CGTGACCCAAATAGAAAAGGGGACTCGAGTTTGGTTAGGAACATTTGATACTGCTGTGGAT	423		
Query 457	GCGGCAAAGGCATATGACAGGGCAGCGTTAAGCTTAGAGGAAGCAAAGCAATATTGAAT	516		
Sbjct 424	GCGGCAAAGGCATATGACAGGGCAGCGTTAAGCTTAGAGGAAGCAAAGCAATATTGAAT	483		
Query 517	TTCCCACTCGAAGTTGCAAACTTAAGCAACAAAATGATGAGACTAAAACAGAGATGAAG	576		
Sbjct 484	TTCCCACTCGAAGTTGCAAACTTAAGCAACAAAATGATGAGACTAAAACAGAGATGAAG	543		
Query 577	TCGTCAAGCAGTAAAAGGGTGAAGGAGAAAACAGAGGAATTAGTAATCAAGAAGGAAAGG	636		
Sbjct 544	TCGTCAAGCAGTAAAAGGGTGAAGGAGAAAACAGAGGAATTAGTAATCAAGAAGGAAAGG	603		
Query 637	AAAAAGAAAGAAAGAGTACTCCCAACGGCGGCGCTCCATTAAACACCGTCAAGTTGG	696		
Sbjct 604	AAAAAGAAAGAAAGAGTACTCCCAACGGCGGCGCTCCATTAAACACCGTCAAGTTGG	663		
Query 697	TCGACGATTTGGGATGAAAAGGGTATTTTTGAGGTGCCACCATTGTCACCATTATCTCA	756		
Sbjct 664	TCGACGATTTGGGATGAAAAGGGTATTTTTGAGGTGCCACCATTGTCACCATTATCTCA	722		
Query 757	GCTTGTTATGATATAA	772		
Sbjct 723	GCTTGTTATGATATAA	738		

>Pti4

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Lycopersicon esculentum DNA-binding protein Pti4 mRNA, complete cds**  
Sequence ID: [U89255.1](#) Length: 704 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 704 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

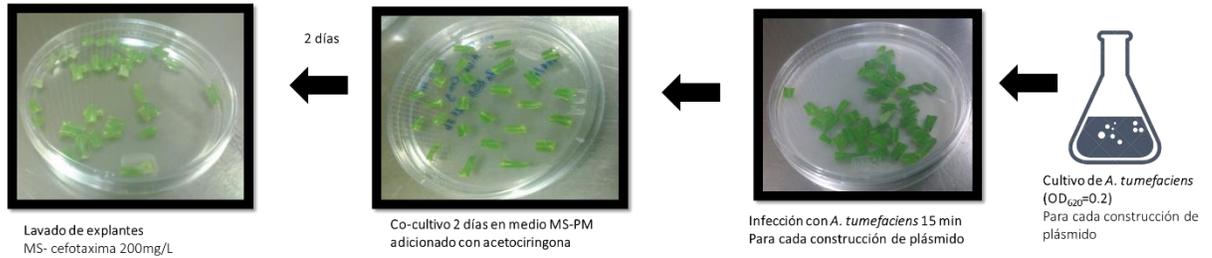
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1279 bits(692)	0.0	700/704(99%)	0/704(0%)	Plus/Plus
Query 41	ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCC	ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCC	ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCC	100
Sbjct 1	ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCC	ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCC	ATGGATCAACAGTTACCACCGACGAACTTCCC	60
Query 101	TCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTG	TCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTG	TCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTG	160
Sbjct 61	TCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTG	TCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTG	TCAAGCTTCAGTCGTCTAATTCCTGTTTAACTG	120
Query 161	GTCGATGATCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCT	GTCGATGATCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCT	GTCGATGATCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCT	220
Sbjct 121	GTCGATGATCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCT	GTCGATGATCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCT	GTCGATGATCCGAAGATATGGTAATTTACGGTCT	180
Query 221	TGGTCGCGTTTAAATTTACCGCCGGCGAAGTAAA	TGGTCGCGTTTAAATTTACCGCCGGCGAAGTAAA	TGGTCGCGTTTAAATTTACCGCCGGCGAAGTAAA	280
Sbjct 181	TGGTCGCGTTTAAATTTACCGCCGGCGAAGTAAA	TGGTCGCGTTTAAATTTACCGCCGGCGAAGTAAA	TGGTCGCGTTTAAATTTACCGCCGGCGAAGTAAA	240
Query 281	TCGTCGCTTGAATTTTACCTTCTCCGGCGGAGACC	TCGTCGCTTGAATTTTACCTTCTCCGGCGGAGACC	TCGTCGCTTGAATTTTACCTTCTCCGGCGGAGACC	340
Sbjct 241	TCGTCGCTTGAATTTTACCTTCTCCGGCGGAGACC	TCGTCGCTTGAATTTTACCTTCTCCGGCGGAGACC	TCGTCGCTTGAATTTTACCTTCTCCGGCGGAGACC	300
Query 341	CCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGT	CCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGT	CCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGT	400
Sbjct 301	CCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGT	CCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGT	CCGAAAGGAAGACATTATAGAGGCGTTAGACAGCGT	360
Query 401	ATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG	ATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG	ATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG	460
Sbjct 361	ATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG	ATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG	ATTAGAGATCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGG	420
Query 461	GAAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGA	GAAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGA	GAAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGA	520
Sbjct 421	GAAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGA	GAAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGA	GAAAGCTGCAATTGCTTATGATAAAGCTGCTTATAGA	480
Query 521	AATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGAACC	AATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGAACC	AATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGAACC	580
Sbjct 481	AATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGAACC	AATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGAACC	AATTTCCCGCACCGGATCGGTTTGAATGAACCGAACC	540
Query 581	CGAGCATCGCCGGAACCGCAAGCTCGTCGGGAAACGG	CGAGCATCGCCGGAACCGCAAGCTCGTCGGGAAACGG	CGAGCATCGCCGGAACCGCAAGCTCGTCGGGAAACGG	640
Sbjct 541	CGAGCATCGCCGGAACCGCAAGCTCGTCGGGAAACGG	CGAGCATCGCCGGAACCGCAAGCTCGTCGGGAAACGG	CGAGCATCGCCGGAACCGCAAGCTCGTCGGGAAACGG	600
Query 641	GCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAG	GCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAG	GCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAG	700
Sbjct 601	GCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAG	GCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAG	GCCGTTTCAGAAATGTGATGGAGAAATGGCGAGTAG	660
Query 701	CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGT	CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGT	CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGT	744
Sbjct 661	CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGT	CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGT	CAAATTGAACAATTGACAGGTGTCCATCAACTATTGGT	704

## 11.4. Proceso de transformación de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig)

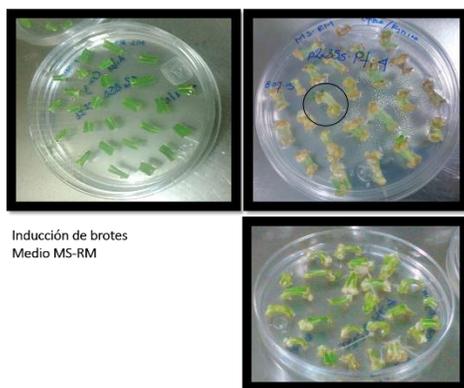
### Preparación



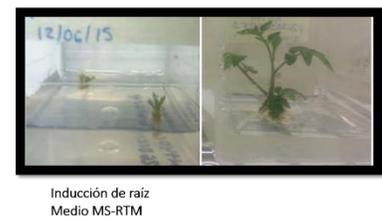
### Transformación



### Inducción de brotes



### Inducción de raíz





Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: **"SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: **"SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. MARIO RAMIREZ YAÑEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: "**SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: **"SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

**DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: "**SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

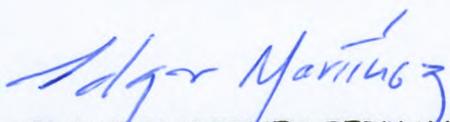
Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DR. EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: "**SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)  
Dr. Edgar Martínez Fernández  
Dr. Mario Ramírez Yáñez  
Dr. Edgar Dantán González  
Dr. José de Jesús Arellano García  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Tesis: **"SOBREEXPRESIÓN DE DIVERSOS FACTORES DE  
TRANSCRIPCIÓN PERTENECIENTES A LA FAMILIA  
AP2/ERF EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE Y SU  
EFECTO EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS BIÓTICO Y  
ABIÓTICO**

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA BELEN ALVAREZ GOMEZ**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para  
editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ