

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“SOBREEXPRESIÓN DE QUITINASAS DE
Serratia marcescens EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO
(*N. tabacum*) Y SU EFECTO CONTRA EL ESTRÉS BIÓTICO Y
ABIÓTICO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

M. EN BIOTEC. SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZÁLEZ

ASESOR: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

CO-ASESOR: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE 2019

Agradecimientos

La presente tesis es un reto académico y personal, que con gran alegría y satisfacción concluyo. El proceso de investigación se llevó a cabo de la mano de personas importantes en mi vida académica y personal que contribuyeron en su enriquecimiento.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi tutor de tesis el Dr. Ramón Suarez Rodríguez y a mi Co-tutor José A. Ramírez Trujillo por su dedicación, consejos y asesoramiento a lo largo del trabajo de investigación. A mi comité tutorial, el Dr. Guadalupe Peña Chora, Dr. Fernando Martínez Morales, Dr. Mario Ramírez Yáñez, Dr. Rubén Paul Gaytán Colín y a la Dra. Verónica Obregón Barboza por todas sus sugerencias e ideas.

Cada día llego más lejos en la vida y debo reconocer que nada de esto sería posible sin el apoyo incondicional de mi maravillosa familia. A mi madre porque a ella no solo le debo la vida, también todo lo que soy. A mi tía Mónica-Navarro que por su experiencia siempre me alentó a continuar con mis estudios de posgrado. A mis abuelos, gracias por enseñarme a disfrutar cada detalle de la vida, gracias por creer en mí.

A Luis A. Casorla, agradezco que nuestros caminos se cruzaran durante nuestros estudios de Doctorado. Siempre motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían ♥.

A todos mis compañeros y amigos de Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas (LFMP). En especial a Tania B. Álvarez quién siempre me demostró lo que es una verdadera amistad, siempre dispuesta a ayudar y pasar un buen rato en compañía de sus inigualables platillos Michoacanos. Lupita Castillo, Saraí Castro siempre guardaré en mi memoria los buenos momentos que pasamos juntas.

A todos ustedes, gracias

Índice

Índice	i	
Índice de figuras	iv	
Índice de tablas	vi	
Anexo	vi	
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Estrés en plantas.....	2
1.2	Quitinasas en la naturaleza.....	3
1.2.1	Estructura de la quitina.....	3
1.3	Clasificación de las quitinasas.....	4
1.3.1	Quitinasas en plantas y su clasificación.....	4
1.4	Quitinasas bacterianas.....	7
1.4.1	Quitinasas de <i>S. marcescens</i>	8
1.4.2	Maquinaria quitinolítica de <i>S. marcescens</i>	8
2	ANTECEDENTES	12
2.1	Estudio de quitinasas de <i>S. marcescens</i> y su papel protector.....	12
2.2	Quitinasas como agentes de biocontrol en plantas.....	12
2.3	Inducción de quitinasas en plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico.....	14
3	JUSTIFICACIÓN	16
4	HIPÓTESIS	16
5	OBJETIVOS	16
5.1	General	16
5.2	Particulares	16
6	ESTRATEGIA METODOLÓGICA	17
7	MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1	Identificación molecular de las cepas bacterianas.....	18
7.2	Clonación e identificación de los genes quitinolíticos de <i>S. marcescens</i>	18
7.3	Actividad quitinolítica <i>in vitro</i> de <i>S. marcescens</i> Bar86 y Bar113.....	18
7.4	Vector de expresión	19
7.4.1	Sobreexpresión de las proteínas recombinantes.....	19
7.4.2	Identificación y purificación de la proteína recombinante ChiC.....	19
7.5	Ensayos <i>in vitro</i> de las enzimas quitinolíticas de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	20
7.5.1	Efecto de <i>S. marcescens</i> Bar86 sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	20
7.6	Determinación de la actividad quitinolítica del aislado bacteriano y proteína recombinante	20
7.7	Transformación de <i>N. tabacum</i>	21
7.7.1	Construcción del vector de transformación	21
7.7.2	Transformación de explantes de <i>N. tabacum</i>	21

7.8	Análisis molecular de las plantas transformadas.....	22
7.8.1	PCR (DNA)	22
7.8.2	RT- PCR (RNA-cDNA).....	22
7.9	Producción del anticuerpo de reconocimiento a la quitinasa ChiC de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	23
8	Determinación de la actividad quitinolítica en plantas transgénicas.....	23
8.1	Pruebas de tolerancia a estrés biótico en plantas transgénicas.....	23
8.1.1	Infección con hongo fitopatógeno <i>B. cinerea</i>	23
8.1.1.1	Análisis de infección con micelio de <i>B. cinerea</i>	23
8.1.1.2	Ensayos de inhibición fúngica con extracto de proteína total de plantas transgénicas de tabaco.....	24
8.2	Bioensayos con larvas.....	24
8.2.1	Bioensayo de toxicidad con larvas de <i>D. magnifactella</i>	24
8.2.2	Bioensayo de toxicidad con larvas de <i>S. frugiperda</i>	24
8.3	Pruebas de estrés abiótico en plantas transgénicas de tabaco	25
8.3.1	Pruebas de tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV)	25
8.3.2	Tolerancia a estrés por salinidad.....	25
8.3.3	Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía y salinidad.....	25
8.4	Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tabaco.....	25
8.4.1	Biomasa.....	25
8.4.2	Producción de semillas.....	26
9	RESULTADOS	27
9.1	Identificación molecular de las cepas bacterianas.....	27
9.1.1	Clonación e identificación de los genes quitinolíticos de <i>S. marcescens</i>	27
9.1.2	Identificación bacteriana y análisis filogenético.....	28
9.1.3	Determinación cualitativa de la actividad quitinolítica de los aislados <i>S. marcescens</i> Bar86 y Bar113 en placa.....	30
9.1.4	Determinación de la actividad quitinolítica de los aislados <i>S. marcescens</i> Bar86 y Bar113.....	31
9.2	Efecto de <i>S. marcescens</i> Bar86 sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	31
9.3	Producción de proteína recombinante ChiC de <i>S. marcescens</i> Bar86 en <i>E. coli</i>	32
9.3.1	Construcción del vector de expresión.....	32
9.3.2	Determinación de la actividad quitinolítica de las quitinasas recombinantes de <i>S. marcescens</i>	33
9.3.3	Identificación y purificación de la proteína recombinante ChiC.....	34
9.3.4	Actividad enzimática en placa de la proteína recombinante ChiC.....	35
9.4	Transformación de <i>N. tabacum</i>	35
9.4.1	Construcción del vector de transformación.....	35
9.4.2	Transformación de explantes de <i>N. tabacum</i>	36
9.4.3	Análisis molecular de las plantas transformadas.....	37
9.4.3.1	PCR (DNA).....	37
9.4.3.2	RT-PCR (RNA-cDNA).....	39

9.5	Producción del anticuerpo de reconocimiento a la quitinasa ChiC de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	40
9.5.1	Detección de la quitinasa en extractos totales de proteína.....	40
9.6	Determinación de la actividad quitinolítica en plantas transgénicas.....	41
9.6.1	Pruebas de tolerancia a estrés biótico en plantas transgénicas.....	42
9.6.1.1	Análisis de infección con <i>B. cinerea</i>	42
9.6.1.2	Ensayos de inhibición fúngica con extractos de proteína total de plantas transgénicas de tabaco.....	43
9.7	Bioensayo de toxicidad con larvas de <i>D. magnifactella</i>	45
9.7.1	Bioensayo de toxicidad con larvas de <i>S. frugierda</i>	45
9.8	Pruebas de estrés abiótico en plantas transgénicas de tabaco.....	46
9.8.1	Pruebas de tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV).....	46
9.8.2	Tolerancia a estrés por salinidad.....	47
9.8.3	Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía y salinidad.....	49
9.9	Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tabaco.....	50
9.9.1	Crecimiento y desarrollo.....	50
9.9.2	Biomasa.....	51
9.9.3	Producción de semillas.....	52
10	DISCUSIÓN	53
11	CONCLUSIONES	56
12	PERSPECTIVAS	56
13	BIBLIOGRAFÍA	57

Índice de figuras

Figura 1	Esquema de la interacción de las rutas de señalización ante un estrés biótico y abiótico a nivel celular en plantas.....	3
Figura 2.	Estructura de una cadena de quitina.....	4
Figura 3.	Distribución de las familias de Glicosilhidrolasas en <i>A. thaliana</i> y <i>Oryza sativa</i>	6
Figura 4.	Clasificación y estructura de proteína tipo quitinasa encontradas en el genoma de <i>Arabidopsis</i>	7
Figura 5.	Organización de dominios de las quitinasas ChiA, ChiB, ChiC1, Chi2 de <i>S. marcescens</i> 2170 pertenecientes a las subfamilias A y B.	9
Figura 6.	Estructura proteica de ChiA de <i>S. marcescens</i>	10
Figura 7.	Estructura proteica de ChiB de <i>S. marcescens</i>	10
Figura 8.	Estructura proteica de ChiC de <i>S. marcescens</i>	10
Figura 9.	Estructura proteica de la chitobiasa de <i>S. marcescens</i>	11
Figura 10.	Estructura proteica de CHBP21 de <i>S. marcescens</i>	11
Figura 11.	Posibles funciones de proteínas altamente glicosiladas (AGPs) en la pared celular....	15
Figura 12.	Diagrama general de la metodología empleada en este trabajo.....	17
Figura 13.	Plásmido representativo del vector de expresión pET28a(+).	19
Figura 14.	Esquema de placas de LB inoculadas con una asada del aislado bacteriano Bar 86 y un disco de agar de <i>B. cinerea</i>	20
Figura 15.	Vector para transformación de plantas p2x35SNOS.	21
Figura 16.	T-DNA del vector para transformación de plantas p2x35SNOS.....	21
Figura 17.	Amplificación por PCR de los genes <i>chiA</i> , <i>chiB</i> , <i>chiC</i> y <i>cbp</i> a partir de DNA genómico de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	27
Figura 18.	Análisis de restricción del plásmido de clonación pTZ57/RT.....	27
Figura 19.	Análisis filogenético. Relación que muestran el 16S rDNA entre el nuevo aislado de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	28
Figura 20.	Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de los productos génicos de quitinasas ChiA del género <i>Serratia</i>	29
Figura 21.	Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de los productos génicos de quitinasas ChiC del género <i>Serratia</i>	29
Figura 22.	Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de los productos génicos de la proteína de unión a quitina (CBP) del género <i>Serratia</i>	29
Figura 23.	Análisis filogenético del gen <i>ChiC</i> de <i>S. marcescens</i> con quitinasas de plantas, insectos, hongos y bacterias.	30
Figura 24.	Las cepas de <i>S. marcescens</i> Bar86 y Bar113 presentaron actividad quitinolítica en placa agar.....	31
Figura 25.	Análisis cualitativo en placas de LB sobre el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> contra <i>S. marcescens</i> Bar86.....	32
Figura 26.	Ensayo de restricción de las construcciones pETChiA, pETChiB, pETChiC Y pETCBP proveniente de células de <i>E. coli</i> cepa BL21.	33

Figura 27.	Análisis de Western blot. Quitinasa recombinante ChiC de la cepa <i>S. marcescens</i> Bar86 fusionada a un Tag de histidinas.....	34
Figura 28.	Purificación y análisis de la proteína recombinante pETChiC proveniente de <i>S. marcescens</i> Bar86.	34
Figura 29.	Actividad de proteína recombinante ChiC en placas de agar Lb adicionadas con quitina coloidal.....	35
Figura 30	Digestión de las clonas obtenidas del proceso de electroporación de células de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404.	36
Figura 31.	Transformación genética en discos de hoja de <i>N. tabacum</i>	36
Figura 32.	Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>chiA</i> de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	37
Figura 33.	Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>chiB</i> de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	38
Figura 34.	Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>chiC</i> de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	38
Figura 35.	Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>cbp</i> de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	39
Figura 36.	Análisis por RT-PCR de plantas homózigas transformadas con ChiC y una línea control wt no transformada.....	40
Figura 37.	Análisis de expresión de la proteína chiC en extractos crudos de plantas de tabaco	40
Figura 38.	Actividad quitinolítica de extractos de proteína total de líneas transgénicas 3.1, 5.5, 12.4 y una planta no transformada, wt.	41
Figura 39.	Actividad quitinolítica de extractos de proteína total de plantas transformadas con las quitinasas ChiA, ChiB, ChiC y CBP.	42
Figura 40.	Ensayo de resistencia en hojas individuales cortadas infectadas con discos de micelio de <i>B. cinerea</i>	43
Figura 41.	Efecto de la proteína ChiC en extractos de hojas de plantas de tabaco transgénico en estado homocigótico sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i>	44
Figura 42.	Bioensayo de alimentación de larvas de <i>D. magnifactella</i>	45
Figura 43.	Bioensayo de alimentación de larvas de <i>S. frugiperda</i>	47
Figura 44.	Contenido de clorofila en discos de hoja en tratamiento con MV.....	47
Figura 45.	Análisis del contenido de MDA bajo condiciones de estrés salino.	48
Figura 46.	Análisis de contenido de clorofila bajo condiciones de estrés salino.....	49
Figura 47.	Evaluación de la germinación bajo condiciones de estrés osmótico y sequía.....	50
Figura 48.	Fenotipo de las diferentes líneas transgénicas y wt en condiciones normales de crecimiento en invernadero a las 4 semanas de crecimiento.....	50
Figura 49.	Evaluación de la biomasa de las diferentes líneas transgénicas y wt bajo condiciones normales de crecimiento en invernadero.....	51
Figura 50.	Evaluación del número de semillas de las diferentes líneas transgénicas y wt bajo condiciones óptimas de crecimiento en invernadero.....	52

Índice de tablas

Tabla 1.	Lista de los 10 hongos más patógenos de plantas.....	1
Tabla 2.	Clasificación de las proteínas relacionadas a la patogénesis.....	5
Tabla 3.	Proteínas producidas por <i>S. marcescens</i>	8
Tabla 4.	Panorama de los reportes de plantas transgénicas que muestran incremento de resistencia fúngica.....	13
Tabla 5.	Oligonucleótidos diseñados en este estudio.....	18
Tabla 6.	Actividad quitinolítica de los aislados de <i>S. marcescens</i> Bar86 y Bar113.....	31
Tabla 7.	Actividad quitinolítica recombinante enzimas quitinasa ChiA, ChiC y CBP de <i>S. marcescens</i> Bar86.....	33

Anexo

A.	Productos de secuenciación del gen ChiA.....	63
	Productos de secuenciación del gen ChiB	64
	Productos de secuenciación del gen ChiC.....	65
	Productos de secuenciación del gen CBP	65
B.	Esquema de inmunización.....	66
C.	Artículo: Enhanced Tolerance against a Fungal Pathogen and Insect Resistance in Transgenic Tobacco Plants Overexpressing an Endochitinase Gene from <i>Serratia marcescens</i>	67

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que inevitablemente se enfrentan a una amplia variedad de estreses que pueden afectar su desarrollo negativamente. El estrés ambiental al que las plantas están expuestas se puede categorizar como: estrés abiótico y estrés biótico. El estrés abiótico incluye salinidad, sequía, anegación, temperaturas extremas, metales pesados, radiación, etc. El estrés biótico incluye el ataque por diferentes patógenos como hongos, bacterias, oomicetes, nematodos y herbívoros.

Para un crecimiento óptimo, las plantas requieren cierta cantidad de cada uno de los factores ambientales tanto bióticos como abióticos, y cualquier desviación de las condiciones óptimas a externas, un exceso o deficiencia química o física que afecte de manera adversa el crecimiento, desarrollo y productividad de la planta es considerado un estrés (Koyro et al., 2012).

El cambio climático, el cambio de uso de suelo, monocultivos, entre otros han provocado daños en los ecosistemas y en consecuencia cambios en las condiciones óptimas de crecimiento de los cultivos, causando sequías, suelos salinos, suelos con bajas concentraciones de nutrientes disponibles provocando cultivos más susceptibles al ataque de microorganismos patógenos y por ende pérdidas de las cosechas; siendo a menudo más severo en países en desarrollo. Dentro de los principales fitopatógenos encontramos hongos generalistas capaces de infectar una amplia variedad de plantas huésped, tanto en plantas de ornato, así como en plantas de interés agronómico durante y después de la cosecha (Ulate et al., 2014), causando pérdidas económicas considerables en la agricultura alrededor del mundo (Jarvis, 1980) las cuales son muy difíciles de estimar debido a su amplio rango de huéspedes (Dean et al., 2012).

Tabla 1. Lista de los 10 principales hongos patógenos de plantas más importantes a nivel mundial		
Posición	Patógeno fúngico	Autor de la descripción fúngica
1	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Ralph Dean
2	<i>Botrytis cinerea</i>	Jan A.L. van Kan
3	<i>Puccinia</i> spp	Zacharias A. Pretorius
4	<i>Fusarium graminearum</i>	Kim Hammond-Kosack
5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Antonio Di Pietro
6	<i>Blumeria graminis</i>	Pietro Spanu
7	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Jason J. Rudd
8	<i>Colletotrichum</i> spp	Marty Dickman
9	<i>Ustilago maydis</i>	Regine Kahmann
10	<i>Melampsora lini</i>	Jeff Ellis

Tomada y modificada de Dean et al. 2012

Este tipo de organismos han desarrollado estrategias complejas para vencer/superar el sistema inmune de las plantas (Weiberg et al., 2013) el cual actúa durante el crecimiento de hifas destruyendo principalmente la lamela media y la suave pared celular primaria del huésped la cual es rica en pectina; induciendo muerte celular y comprometiendo la integridad de los tejidos huésped (Ulate et

al., 2014). También hay la generación de múltiples enzimas que desensamblan los polisacáridos de la pared celular como enzimas que actúan sobre hidratos de carbono incluyendo enzimas modificadoras de pectina, de hemicelulosa, aquellas que se unen a las cadenas laterales de hemicelulosa y enzimas degradadoras de celulosa (Ulate et al., 2014).

El método más común para controlar a hongos e insectos fitopatógenos es la aplicación de compuestos químicos. Para el 2001 el costo promedio para estos compuestos fue de alrededor de €40/ha (Steiger, 2007). El uso de estos compuestos conlleva efectos dañinos, como la pérdida de la microflora natural del suelo, riesgos a la salud de humanos y de la fauna, contaminación de aguas subterráneas, además de la generación de resistencia de este tipo de patógenos. Estas son unas de las cuestiones comúnmente vistas con el uso de estos compuestos (Dean et al., 2012).

La preocupación pública ha aumentado sobre los efectos dañinos que estos compuestos químicos provocan en el ambiente y salud humana, llevando hacia la búsqueda de nuevas alternativas para evitar el uso de químicos; los cuales sean más seguros y amigables para el control de patógenos de plantas (hongos e insectos), así como promover la tolerancia a factores abióticos a los cuales las plantas están en constante contacto y así contender contra dichos factores.

1.1 Estrés en plantas

Para sobrevivir las plantas se protegen a sí mismas respondiendo a condiciones ambientales como sequía, salinidad, temperaturas extremas y ataque patogénico que afectan en gran medida el desarrollo y productividad; por lo que han desarrollado una elaborada red de señalización que perciben estas señales provocadas por estos tipos de estrés, en donde las redes de diferentes cascadas señal finalizan en la modulación de la expresión de diferentes genes específicos a la resistencia. Aparentemente, estas rutas de señalización a estrés biótico y abiótico comparten elementos comunes que son en algunos casos considerados como posibles puntos de encuentro (Kissoudis et al., 2014, de las Mercedes et al., 2006). En estas vías de respuesta al estrés provocan la activación de factores de transcripción para controlar la expresión de genes específicos relacionados al estrés; en donde hormonas como el etileno, ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) juegan un papel importante en regular la defensa inducida contra patógenos, el estado redox; así como la deposición de calosa ayudando al engrosamiento de la pared celular y en su conjunto ayudar a contender mejor (Zhang et al. 2004; Kissoudis et al., 2014) (**figura 1**).

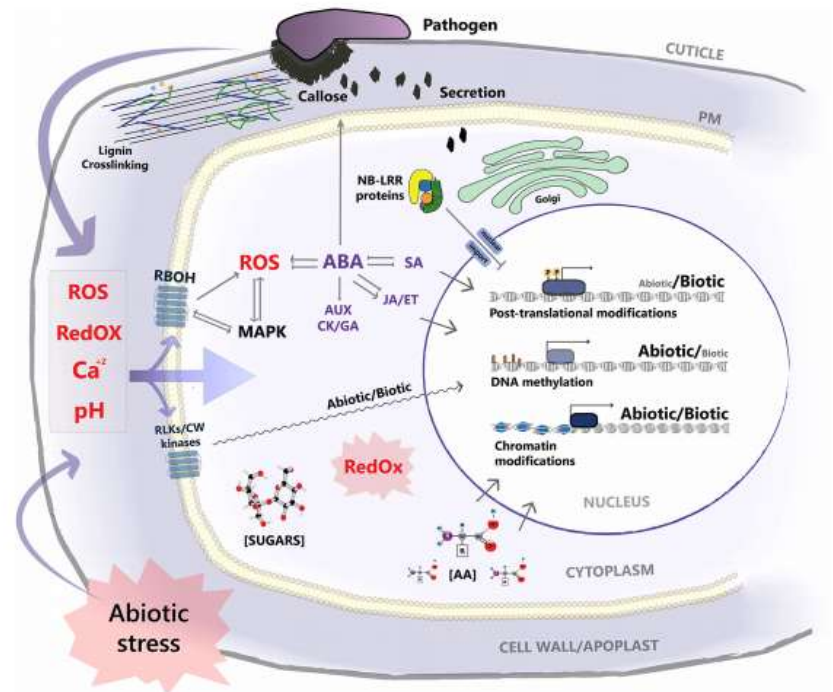


Figura 1. Esquema de la interacción de las rutas de señalización ante un estrés biótico y abiótico a nivel celular en plantas (Kissoudis et al., 2014).

Uno de los productos de respuesta dentro de esta compleja ruta de señalización son las quitinasas. Enzimas que hidrolizan el polisacárido de quitina compuesto de unidades de N-acetilglucosamina. Estas enzimas han recibido gran interés ya que además de que se encuentran presentes en diversos organismos como plantas superiores, mamíferos, bacterias e insectos. En plantas estas enzimas pueden ser expresadas constitutivamente en bajos niveles, pero aumentan dramáticamente por diversos agentes tanto abióticos (etileno, ácido salicílico, soluciones salinas, ozono, luz UV), como bióticos (hongos, bacterias, virus, componente de la pared celular fúngica y oligosacáridos) (Zhang et al., 2004) asociándolas como la defensa general de las plantas (Passarinho et al., 2002).

En plantas transgénicas la expresión de genes que codifican para enzimas de tipo quitinasa, ha proporcionado clara evidencia de su función como defensa en la planta bajo estrés (Punja et al., 1993).

1.2 Quitinasas en la naturaleza

1.2.1 Estructura de la quitina

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Matroodi et al., 2013) después de la celulosa; se encuentra presente en exoesqueleto de insectos, crustáceos, nematodos y sus huevecillos; protozoarios, moluscos, así como en hongos formando parte de la pared celular (Suzuki et al., 1999).

La quitina consiste en unidades de N-acetilglucosamina unidas entre sí con enlaces β -1,4 (**figura 2**).

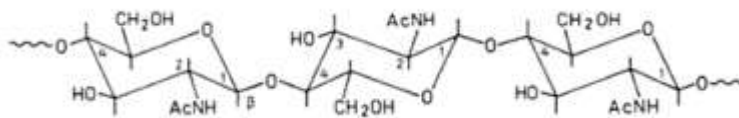


Figura 2. Parte de una cadena de quitina. La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Éstas están unidas entre sí con enlaces β -1,4.

1.3 Clasificación de las quitinasas

Dentro de la familia de las Glicosilhidrolasas (GHs), encontramos a las quitinasas; enzimas pertenecientes a la clase funcional de proteínas más abundante que actúan sobre carbohidratos y representan un 25.7%, basado en programas bioinformáticos como PROSITE, Pfam e InterPro Minic. Estas proteínas están conformadas por cuatro familias de proteínas, las Glicosil Hidrolasas (GHs) con un 19.4% (dentro de las cuales encontramos a las quitinasas), Carbohidrato Esterasas (CEs) 2.4%, Polisacárido Liasas (PLs) 0.6% y Expansinas 2.4% (Minic, 2008; Albenne et al., 2013).

Las quitinasas degradan el polímero de quitina, así como los monómeros de N-acetilglucosamina presentes en el quitosán, lipoquitooligosacáridos, peptidoglicano, arabinogalactano y glicoproteínas los cuales a su vez pueden encontrarse en diversos sistemas biológicos (Grover, 2012) como arqueas, bacterias, hongos, plantas y animales. Estas enzimas tienen como función la modificación del componente estructural de quitina de diversos organismos como crustáceos, insectos y hongos (Melchers et al, 1994) las cuales son de gran importancia para mantener el balance entre carbono y nitrógeno atrapado como quitina insoluble presente en la biomasa (Li et al., 2010).

El sistema de clasificación de éstas se basa en la homología de secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional (3D) y mecanismos hidrolíticos de las reacciones catalíticas. Las quitinasas están clasificadas en dos diferentes familias, 18 y 19. Las quitinasas de la familia 18 se encuentran en diversos organismos como bacterias, hongos, levaduras, virus, plantas y animales. Por otro lado, las quitinasas de la familia 19 están presentes casi exclusivamente en plantas (Suzuki et al., 1999).

1.3.1 Quitinasas en plantas y su clasificación

En plantas, la quitina no es un constituyente de las paredes celulares, sin embargo, durante su ciclo de vida los carbohidratos constituyen la principal clase de compuestos orgánicos en los tejidos de la planta. Los carbohidratos los encontramos unidos a polisacáridos de la pared celular, material de almacenamiento, glicolípidos y glicoproteínas. Por lo tanto, la diversidad estructural y funcional de los carbohidratos implica un amplio espectro de enzimas involucradas en su síntesis (glicosil transferasas), modificación (carbohidrato esterazas) y de rompimiento como las (glicosil hidrolasas) (Albenne et al., 2013).

Las quitinasas, enzimas hidrolíticas en su mayoría de bajo peso molecular y de tipo endoquitinasa (Passarinho et al., 2002); son enzimas clave en el metabolismo de los carbohidratos (Wingler et al., 2006), participando en diferentes eventos fisiológicos como desarrollo embrionario, crecimiento, desarrollo floral, interacciones simbióticas, muerte celular programada (Cletus et al., 2013; Wingler et al., 2006), resistencia a enfermedades como hongos, bacterias e infecciones virales (Graham et al., 1993), y de adaptación general en un ambiente de estrés (presión osmótica, sequía, salinidad, metales pesados, lesiones y heladas) (de las Mercedes et al., 2006; Melchers et al. 1994; Yeh et al., 2000).

Estas enzimas se encuentran expresadas constitutivamente a niveles basales bajos y son fuertemente inducidas cuando las células de la planta huésped se encuentra bajo algún tipo de estrés. Por lo que pertenecen a un grupo de proteínas relacionadas a la patogénesis-PRs (Tabla 2) (Graham et al., 1994).

Tabla 2. Clasificación de las proteínas relacionadas a la patogénesis.		
Familias	Tipo de PR	Propiedades
PR-1	Tabaco PR-1 a	Antifúngica
PR-2	Tabaco PR-2	β -1,3-glucanasa
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasas tipo I,II, IV,V,VI,VII
PR-4	Tabaco 'R'	Quitinase tipo I,II
PR-5	Tabaco S	Tipo taumatina
PR-6	Proteínasa I, Inhibidor de Tomato - Inhibidor	
PR-7	Tomate P69	Endoproteínasa
PR-8	Quitinasa de pepino	Quitinasa tipo III
PR-9	Tabaco 'lignin forming peroxi- dase'	Peroxidasa
PR-10	Perejil 'PR1'	Tipo Ribonucleasa
PR-11	Tabaco 'clase V'	Quitinasa, tipo I
PR-12	Rábano Rs- AFP3	Defensina
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Tionina
PR-14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos
PR-15	Germinado de Cebada OxOa	Oxalato oxidasa
PR-16	Cebada OxOLP	Tipo Oxalato oxidasa
PR-17	Tabaco PRp27	Función desconocida
Se incluyen β -1,3-glucanases, quitinasas, proteínas tipo taumatina, peroxidasas, proteínas de inactivación a ribosomas, de defensa, tioninas, proteínas no específicas de transferencia, oxalato oxidase y proteínas de tipo oxalato-oxidasa (Tomada y modificada de Van Loon y Van Strein, 1999).		

Su acumulación está dada como proteínas solubles de manera intracelular en la vacuola central o extracelularmente en el espacio intercelular de la célula hospedero (Broglie et al., 1991).

Las quitinasas han sido reportadas en más de 41 especies de monocotiledones y dicotiledóneas (Nicolás et al., 2014) y con base a la similitud de secuencia, se propusieron 85 familias diferentes de glicosil hidrolasas (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; Henrissat et al., 2001).

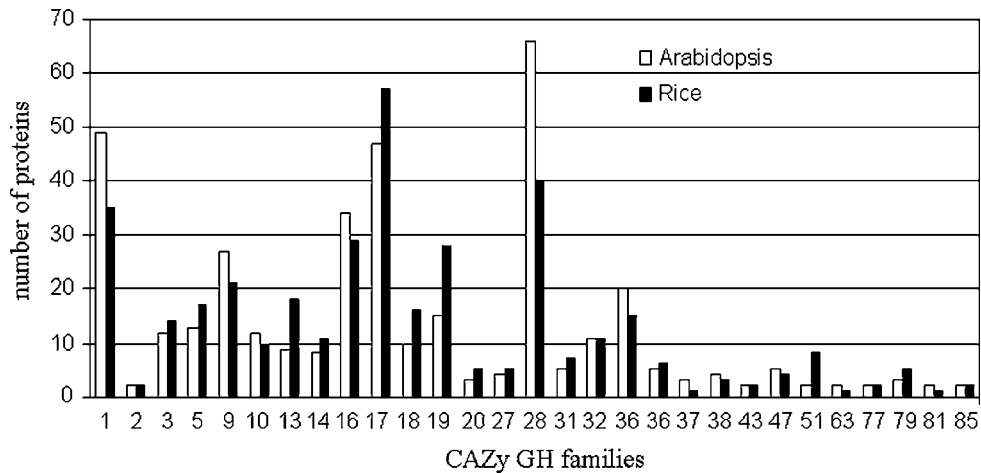


Figura 3. Distribución de las familias de Glicosil hidrolasas en *A. thaliana* y *Oryza sativa*. Proteínas que han sido clasificadas de acuerdo a la nomenclatura CAZy (Henrissat 1998; <http://www.cazy.org/>). Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos descrita en Henrissat et al., 2001.

En *Arabidopsis* se ha reportado que posee 24 marcos de lectura abiertos para quitinasas, lo cual nos habla de la basta diversidad de quitinasas que puede poseer un mismo organismo (Passarinho y Vries, 2002) (**figura 3**).

En cuanto al sistema de clasificación, en todas las plantas analizadas hasta la fecha, las quitinasas de ambas familias (18 y 19) están presentes en una misma planta (Graham et al., 1994). Estas a su vez están organizadas en cinco diferentes clases numeradas del I-V. Las quitinasas de las clases I, II y IV pertenecen a la familia 19 y las clases III y V son de la familia 18 (Li et al., 2010)

Los miembros de las dos familias difieren en su secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional y mecanismos moleculares del sitio catalítico. La familia 18 presenta dominios catalíticos de Triosafosfato isomerasa (TIM) con una estructura básica (barril α/β) y el nivel de conservación de aminoácidos es alto. La familia 19 tiene un alto porcentaje de α -helices y adopta el único mecanismo de sustitución catalítico (Li et al., 2010).

El dominio catalítico de las quitinasas consiste en alrededor de 220 a 230 residuos de aminoácidos (Liu et al., 2010). También poseen un Dominio de Unión de Quitina (CBD, por sus siglas en inglés “Chitin Binding Domain”) y entre la Clase I y II difieren en cuanto a la presencia o ausencia de este dominio. Clase I (presencia) y II (ausencia). El CBD consiste en una región altamente conservada rica en cisteínas de aproximadamente 40 residuos de aminoácidos. La región N-terminal está separada del dominio catalítico por una pequeña región variable de unión rica en prolina. El dominio catalítico en algunos casos está seguido por una extensión en el C-terminal.

La región de la secuencia líder precede un dominio CBD. Las quitinasas de la Clase III son similares a las quitinasas fúngicas y bacterianas y no poseen CBD.

La clase V, fueron por primera vez aisladas de tabaco y son similares a las exoquitinasas de bacterianas y a las quitinasas de la clase III (Melchers et al., 1994). En adición, las quitinasas de clase V tienen una

extensión en el C-terminal para dirigir a vacuola y presenta dos CBDs. La clase III y Clase V muestran actividad de lisozima (Figura 4, Passarinho y Vries, 2002).

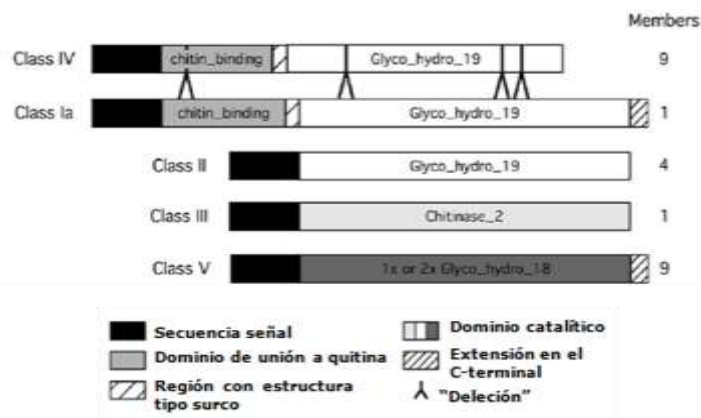


Figura 4. Clasificación y estructura de proteína tipo quitinasa encontradas en el genoma de *Arabidopsis*. Los dominios estructurales están esquemáticamente representados e incluye los nombres de las características correspondientes encontradas en la Pfam, Protein families database. Unión a quitina corresponde a pfam 00187 (Unión a quitina, proteína de reconocimiento); Glico_hidro_19 a la pfam 00182 (Quitinasas, clase I-familia 19); Glico_hidro_18 a la pfam 00704 (familia 18) y la quitinasa_2 a la pfam 00192 (quitinasa de la familia 2) que es subconjunto de la familia 18. El número de miembros presente en cada clase se indican a la derecha (Passarinho y Vries, 2002).

A pesar de que las familias GH18 and GH19 comparten actividad quitinolítica no comparten similitud en secuencia. Estas 2 familias se diferencian claramente por su secuencia y estructura tridimensional, indicando que provienen de diferentes genes ancestrales (Tyler et al., 2010) y que son generadas por procesos de transposición (Shinshi et al., 1990) y que además podría estar seguida de mutaciones que darían origen a quitinasas catalíticamente inactivas de tipo quitinasa (CLPs, del inglés chitinase-like proteins) con pérdida en la actividad. Estas últimas, aunque comparten alta homología en secuencia y estructura podrían carecer de unión y actividad catalítica hacia su sustrato (Kesari et al., 2015). Es por esto que, a pesar del exhaustivo trabajo reportado en literatura, las estructuras y sistema de clasificación de quitinasas de plantas aún es un tema complicado (Taira, 2010).

1.4 Quitinasas bacterianas

Las quitinasas bacterianas tienen un papel vital en mantener un balance ecológico degradando y convirtiendo la quitina en formas biológicamente útiles, además de funciones importante del ciclo de vida normal del organismo, como la morfogénesis y división celular, así como proporcionar de carbono y nitrógeno a las células (Grover, 2012). Dentro de los organismos degradadores de quitina encontramos bacterias capaces de degradar polímeros de quitina (1→4) N-acetil- β-D-glucosamina (GlcNAc) como *Serratia marcescens*, la cual recibe especial atención ya que es una de las bacterias más efectivas en la degradación de quitina (Grimont et al., 2006).

1.4.1 Quitinasas de *S. marcescens*

S. marcescens ha sido aislada de suelo, agua, alimentos y en la superficie de plantas y animales (Mekhael et al, 2009). Ya que es una de las bacterias más efectivas en la degradación de quitina (Grimont et al., 2006) y representa la única especie patogénica, aunque hay pocos reportes de infección por *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* y *S. odoriferae* (Khanafari et al., 2006). Debido a su actividad quitinolítica *S. marcescens* tiene un gran potencial para ser utilizada como agente de control biológico contra hongos fitopatogénicos (Román et al., 2014) y es una de las bacterias quitinolíticas más estudiadas (Suzuki et al. 2002; Suzuki et al., 1999; Vaaje-Kolstadt et al., 2013); así como uno de los 100 organismos más eficiente en degradar quitina (Monreal et al., 1969).

1.4.2 Maquinaria quitinolítica de *S. marcescens*

Las quitinasas de *S. marcescens* hidrolizan el polisacárido de quitina en N-acetilglucosamina ya sea de manera endo o exo, en el enlace 1-3 y 1-4; respectivamente (van Aalten et al., 2000). Las endoquitinasas cortan al azar la cadena de quitina mientras que las exoquitinasas se unen a los extremos de la cadena y escinden quitobiosa (GlcNac)₂ o quitotriosa (GlcNac)₃ del extremo reductor o no reductor de la cadena de quitina (Suzuki et al., 1999).

S. marcescens secreta al menos tres enzimas extracelulares de tipo quitinasa ChiA (exoquitinasa), ChiB (exoquitinasa) y ChiC (endoquitinasa), una quitobiasa (Chb) y una proteína de unión a quitina no catalítica (CHBP, por sus siglas en inglés, “non-catalytic chitin binding protein”) pertenecientes a la familia 18 (Román et al., 2014).

Tabla 3. Proteínas producidas por <i>S. marcescens</i> . Localización celular de las proteínas quitinolíticas y la presencia o ausencia del péptido señal			
Quitinasas de <i>Serratia marcescens</i>			
Banda SDS-PAGE (kDa)	Gen (Nombre de la proteína)	Localización en <i>S. marcescens</i>	Péptido señal en el N-terminal
57-58	<i>Endo-chiA</i> (ChiA)	extracelular	si
52-54	<i>chiB</i>	periplasma/extracelular	no
48-52	<i>chiC</i> (ChiC)	extracelular	no
95	<i>chb</i>	periplasma	si
21-22	<i>Cbp</i> (CBP21)	extracelular	si
Tomada de Brurberg et al., 2000			

ChiA consiste de un dominio β-N-terminal y un dominio catalítico tipo barril (β-α)₈ con un pequeño dominio insertado entre la séptima y octava hoja-β del barril (β-α)₈. ChiB consiste de un dominio catalítico que tiene un plegado similar al de ChiA y un pequeño dominio de unión a quitina (ChBD) en su C-terminal. A pesar de tener los dominios catalíticos con plegados similares, las dos quitinasas son consideradas que digieren cadenas de quitina en dirección opuesta, esto es que ChiA degrada la cadena de quitina en el extremo reductor y ChiB en el extremo no-reductor. ChiC2 es un derivado

proteolítico de ChiC1 y es la única quitinasa que presenta un dominio catalítico de la subfamilia-de tipo B (Suzuki, 2002).

Las quitinasas de *S. marcescens* pertenecen a la familia 18 y pueden dividirse en dos subfamilias, subfamilias A y B a partir de la similitud en la secuencia de aminoácidos de sus dominios catalíticos, **figura 4**.

La mayor diferencia estructural deducida a partir de la comparación de su secuencia de aminoácidos entre las subfamilias A y B es que las quitinasas de la subfamilia A, tiene un dominio de inserción entre la séptima y octava hoja- β del dominio catalítico del barril (β - α)₈ que está ausente en las quitinasas de la subfamilia B. ChiC1 tiene el dominio catalítico de la subfamilia B, mientras ChiA y ChiB tienen el de la subfamilia A. Esta quitinasa también tiene un dominio de fibronectina tipo-III (FnIII_D), ausente en ChiA y ChiB, la cual es estructuralmente muy diferente a diferencia de las otras dos quitinasas ver (**figura 5**), (Suzuki et al., 2002). Las tres quitinasas son multimodulares (**figura 5**) con un módulo de unión a quitina con plegado tipo fibronectina FnIII acoplado río abajo del módulo de unión CBM12 (ChiC). El tamaño completo de ChiC (ChiC1) tiende a ser escindido por proteasas endógenas para dar origen a ChiC2 (esto ha sido observado tanto en *S. marcescens* y cuando es expresada recombinante en *Escherichia coli*).

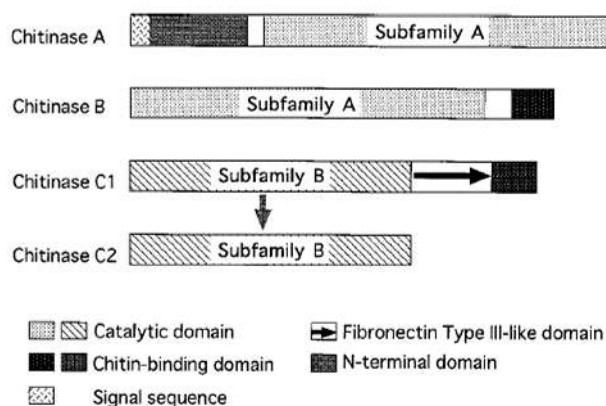


Figura 5. Organización de dominios de las quitinasas ChiA, ChiB, ChiC1, Chi2 de *S. marcescens* 2170 pertenecientes a las subfamilias A y B. Se representan las diferencias estructurales deducidas a partir de la comparación de su secuencia de aminoácidos entre las subfamilias A y B (Suzuki et al., 1999).

- ChiA presenta la actividad específica más alta hacia cadenas largas de quitooligosacáridos y quitina insoluble, (Suzuki et al., 2002). ChiA es producido como un precursor de 563 residuos, secretado celularmente con escisión de un péptido señal N-terminal. La enzima resultante presenta 540 residuos y se calcula con un peso molecular de 58.5 kDa (**figura 6**), (Brurberg et al., 2000).

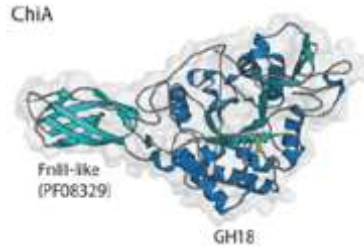


Figura 6. Estructura proteica de ChiA de *S. marcescens*, posee el módulo FnIII en el dominio N-terminal el cual contiene residuos aromáticos expuestos los cuales contribuyen a la unión del sustrato y eficiente hidrólisis del sustrato (Vaaje-Kolstad et al., 2013).

- ChiB presenta baja afinidad hacia quitina en polvo y alta afinidad hacia quitotriosa, (GlcNAc)₃ soluble, (Suzuki et al., 2002). Aparte de la eliminación del residuo de metionina del N-terminal, el producto primario del gen *chiB* parece no ser procesado, a pesar del hecho de que el gen es exportado en *S. marcescens*. La proteína ChiB madura contiene 498 residuos y se le calcula un peso molecular de 55.4 kDa (**figura 7**), (Brurberg et al., 2000).

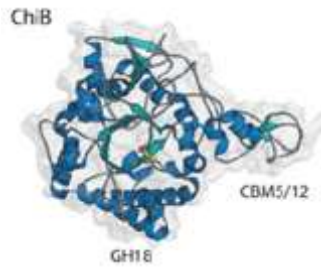


Figura 7. Estructura proteica de ChiB de *S. marcescens* posee un modelo de unión a quitina CBM5 en el C-terminal, (Vaaje-Kolstad et al., 2013).

ChiC es la forma más activa hacia formas solubles de quitina (Suzuki et al., 2002). El gen *ChiC* da origen a un producto de 479 residuos y con un peso molecular de 52 kDa (Brurberg et al., 2000). La quitinasa C es la única quitinasa de *S. marcescens* que posee un dominio Fn3 (**figura 8**), (Suzuki et al., 1999).

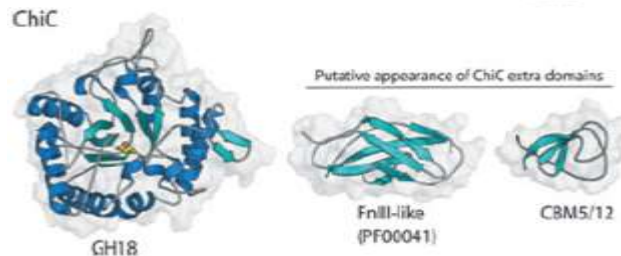


Figura 8. Estructura proteica de ChiC de *S. marcescens*, posee un módulo FnIII en el C-terminal acoplado a un módulo de unión a quitina CBM12. Esta enzima carece del dominio $\alpha + \beta$ y tiene una hendidura de unión al sustrato mucho menos profunda que las quitinasas ChiA. (Vaaje-Kolstad, et., 2013).

- La quitobiasa, (Chb) de 95 kDa que pertenece a la familia 19 de glicosil hidrolasas y es la de mayor tamaño dentro de la maquinaria quitinolítica. Esta es producida como un precursor de 885 residuos, el cual es exportado con la eliminación de un péptido señal de 27 residuos en el N-terminal (Brurberg et al., 2000). Es posible que a nivel estructural es necesaria para la degradación completa de quitina a GlcNAc, **figura 9**.

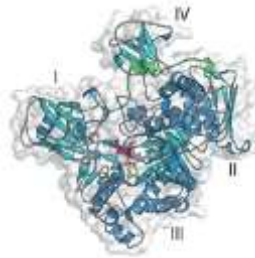


Figura 9. Estructura proteica de la quitobiasa de *S. marcescens*. La enzima comprende cuatro dominios: los dominios I, II y IV están organizados alrededor de un dominio catalítico central (III). Dominios I, II y III están estrechamente asociados, mientras que el dominio IV forma una protuberancia. (Vaaje-Kolstad et al., 2013).

- La proteína de unión a quitina, CHBP21 tiene un aparente peso molecular de 21 kDa, es un precursor de 197 residuos, el cual es exportado con la eliminación del péptido señal de 27-residuos en el N-terminal. La proteína madura consiste en 170 y una masa molecular calculada de 18.8 kDa. Se creía que carecía de actividad quitinasa, sin embargo, es necesaria para la modificación de la estructura del sustrato y así incrementar el acceso de las enzimas, **figura 10** (Vaaje-Kolstad et al., 2005, Vaaje-Kolstad et al., 2013).

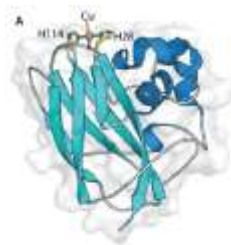


Figura 10. Estructura proteica de CHBP21 de *S. marcescens*. Es una enzima monomérica con una arquitectura deformada de β -sándwich plegada que consiste en dos hojas β estabilizadas por dos puentes disulfuro y un núcleo hidrofóbico formado por múltiples triptófanos (Vaaje-Kolstad et al., 2013).

La degradación eficiente de quitina es realizada por la acción combinada de las diferentes quitinasas. En dónde se ha reportado un efecto sinérgico por la acción combinada de ChiA y ChiB o ChiC (Román, 2014; Suzuki, 2002) con una actividad independiente y no de una interacción física entre ellas, (Brurberg et al., 1996; Brurberg et al., 2000)

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudio de quitinasas de *S. marcescens* y su papel protector

Se han realizado diferentes estudios sobre las quitinasas de *S. marcescens* y su papel protector contra patógenos fúngicos e insectos. Saphira y colaboradores en 1989 realizaron pruebas de expresión heteróloga del gen ChiA de *S. marcescens* en *E. coli* pBR322 con un promotor fuerte del bacteriófago lambda, comprobando su actividad en placas que contuvieran quitina al 0.3% obteniendo el correspondiente halo de degradación de la quitina. La proteína de interés fue expresada en *E. coli* obteniendo una banda de 56 kDa correspondiente al producto del gen ChiA. Seguido de esto, se estudió el efecto de estas quitinasa sobre el hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* en ensayos en placa adicionadas con quitinasa A, mostrando un decremento en el diámetro de las hifas. Posteriormente se observó que hubo una reducción del 62% de los síntomas de la enfermedad en semillas de algodón y frijol crecidas en sustrato infestado con *S. rolfsii* y regadas con el extracto parcialmente puro de quitinasa A (Saphira et al., 1989). Someya y colaboradores en el 2001 además de estudiar la actividad quitinolítica en placas suplementados con quitina 0.2%, analizaron la actividad antifúngica de las enzimas quitinolíticas de *S. marcescens* cepa B2 en donde la germinación de las conidiosporas de *B. cinerea* que fue inhibida tanto por la endoquitinasa y la quitobiosa (una tercera clase de enzima quitinolítica que convierte dímeros de GlcNac a monómeros) de *S. marcescens* (Someya et al., 2001).

Por otro lado, las quitinasas también poseen un papel de biocontrol contra insectos. Se han realizado ensayos de supervivencia en huevecillos del escarabajo *Nicrophorus vespilloides*, donde huevecillos de este insecto se incubaron con *S. marcescens* y se analizaron el número de huevecillos que lograron eclosionar, observándose que la exposición a esta bacteria reduce significativamente la supervivencia de estos (Jacobs et al., 2014). La expresión de quitinasas de insectos como *Manduca sexta* en baculovirus recombinante, mata larvas de *Spodoptera frugiperda* en tres cuartos de tiempo que el virus silvestre (Gopalakrishnan et al., 1995).

2.2 Quitinasas como agentes de biocontrol en plantas

Tanto los ataques patogénicos como los físicos provocan la disminución en el rendimiento de los cultivos en todo el mundo por lo que las enzimas quitinolíticas reciben gran interés biotecnológico. Primeramente, porque estas enzimas pueden ser utilizadas para convertir la biomasa que contenga quitina en componentes útiles depolimerizados (Brurberg et al., 2000). Segundo, está bien documentado que las quitinasas de diversas fuentes pueden ser utilizadas para el control de hongos e insectos patógenos de plantas (Tabla 3) (Melchers y Stuver, 2000); a través de la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas de degradación como las quitinasas provenientes de diferentes fuentes (Tabla 4).

Tabla 4. Panorama de los reportes de plantas transgénicas que muestran incremento de resistencia fúngica		
Planta	Transgenes	Patógeno
Tabaco	PR-1 ^a , SAR 8.2 Quitinasa clase III Chin-I Quitinasa de frijol (CH5B) Cebada RIP <i>Serratia marcescens</i> Chi-A Cebada Chi + Glu Cebada Chi + RIP Arroz Chi + Alfalfa Glu Rábano Rs-AFP	<i>Peronospora tabacina</i> , <i>Phytophthora parasítica</i> , <i>Phythium</i> <i>Phytophthora parasítica</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Cercospora nicotianae</i> <i>Alternaria longipes</i>
Zanahoria	Tabaco Chi-I + Glu-I Tabaco AP24	<i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria radicina</i> <i>Cercospora carotae</i> <i>Erysiphe heracler</i>
Tomate	Tabaco Chi-I + Glu-I	<i>Fusarium oxysporum</i>
Brassica napus	Quitinasa de frijol Tomate/quitinasa de tabaco	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Cylindrosporium conc.</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Phoma lingam</i>
Papa	AP24 Glux-ox Aly AFP	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Phytophthora infestans</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>Verticillium</i>
Arroz	Arroz Chi	<i>Rhizoctonia solani</i>
Trigo	Aly AFP	<i>Fusarium</i>
Tomada Melchers y Stuiver, 2000		

Así mismo como antes mencionado, el uso de quitinasas de diversas fuentes (Tabla 4) como es el caso de *S. marcescens* y su sobreexpresión en plantas transgénicas permiten estudiar el posible papel de protección contra diferentes tipos de estrés.

El grupo de Dunsmuir y colaboradores (1993), demuestran la resistencia a la enfermedad fúngica de *Rhizoctonia solani* en líneas transgénicas de tabaco que expresan dos quitinasas de *S. marcescens* ChiA y/o ChiB. Demostrando ser efectivas contra la infección del hongo fitopatogénico *R. solani*, causante de la podredumbre.

Lorito et al en 1998, desarrolló plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que sobreexpresan una endoquitinasa (CHIT42) de *Trichoderma harzianum* las cuales demostraron ser altamente tolerantes a patógenos foliares de *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* y también a patógenos transmitidos por el suelo como *R. solani* causante de la podredumbre que

mata a plántulas en horticultura (Lorito et al., 1998). La sobreexpresión de otra endoquitinasa (CHIT33) de *T. harzianum* cepa CECT2413, aumenta considerablemente la protección antifúngica en estudios *in vitro* de confrontación contra *R. solani*. Además de presentar una significativa similitud de respuesta patogénica asociada a quitinasas de la clase III de plantas (Limón et al., 1995).

En el 2003 Carstens y colaboradores, estudiaron la actividad antifúngica del producto del gen de la quitinasa CTS1-2 de *S. cerevisiae* contra *B. cinerea*. Para este propósito se desarrollaron plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan constitutivamente el gen de interés bajo el control de un promotor 35S CaMV. La actividad de la enzima de la planta en estudios *in vitro* y el efecto antifúngico del gen de interés contra *B. cinerea* en estudios *in vitro* fueron analizados y se confirma que la quitinasa de la levadura tiene una fuerte actividad antifúngica contra el hongo en la progenie F1 de las plantas transgénicas, resultando candidatos ideales para aumentar la resistencia natural de las plantas a través de la sobreexpresión constitutiva de estos genes de defensa normalmente inducibles.

Ante una señal externa por un ataque fitopatogénico los quitooligosacáridos son elicitores de tipo endógeno o exógeno los cuales son reconocidos vía receptores de membrana siendo posiblemente este el primer paso en la ruta de señalización por quitinasas. Estas señales desencadenan diversas respuestas en la planta que van acompañadas por un estallido oxidativo, fosforilación de proteínas específicas, biosíntesis de fitoalexinas, activación transcripcional de genes de defensa y estimulación de división celular (Kim et al., 2000) lo que ayuda a la planta a contender mejor ante el estrés al que se expone (Day et al., 2001).

2.3 Inducción de quitinasas en plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico

En plantas las quitinasas han demostrado ser un componente integral de respuesta ya que a lo largo del ciclo de vida de la planta existen procesos fisiológicos en los que están involucradas las quitinasas, como la regulación de la germinación, crecimiento, la maduración y control del aflojamiento de la pared celular durante este proceso, abscisión, defensa contra ataques patogénicos, mecanismos de resistencia, e interacciones con el ambiente (Kasprzewska. 2003; Hamid et al., 2013) en donde estas enzimas tienen como sustrato carbohidratos que son constituyentes de la pared celular, materiales de almacenamiento y glicoproteínas. Respondiendo concertadamente con otras proteínas relacionadas a la defensa (Graham et al., 1993).

de las Mercedes y colaboradores en el 2006, reportan la producción de plantas de tabaco que sobreexpresan endoquitinasas de *T. harzianum* codificadas por el gen *chit33* y el gen *chit42*, evaluando la tolerancia a una amplia gama de agentes de estrés tanto biótico (patógenos fúngicos) como abióticos (estrés salino y altas concentraciones de metales pesados) en el medio de cultivo. En este trabajo se evaluó la actividad de cada uno de estos genes por sí solos o en combinación. Demostrando una aumentada tolerancia a estrés biótico y abiótico logrados por la sobreexpresión de un solo gen fúngico en plantas por lo que se propone que las moléculas como quitooligosacáridos u oligómeros de quitina pueden actuar como elicitores que inducen la inmunidad innata de la planta contra el patógeno invasivo.

En 1991 Broglie y colaboradores desarrollaron plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan constitutivamente una quitinasa de frijol bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, estas plantas fueron examinadas a través de análisis de inmunoblot con anticuerpos policlonales a la quitinasa de frijol y estas mostraron una banda en tamaño idéntico a la proteína del frijol. Plantas homocigas se crecieron en presencia de *R. solani* para determinar la susceptibilidad al ataque fúngico mostrando una incrementada habilidad de supervivencia en suelo infestado con el patógeno fúngico *R. solani* y disminuyendo el desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Mucho se sabe de la clase de agentes biótico y/o abióticos que inducen la sobreexpresión de genes quitinasa, pero poco se ha elucidado acerca de las rutas bioquímicas por las cuales son inducidas y la interacción entre las mismas; ya que al parecer las vías de señalización para el estrés biótico y abiótico comparten elementos en común, debido a que las plantas están respondiendo a diversos estreses al mismo tiempo (**figura 1**). Un ejemplo de lo podría estar sucediendo ante un estrés abiótico, en donde están implicadas proteínas implicadas en la señalización como el Arabinogalactan (AGPs) que es una glicoproteína que forma parte de la pared celular (CWP). Cuando esta glicoproteína es hidrolizada su enlace al glicosilfosfatidilinositol (GPI) por acción de una fosfolipasa; libera hacia el espacio extracelular y la pared celular AGPs altamente glicosilados, los cuales se propone además almacenan Ca^{2+} y que, al ser liberado en respuesta a diferentes estímulos, activa las cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} . La N-acetilglucosamina presente en el AGP contiene ramificaciones de carbohidratos que podrían ser blanco de acción de las quitinasas, liberando oligosacáridos con funciones de señalización (**Figura 11**).

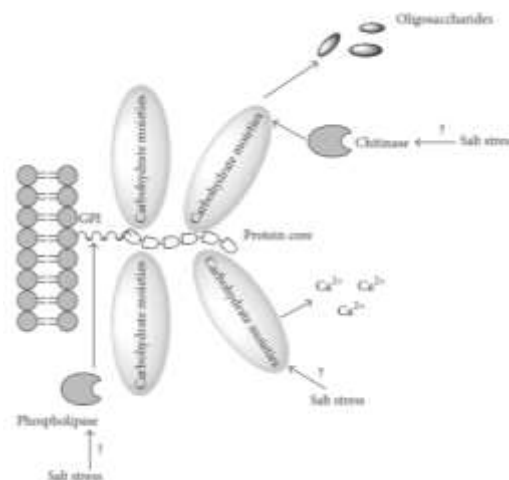


Figura 11: Posibles funciones de proteínas altamente glicosiladas (AGPs) en la pared celular. 1) Una fosfolipasa específica hidroliza el anclaje del glicosilfosfatidilinositol (GPI) liberando AGPs hacia el espacio extracelular y la pared celular. 2) AGPs podrían actuar como moléculas de almacenamiento para el Ca^{2+} y liberarlo en respuesta a diferentes estímulos activando las cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} . 3) La N-acetilglucosamina contiene ramificaciones de carbohidratos que podrían ser blanco de acción de las quitinasas, liberando oligosacáridos con funciones de señalización (Zagorchev et al., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Las condiciones ambientales adversas causadas por diferentes factores bióticos y abióticos ponen a prueba el crecimiento, desarrollo y producción de cualquier planta y/o cultivo. Estos factores provocan una reprogramación en el metabolismo de la planta y en consecuencia una disminución en su desarrollo que se traduce en pérdidas económicas importantes a nivel mundial.

El estudio de aislados bacterianos endémicos del estado de Morelos, resulta de suma importancia para el análisis de enzimas quitinolíticas como las que posee *S. marcescens*. Esta bacteria es de interés biotecnológico ya que ha demostrado ser efectiva para el control de hongos patógenos debido a que el principal componente de la pared celular es quitina.

Dentro de las plagas de cultivos encontramos a hongos fitopatogénicos los cuales causan grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Para el control de los mismos, el método comúnmente utilizado es la aplicación de químicos, que conllevan diversos efectos dañinos sobre flora y fauna.

Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión de quitinasas en plantas proporciona tolerancia a una amplia gama de agentes tanto bióticos como abióticos. Por lo cual, contar con un modelo de expresión como son las plantas transgénicas de tabaco que expresen enzimas quitinolíticas de *S. marcescens*, permitirá evaluar en bioensayos su papel protector contra estrés biótico y abiótico.

4. HIPÓTESIS

Las plantas transgénicas de tabaco que expresen enzimas quitinolíticas de la bacteria *S. marcescens* Bar86, poseerán una mejor capacidad de contender contra el estrés biótico y abiótico.

5. OBJETIVOS

5.1 General.

Expresar enzimas quitinolíticas de *Serratia marcescens* Bar86 y evaluar su papel protector ante estrés biótico y abiótico en plantas de tabaco.

5.2 Particulares

- 1.- Identificar molecularmente los aislados bacterianos provenientes de cadáveres de *D. magnifactella*.
- 2.- Clonar y expresar los genes *chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp* de *S. marcescens* Bar86.
- 3.- Obtener plantas transgénicas de tabaco que expresen cada una de las enzimas quitinolíticas de *S. marcescens* Bar86, ChiA, ChiB, ChiC y CBP.
- 4.- Realizar pruebas de estrés de estrés biótico y abiótico en plantas sobreexpresantes de la quitinasa ChiC.

6. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

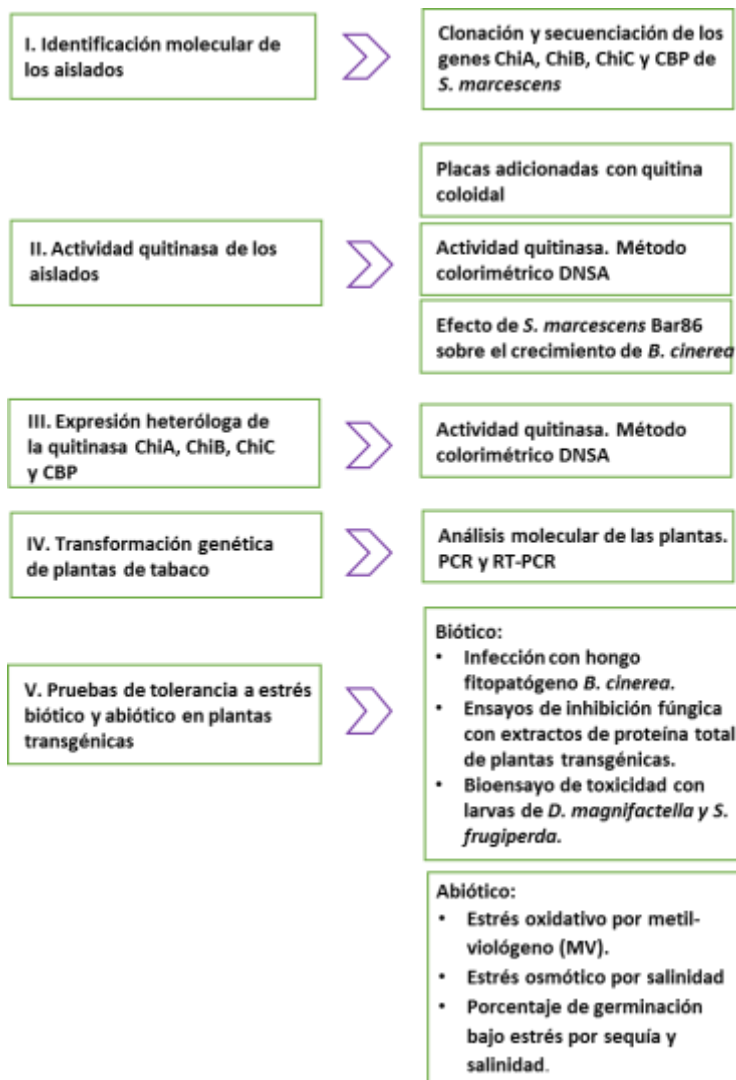


Figura 12: Diagrama general de la metodología empleada en este trabajo. Se divide en cinco partes en las que se lleva a cabo, **I.** identificación molecular de los aislados, **II.** Actividad quitinasa de los aislados, **III.** Expresión heteróloga de la quitinasa ChiC, **IV.** Transformación genética de plantas de tabaco, **V.** Pruebas de tolerancia a estrés biótico y abiótico en plantas transgénicas.

7. Materiales y métodos

7.1 Identificación molecular de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas Bar86 y Bar113 fueron proporcionadas por el Dr. Guadalupe Peña Chora del Centro de Investigaciones Biológicas, (CIB-UAEM) las cuales fueron aisladas de cadáveres del barrenador de la caña *D. magnifactella*.

Para identificar la especie se realizó la amplificación del gen 16S con oligos universales 63F y L1401 (López et al., 2003). La secuencia del fragmento fue analizada haciendo una comparación de secuencias por medio de un Blast de nucleótidos depositados en la base de datos NCBI y se determinó el género de la cepa bacteriana.

7.2 Clonación e identificación de los genes quitinolíticos de *S. marcescens*

Se diseñaron oligonucleótidos basados en las secuencias consenso de quitinasas de *S. marcescens* Bar86 (*chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp*) depositadas en el GenBank. Los sitios de restricción utilizados fueron *BamHI-SacI* para *chiA*, *chiC* y *cbp* y *XbaI-SacI* para *chiB* (Tabla 5) los cuales fueron clonados en el vector pTZ57R/T y finalmente fueron enviadas a secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM).

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados en este estudio	
Nombre del primer	Secuencia (3'-5')
chiA-F	GGATCC ATG CGC AAA TTT AAT AAA CCG
chiA-R	GAGCTC TTA TTG AAC GCC GGC GCT ATT
chiB-F	TCTAGA ATG TCC ACA CGT AAA GCG GTT
chiB-R	GAGCTC TTA CGC CAC ACG GCC CAC CTT
chiC-F	GGATCC ATG AGC ACA AAT AAC ACT AT
chiC-R	GAGCTC TTA GGC GAT GAG CTG CCA CAG
cbp-F	GGATCC ATG CAC GGT TAT GTC GAA TCG CCG
cbp-R	GAGCTC TTA TTT GCT CAG GTT GAC GTC GAT

7.3 Actividad quitinolítica *in vitro* de *S. marcescens* Bar86 y Bar113

Para estudiar la actividad quitinolítica de los aislados bacterianos de *S. marcescens* Bar86 y Bar 113 provenientes de cadáveres del barrenador de la caña *D. magnifactella*, se inocularon placas de medio LB agar nutritivo adicionadas con quitina coloidal (Mohammed et al., 2011) se incubaron por 4 días a 30°C hasta la generación del halo de degradación alrededor de la colonia bacteriana (Roberts y Selitrennikoff, 1988).

7.4 Vector de expresión

Para realizar las pruebas de actividad quitinolítica *in vitro* se utilizó el sistema de expresión pET, plásmido pET28a(+) Novagen® y se clonaron cada uno de los genes aislados de *S. marcescens* Bar86 los cuales codifican para las quitinasas ChiA, ChiC y CBP flanqueados por los sitios de restricción *Bam*HI y *Sac*I y para la quitinasa ChiA, ChiC y CBP ; para ChiB por *Xba*I-*Sac*I (Figura 13).

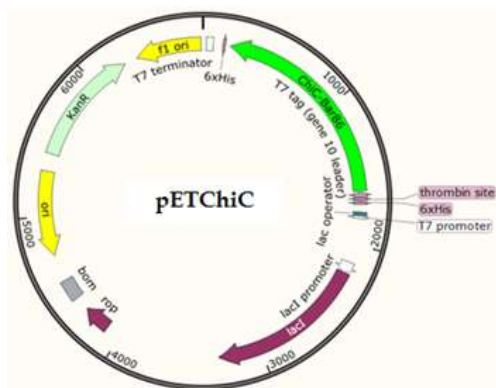


Figura 13. Plásmido representativo del vector de expresión pET28a(+) que está bajo control de transcripción del bacteriófago T7; la expresión es inducida por la T7 ARN polimerasa en la célula huésped. En color verde se muestra como ejemplo la secuencia génica que codifica para la quitinasa ChiC de *S. marcescens* Bar86.

7.4.1 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes

Los plásmidos pET28a(+) que contienen los genes clonados de *S. marcescens* Bar86 (*chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp*, Fig. 11) fueron transformados en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) y posteriormente, se adicionó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y la inducción se llevó a cabo durante 6h.

7.4.2 Identificación y purificación de la proteína recombinante ChiC

La proteína recombinante ChiC se obtuvo por la sobreexpresión en el plásmido pET28a(+) (pETChiC) se detectó por la técnica de Western blot y posteriormente se purificó por Cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) usando una columna de afinidad a Níquel His-Trap™ HP - 1mL y posteriormente por columna de exclusión Superdex™ 75. Este proceso se realizó en colaboración con del Dr. Rubén Paul Gaytán Colín, IBT-UNAM.

7.5 Ensayos *in vitro* de las enzimas quitinolíticas de *S. marcescens* Bar86

7.5.1 Efecto de *S. marcescens* Bar86 sobre el crecimiento de *B. cinerea*

Para observar de manera cualitativa la actividad quitinolítica del aislado bacteriano se inocularon placas de LB con una asada del aislado bacteriano cultivado previamente en placas del mismo medio por 24h a 30°C y un disco de agar de *B. cinerea* de un estadio de crecimiento activo (**figura 14**). Las placas se incubaron 6 días a 30°C (Islam et al., 2016).

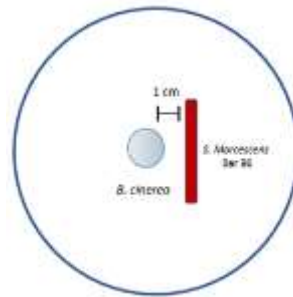


Figura 14. Esquema de placas de LB inoculadas con una asada del aislado bacteriano Bar 86 y un disco de agar de *B. cinerea* (0.5 cm)

7.6 Determinación de la actividad quitinolítica del aislado bacteriano y proteína recombinante

Para la medición de la actividad quitinolítica de *S. marcescens* Bar86 se utilizó el método colorimétrico DNSA; por sus siglas en inglés 3, 5 Dinitrosalicilic Acid (Mohammed et al., 2011).

Para inducir las enzimas quitinolíticas, se cultivó *S. marcescens* Bar86, en 50 mL de medio LB adicionado con 1% de quitina coloidal, y en LB como control. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 30°C durante 24h.

También se analizaron extractos crudos de cultivos de las cepas de *E. coli* (previamente sonicados) que contenían el plásmido de expresión pET28a(+) con cada una de las secuencias génicas que codifican para las quitinasas ChiA, ChiB, ChiC y cbp las cuales fueron inducidas con IPTG 1mM por 8h.

Se realizó una mezcla de reacción en tubos eppendorf que contenían 0.5 mL de quitina coloidal al 1.5% en buffer de fosfatos 10 mM pH 7.5 y 0.5 mL de la enzima (sobrenadante de cada cultivo). La mezcla se mezcló e incubó a 50 °C por 1h. Posterior a esto, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min y a continuación se tomaron 0.5 mL del sobrenadante en un tubo y se agregaron 0.5 mL del reactivo DNSA (ácido 3-5 Dinitrosalicílico) mezclando cuidadosamente. El tubo se dejó en incubación a 100°C por 10 min, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se realizó la medición correspondiente con la ayuda de un espectrofotómetro a una densidad óptica de 540 nm.

Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva estándar de N-acetilglucosamina, donde una unidad de actividad quitinolítica se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 µg de N-acetilglucosamina por minuto a 50°C.

7.7 Transformación de *N. tabacum*

7.7.1 Construcción del vector de transformación

Para la transformación de tabaco, se utilizó el vector de transformación p2x35SNOS (**figura 15**) en el cual se le clonaron las secuencias génicas *chiA*, *chiB* y *chiC* y *cbp* las cuales se nombraron p2x35ChiA, p2x35ChiB, p2x35ChiC, p2x35CBP (**figura 16**).

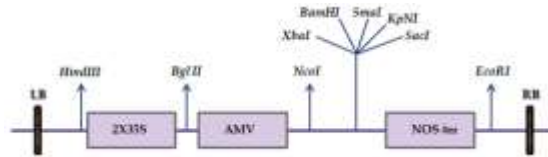


Figura 15. Vector para transformación de plantas p2x35SNOS. Se muestran las regiones regulatorias del vector: (2X35S) promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor; (AMV) secuencia líder del virus de la alfalfa; región del poli-linker y la región (NOS) terminador.

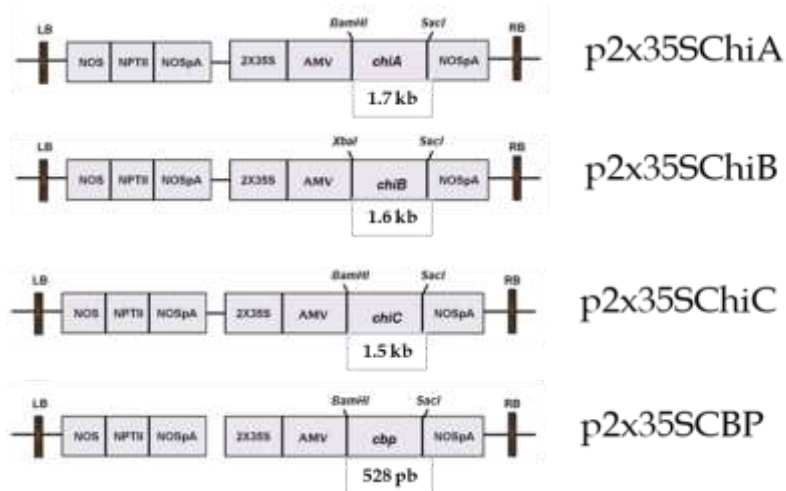


Figura 16. T-DNA del vector para transformación de plantas p2x35SNOS. Se muestran las regiones regulatorias esenciales en el vector: (NOS) promotor de la nopalina sintasa; (*NPTII*) gen de resistencia al antibiótico kanamicina; (NOSpA) señal de poliadenilación de la nopalino sintasa; (2X35S) promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor; (AMV) secuencia líder del virus de la alfalfa; enzimas quitinolíticas de *S. marcescens* (*chiA*, *chiB*, *chiC* y CBP) y sus respectivos tamaños; (RB) borde derecho y (LB) borde izquierdo.

7.7.2 Transformación de explantes de *N. tabacum*

Previo a la transformación de tabaco, se confirmó la inserción de cada una de las secuencias génicas que codifican para las quitinasas de *S. marcescens* Bar86 en el vector de transformación p2X35ChiA, p2X35ChiB, p2X35ChiC y p2X35SCBP por patrón de restricción con las respectivas enzimas de restricción (**figura 16**) y se analizaron en geles de agarosa a 1%.

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 se llevó a cabo por electroporación con cada una de las construcciones antes mencionadas.

Las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas con las diferentes construcciones, fueron crecidas en medio líquido por 24h previo a la infección de los discos de hoja de tabaco (discos de aproximadamente 7 mm).

El método de transformación para la generación de plantas transgénicas de tabaco consiste en las siguientes etapas:

I) Infección de los explantes de hoja (discos) de tabaco con *Agrobacterium* (co-cultivo).

II) Selección de células infectadas. Este proceso se mantiene durante la generación de plantas transgénicas, consistiendo en colocar los tejidos infectados en medio selectivo (antibiótico), adición de hormonas y vitaminas. Estos compuestos ayudan a la inducción, el crecimiento y multiplicación de células únicamente transformadas, dando lugar a la producción de callos y brotes.

III) Los tejidos infectados se cambian a un medio donde se elimina el *Agrobacterium* utilizando antibióticos como cefotaxima que no afectan el crecimiento de la planta, ayudando a la selección de brotes.

IV) Una vez que hay brotes bien definidos se transfieren a un medio de enraizamiento con kanamicina como agente de selección.

V) Las plantas regeneradas enraizadas, fueron transferidas hasta la formación de semillas, para determinar la segregación del transgen.

7.8 Análisis molecular de las plantas transformadas

7.8.1 PCR (DNA)

Se extrajo ADN de hojas de las plantas regeneradas posterior a la transformación para realizarles un PCR y corroborar la presencia del transgen de interés (genes de las enzimas quitinolíticas de *S. marcescens*), así como la presencia del gen de resistencia al antibiótico de kanamicina (*nptII*).

7.8.2 RT- PCR (RNA-cDNA)

Para evaluar los niveles de expresión del transgen en las diferentes líneas transformadas de *N. tabacum*, se realizó la extracción de RNA total de hoja, mediante el reactivo TRIZOL (Invitrogen). Se trataron con DNAsal un total de 2 µg de RNA total para llevar a cabo la síntesis de cDNA y mediante RT-PCR semi cuantitativo se determinó la expresión de los transgenes.

7.9 Producción del anticuerpo de reconocimiento a la quitinasa ChiC de *S. marcescens* Bar86

La producción del anticuerpo anti-ChiC, se llevó a cabo por el proceso la inmunización a dos conejos de raza New Zealand con el número de control #250 y 251 del Bioterio del IBT-UNAM. Se realizó la aplicación de concentraciones crecientes de la quitinasa C purificada obtenida previamente.

Este procedimiento se realizó en colaboración con el Dr. Gerardo Corzo Burguete del IB-UNAM, quien amablemente proporcionó el esquema de inmunización con duración de 10 semanas. Se utilizaron tres diferentes adyuvantes intercalando su aplicación (Anexo B). El anticuerpo obtenido fue empleado en la detección de la quitinasa en extractos totales de proteína

8. Determinación de la actividad quitinolítica en plantas transgénicas

Haciendo uso del método colorimétrico DNSA, Ácido 3-5 Dinitrosalicílico (Mohammed et al., 2011) se cosecharon hojas de 5 semanas de crecimiento de las líneas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el transgen *chiC* de *S. marcescens* Bar86, así como de plantas no transformadas. A las cuales se les extrajo proteína soluble macerando el tejido en un buffer de acetato de sodio 20 mM, pH 4.6 (Ziaei et al., 2015). La mezcla de reacción consiste en 0.5 ml de quitina coloidal al 1.5% (pH 7) y 0.5 ml de sobrenadante total de proteína (200 µg/ml). La reacción se incubó a 50°C por 1h y la reacción se detuvo en agua hirviendo por 10 min, posteriormente se centrifugó 3000 rpm por 5 minutos. A continuación, se tomaron 0.5 mL del sobrenadante en un tubo y se agregaron 0.5 mL del reactivo DNSA (ácido 3-5 Dinitrosalicílico) mezclando cuidadosamente. El tubo se dejó en incubación a 100°C por 10 min, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se realizó la medición correspondiente con la ayuda de un espectrofotómetro a una densidad óptica de 540 nm.

Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva estándar de N-acetilglucosamina, donde una unidad de actividad quitinolítica se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 µg de N-acetilglucosamina por minuto a 50°C.

8.1 Pruebas de tolerancia a estrés biótico en plantas transgénicas

8.1.1 Infección con hongo fitopatógeno *B. cinerea*

8.1.1.1 Análisis de infección con micelio

Hojas jóvenes y saludables de 4 semanas de edad crecidas sobre medio MS fueron cortadas y retadas contra el patógeno fúngico *B. cinerea*. El hongo se creció en placas de agar papa dextrosa (PDA). Cuando el micelio alcanzó la orilla de la placa, discos de agar fueron cortados y colocados sobre la parte adaxial de las hojas que fueron colocadas sobre papel filtro húmedo e incubadas en condiciones de oscuridad por las primeras 24h. Posteriormente colocadas en condiciones de 8/16h luz-oscuridad a 30°C. El análisis de la infección se analizó a los 5 días posteriores a la infección haciendo uso del software ImageJ- (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para calcular el porcentaje de infección de cada una de las líneas transgénicas y plantas control.

8.1.1.2 Ensayos de inhibición fúngica con extracto de proteína total de plantas transgénicas de tabaco

Se adaptó un ensayo de inhibición (Ludwig et al., 1990) para determinar cuantitativamente el efecto antifúngico de las proteínas totales presentes en los extractos de hoja de tabaco transgénico sobre la germinación y crecimiento de las esporas de *B. cinerea*. Los ensayos se realizaron en tubos eppendorf en un volumen final de 1 ml. Las muestras se constituyeron por 500 μ l de proteína cruda (5mg/ml) y 500 μ l de esporas de *Botrytis* suspendidas en caldo de dextrosa de patata 8 (4×10^4 esporas por ml). Como control de fondo, se añadieron 500 μ l del buffer de citrato de sodio 25 mM (pH 5,0) y 500 μ l de esporas suspendidas en caldo de dextrosa de patata. Los tubos se incubaron en 25°C durante 48h. Las muestras fueron medidas a una absorbancia de 595 nm (A) cada 24h con el Espectrofotómetro Jenway (6405 UV/Vis), a partir de las 0 h. Se utilizaron los valores de tiempo cero para normalizar los valores de 24 y 48h. Estos valores se denominaron valores A_{595} corregidos. El porcentaje de inhibición del crecimiento se define como $100 \times$ la relación de absorbancia corregida a A_{595} de la planta de control menos la absorbancia corregida de la muestra problema sobre la A_{595} corregida de la planta de control. Después de 48h de incubación, se analizaron microscópicamente 10 μ l de cada muestra para determinar el estado de las hifas de *B. cinerea*.

8.2 Bioensayos con larvas

8.2.1 Bioensayo de toxicidad con larvas de *D. magnifactella*

Las plantas transgénicas que sobre expresan la quitinasa C (ChiC), fueron analizadas para determinar la resistencia de larvas de *D. magnifactella* al alimentarse con las mismas. La prueba se realizó individualmente con larvas neonatas en cajas Petri de 5 x 1.5 cm. Cada larva fue colocada individualmente sobre una hoja separada de cada línea transgénica con un total de 10 larvas. La mortalidad se anotó diariamente por 7 días. Se mantuvieron a una temperatura de 25 °C con un fotoperiodo de 12h luz, 12h oscuridad. Los tratamientos control fueron plantas no transformadas y dieta merídica. Los bioensayos se repitieron tres veces.

8.2.2 Bioensayo de toxicidad con larvas de *S. frugiperda*

Los ensayos de resistencia contra larvas de *S. frugiperda* se realizaron con plantas transgénicas sobreexpresantes de la quitinasa C (ChiC). En este método, las hojas de las líneas transgénicas y control fueron cortadas y colocadas en papel húmedo en una placa de Petri de 5 x 1.5 cm. Las larvas neonatas se colocaron individualmente en placas durante 7 días a 25 °C y bajo un régimen de 12h luz, 12h oscuridad. Los bioensayos se repitieron tres veces utilizando 10 larvas para cada tratamiento. La mortalidad se anotó diariamente.

8.3 Pruebas de estrés abiótico en plantas transgénicas de tabaco

8.3.1 Pruebas de tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV)

El análisis del daño causado por MV se realizó con discos de hoja de tres líneas homocigas crecidas en invernadero por 6 semanas. Los discos fueron colocados en placas de ELISA de 6 pozos que contenían 0, 3 y 6 μM de MV y posteriormente se incubaron a 25°C por 72h bajo luz continua. El efecto del MV fue analizado monitoreando los cambios fenotípicos y documentándolos fotográficamente.

8.3.2 Tolerancia a estrés por salinidad

Salinidad. Se analizaron plantas transgénicas de las líneas 3.1, 5.5 y 12.4 que sobre expresan la quitinasa ChiC de *S. marcescens*, así como plantas silvestres de tabaco de 5 semanas de edad, las cuales serán regadas con una solución salina de 250 mM de cloruro de sodio (NaCl). El ensayo se realizó en condiciones de invernadero en donde las plantas se mantuvieron inundadas por 2 semanas y al término de este periodo se les realizó la medición de dos parámetros:

8.3.3 Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía y salinidad

Para la evaluación de la germinación, las diferentes líneas transgénicas fueron colocadas en medio MS suplementado con 150 mM de Cloruro de Sodio (NaCl) para el estrés salino y para el estrés osmótico se utilizó sorbitol 300 mM. Las semillas fueron incubadas a 22°C con foto periodo de 16h luz/8h oscuridad se monitorearon a partir del segundo día, evaluando el porcentaje de germinación a partir de la emergencia de la radícula.

Contenido de malondialdeido (MDA). Para la determinación del daño oxidativo celular causado por el estrés osmótico, se llevó a cabo la medición de MDA con una solución de TCA-TBA-HCl: ácido tricloroacético (TCA) 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.37% y HCl 0.25M. Se maceró 0.1 g de tejido foliar al que se le añadió 1 ml del reactivo de TCA-TBA-HCl. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 90°C. Pasado este período, los tubos se colocaron en hielo para enfriarlos y luego se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos. La medición se realizó a 535 y 600 nm.

Contenido de clorofila. Discos de hoja fueron cortados y colectados para analizar el contenido de clorofila. Los discos de 0.8 cm se maceraron en tubos de 1.5 mL con metanol frío. Fueron centrifugados a 4,500 rpm por 5 min. La absorbancia se midió a 665.2 y 652 nm.

8.4 Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tabaco

8.4.1 Biomasa

Se evaluó la cantidad total de materia viva (biomasa). Este análisis consiste en medir el peso fresco (FW) de cada individuo de las líneas transgénicas 3.1, 5.5 y 12.4 de 5 semanas de edad, así como de un control silvestre (wt). Estas se encontraban bajo condiciones de crecimiento óptimo en invernadero. A cada individuo se le retiró el exceso de sustrato adherido a la raíz con sumo cuidado

de mantener la mayor cantidad de las mismas y analizar si había alguna diferencia entre las diferentes líneas. Posterior a esto cada individuo fue pesado. Finalmente se secaron en un horno a 80°C hasta que alcanzaron un peso constante. El peso fresco y peso seco fueron graficados y se les realizó un análisis estadístico.

8.4.2 Producción de semillas

Para este análisis se cortaron cápsulas maduras de cada una de las líneas transgénicas para analizar el número de semillas presentes durante la etapa de reproducción, así como su morfología y compararlas con la línea silvestre. Se tomaron de cada línea 3 plantas y se analizaron 10 capsulas de cada una de éstas. El peso de las capsulas fue graficado y se les realizó un análisis estadístico.

9. RESULTADOS

9.1 Identificación molecular de las cepas bacterianas

9.1.1 Clonación e identificación de los genes quitinolíticos de *S. marcescens*

Los genes *chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp* de *S. marcescens* Bar86 fueron amplificados por PCR con oligos específicos (Tabla 5). En este proceso de amplificación, se adicionó a cada una de las secuencias génicas de los sitios únicos de restricción (Tabla 5, figura 16). Los productos de PCR obtenidos fueron clonados el vector de clonación pTZ57R/T y posteriormente fueron transformadas en *E. coli* DH5 α (figura 17).



Figura 17. Amplificación por PCR de los genes *chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp* a partir de DNA genómico de *S. marcescens* Bar86.

Las clonas que se obtuvieron del proceso de transformación se analizaron por patrón de restricción con el fin de localizar la clona que contuviera cada uno de los genes. En la figura 18 se muestran las digestiones de las clonas que fueron transformadas con cada una de las construcciones pTZChiA, pTZChiB, pTZChiC, pTZcbp, las cuales presentan el tamaño reportado de cada uno de los genes *chiA* (1.7 Kb), *chiB* (1.6 Kb), *chiC* (1.5Kb) y *cbp* (528 pb).

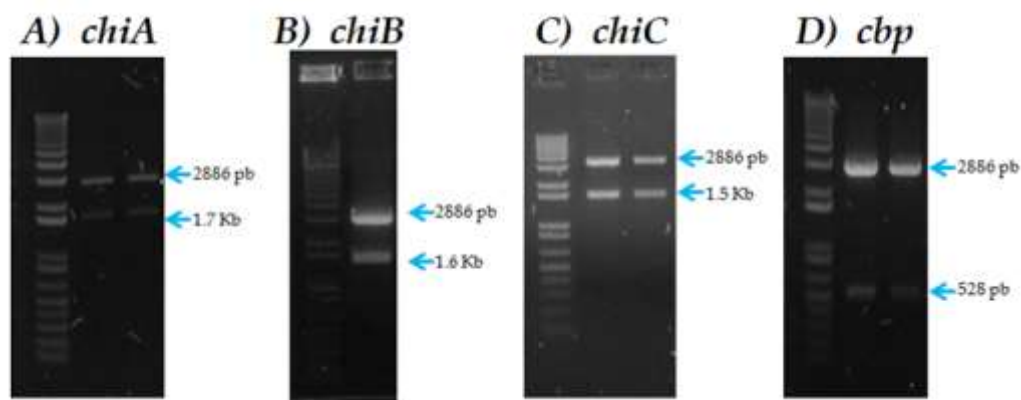


Figura 18. Análisis de restricción del plásmido de clonación pTZ57/RT **A)** Plásmido pTZ57/RT (2886 pb) con presencia del inserto *ChiA* (1.7 Kb). Enzimas empleadas *BamHI-SacI*. **B)** Plásmido pTZ57/RT (2886 pb) con presencia del inserto *ChiB* (1.6 Kb). Enzimas empleadas *XbaI-SacI*. **C)** Plásmido pTZ57/RT (2886 pb) con presencia del inserto *ChiC* (1.5 Kb). Enzimas empleadas *BamHI-SacI*. **D)** Plásmido pTZ57/RT (2886 pb) con presencia del inserto *cbp* (528 pb). Enzimas empleadas *BamHI-SacI*.

Posterior a la transformación de cada una de las secuencias génicas quitinolíticas *chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp* en el vector pTZ57R/T, los productos génicos fueron purificados con la ayuda del Kit de Purificación de Quiagen® y se enviaron a la Unidad de secuenciación IBT-UNAM (Cuernavaca, Morelos).

9.1.2 Identificación bacteriana y análisis filogenético

La identificación del aislado Bar86 se basó en su secuencia del gen 16S rDNA que mostró una identidad del 99% con otros géneros de *S. marcescens* en la base de datos Genbank (**figura 19**).

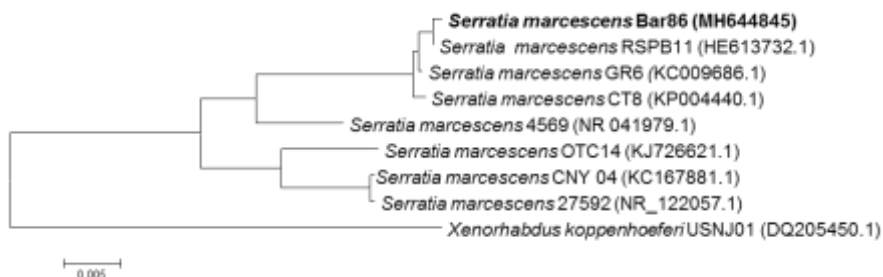


Figura 19. Análisis filogenético. Relación que muestran el 16S rDNA entre el nuevo aislado de *S. marcescens* Bar86 y los aislados de referencia seleccionados provenientes de la base de datos Genbank.

Por otro lado, las secuencias obtenidas de la Unidad de secuenciación IBT-UNAM (Cuernavaca, Morelos) fueron analizadas con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank, revelando una identidad del 99.7% para la secuencia génica del gen *chiA* con “*Serratia marcescens* endo-chitinase (*chiA*) gene”. La secuencia *chiB* con identidad del 99.4% con “*Serratia marcescens* chitinase (*chiB*) gene”. La secuencia *chiC* con 98.5% con la cepa “*Serratia marcescens* chitinase C (*ChiC*)” y la secuencia génica *cbp* del 99.4% con “*Serratia marcescens* gene for CBP21”. La secuencia génica de cada uno de los genes de las quitinasas se muestra en el Anexo A.

Con cada uno de los genes antes mencionados se realizó un análisis de filogenia basado en el método de neighbor-joining en base a su secuencia nucleotídica y comparados con quitinasas del género *Serratia*. El análisis muestra que cada una de las quitinasas (*ChiA*, *ChiC* y *CBP*) se agrupan con el género de *Serratia* depositadas en el GenBank (**figura 20-22**, respectivamente).

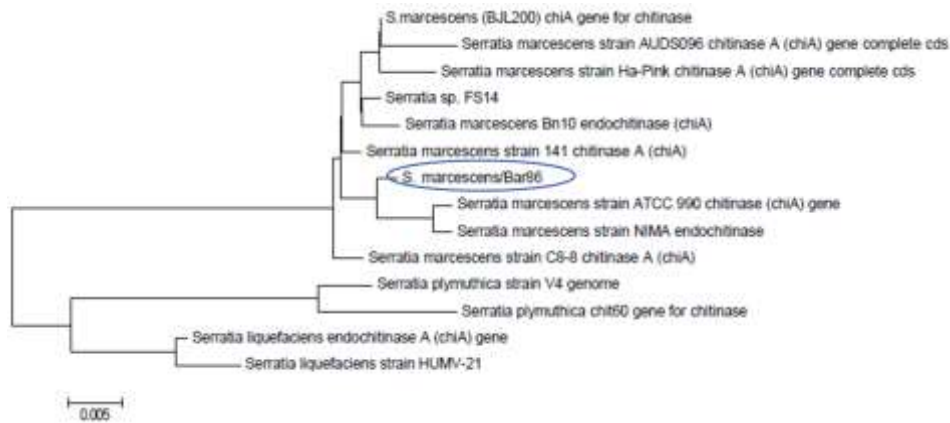


Figura 20. Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de los productos génicos de quitinasas ChiA del género *Serratia*. Marcado en azul el aislado de *S. marcescens* Bar86 agrupada con otras especies del género *Serratia* depositadas en el GenBank.

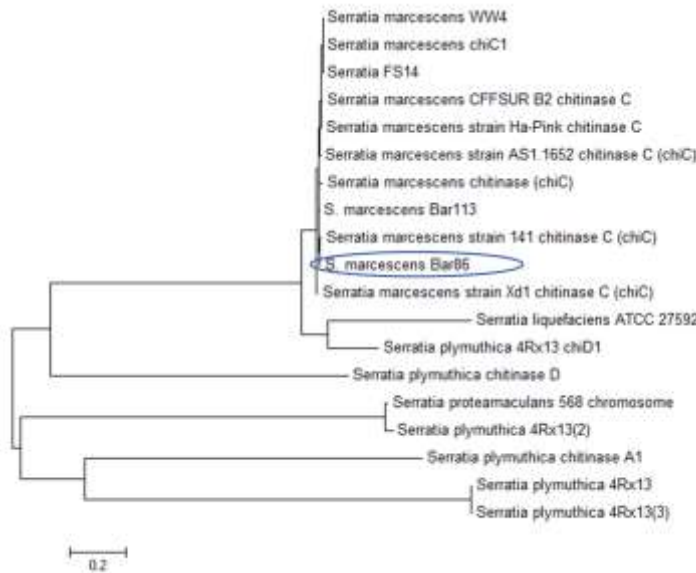


Figura 21. Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de los productos génicos de quitinasas ChiC del género *Serratia*. Marcados en azul el aislado de *S. marcescens* Bar86 agrupada con otras especies del género de *Serratia* depositadas en el GenBank.

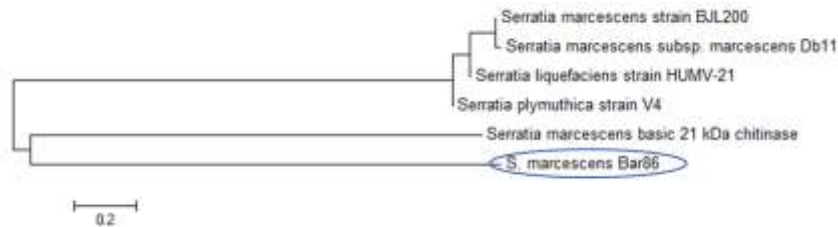


Figura 22. Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de los productos génicos de la proteína de unión a quitina (CBP) del género *Serratia*. Marcados en azul se agrupan los dos aislados de *S. marcescens* Bar86 con otras especies del género *Serratia* depositadas en el GenBank.

Otro análisis filogenético con el gen *ChiC* de *S. marcescens* Bar86 se muestran en la **figura 23**, el cual revela que el gen se agrupa con el grupo de quitinasas bacterianas y tiene una relación estrecha con *S. nematodiphila*; sugiriendo que todas las quitinasas evolucionaron del mismo antepasado y que *S. marcescens* ChiC compartía un origen evolutivo común con las quitinasas de otras bacterias, hongos, insectos y plantas (**figura 23**).

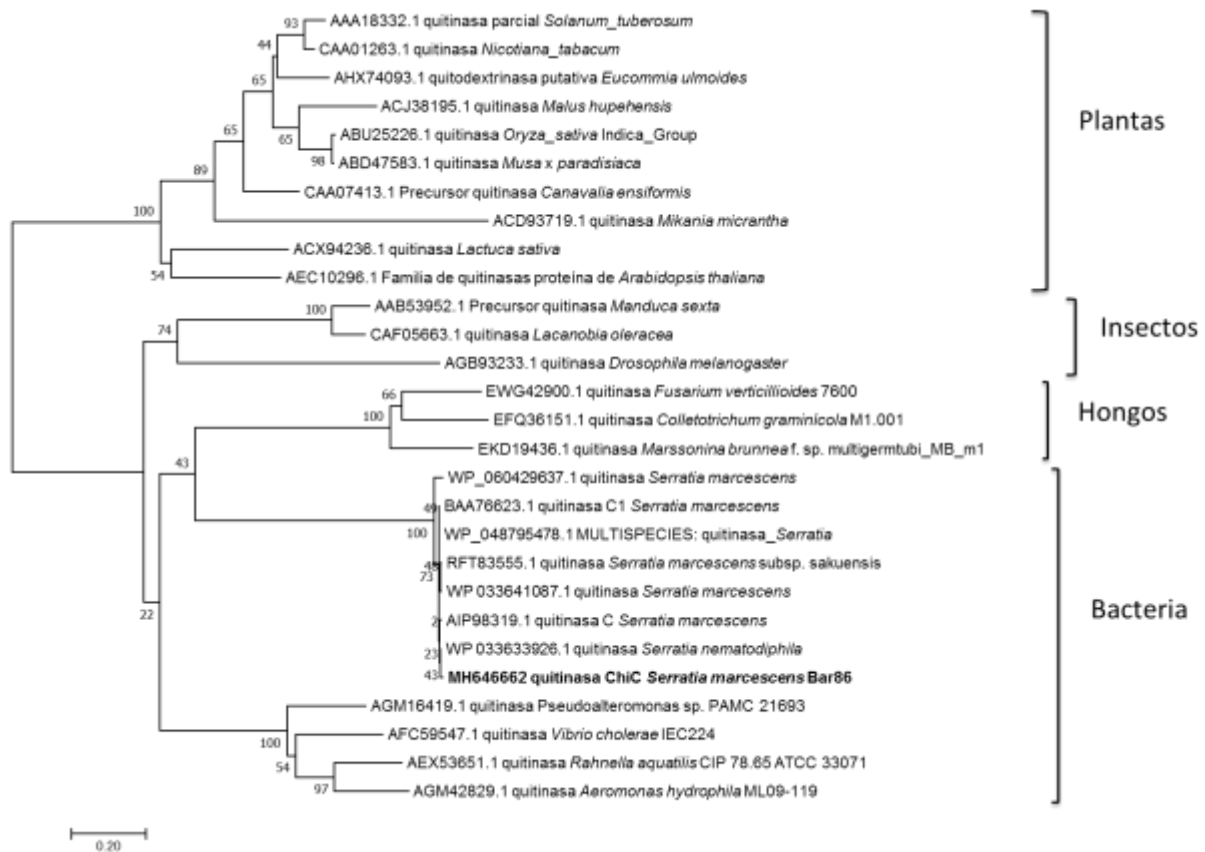


Figure 23. Análisis filogenético. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *chiC* de *S. marcescens* con quitinasas de plantas, insectos, hongos y bacterias.

9.1.3 Determinación cualitativa de la actividad quitinolítica de los aislados *S. marcescens* Bar86 y Bar113 en placa

Cualitativamente se demostró la actividad quitinolítica en placa adicionadas con quitina coloidal de los dos aislados de *S. marcescens* Bar86 y Bar113 en donde ambos mostraron un halo de degradación alrededor de la colonia al cabo de 48h a 30°C (**figura 24**). Como control se utilizó a *E. coli* DH5 α .



Figura 24. Ensayo cualitativo de actividad quitinasa en las cepas de *S. marcescens* Bar86 y Bar113 presentaron actividad quitinolítica. Placa LB agar suplementada con quitina coloidal al 0.2% incubadas durante 48h a 30°C. Se utilizó la cepa DH5α.

9.1.4 Determinación de la actividad quitinolítica de los aislados *S. marcescens* Bar86 y Bar113

Se realizó la medición de la actividad quitinolítica de *S. marcescens* Bar86 y Bar113 por el método colorimétrico del Ácido 3-5 Dinitrosalicílico (Mohammed et al., 2011).

Ambos aislados se cultivaron en dos matraces con LB y LB adicionado con quitina coloidal al 0.1%. Los resultados mostraron que el sobrenadante del cultivo adicionado con 1% de quitina de Bar86 mostró la actividad más alta de 1.2 $\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y el más bajo de 0.7 $\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para Bar113.

Tabla 6. Actividad quitinolítica de los aislados de *S. marcescens* Bar86 y Bar113.

Muestra	$\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
* <i>S. marcescens</i> Bar86	0.7
** <i>S. marcescens</i> Bar86	1.2
* <i>S. marcescens</i> Bar113	0.8
** <i>S. marcescens</i> Bar113	0.7

(*) Medio LB

(**) Medio LB suplementado con quitina coloidal 1%

9.2 Efecto de *S. marcescens* Bar86 sobre el crecimiento de *B. cinerea*

La actividad quitinolítica del aislado bacteriano de *S. marcescens* Bar86 fue estudiado contra el crecimiento micelial de *B. cinerea* en placas de LB por 6 días. Lo que se observó fue una reducción del área crecimiento de *B. cinerea* en un 50% cuando está en contacto con *S. marcescens* el cual mantiene su crecimiento al margen de la bacteria en comparación a lo que sucede con el control de *E. coli*; en la cual a los 6 días el micelio es capaz de crecer sobre la bacteria (**figura 25**).

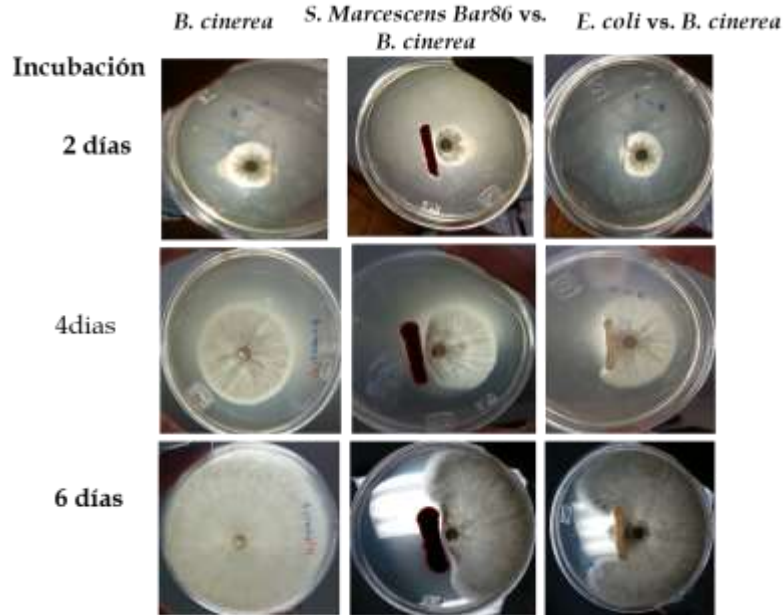


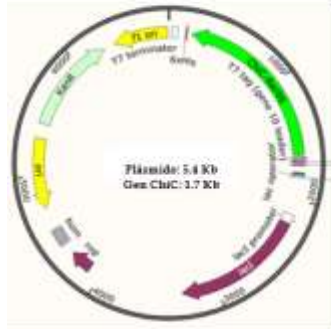
Figura 25. Análisis cualitativo en placas de LB sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* contra *S. marcescens* Bar86. Como control se utilizó a *E. coli*. Los inóculos bacterianos fueron *S. marcescens* Bar 86 y como control *E. coli* crecidas 24h previas al análisis. Discos de PDA (0.5 cm) de *B. cinerea* en fase de crecimiento. Incubadas por 6 días a 30°C.

9.3 Producción de proteína recombinante ChiC de *S. marcescens* Bar86 en *E. coli*

9.3.1 Construcción del vector de expresión

Al tener caracterizadas las secuencias génicas de las quitinasas *ChiA*, *ChiB*, *ChiC* y *cbp*; estas fueron clonadas en el vector de expresión pET28(a)+ para generar las construcciones pETChiA, pETChiB, pETChiC y pETcbp para de esta manera iniciar la caracterización de la actividad quitinolítica de cada una de las enzimas. Se transformaron células de *E. coli* cepa BL21 con el plásmido de expresión (construcciones pETChiA, pETChiB, pETChiC y pETcbp) y se obtuvieron clones a las cuales se les extrajo plásmido para corroborar la presencia del transgen y se corrieron en gel de agarosa al 1%. Se observa que los últimos dos carriles corresponden al peso esperado (**figura 26**).

Construcción pETChiC



Restricción enzimática de las clonas

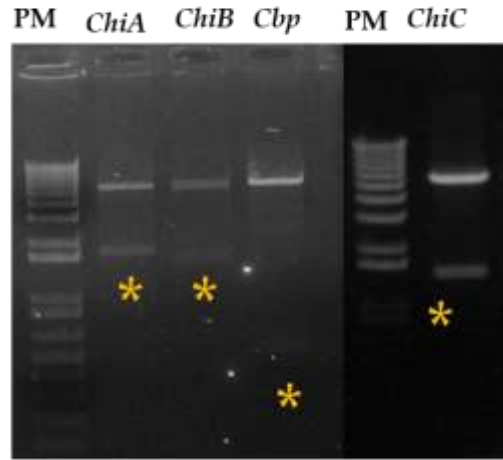


Figura 26. Ensayo de restricción de las construcciones pETChiA, pETChiB, pETChiC Y pETCBP proveniente de células de *E. coli* cepa BL21. Corroboración de la presencia del inserto que se muestra marcado con un asterisco para *ChiA* de 1.7 kb, *ChiB* de 1.6 kb, *ChiC* de 1.5 kb y *cbp* de 528 pb en el vector pET28(a)+ de 5369 pb. De manera representativa del lado izquierdo se presenta el mapa, pETChiC con peso del plásmido de 5.4 Kb y el gen *ChiC* de 1.7 Kb.

9.3.2 Determinación de la actividad quitinolítica de las quitinasas recombinantes de *S. marcescens*

Se realizó la medición de la actividad quitinolítica de cada una de las enzimas quitinolíticas recombinantes a partir células inducidas con IPTG 1 mM las cuales fueron sonicadas y el sobrenadante obtenido fue el que se analizó.

Los resultados mostraron que la quitinasa ChiC tiene la actividad más alta con 0.20 $\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y el más bajo la proteína de unión CBP con 0.060 $\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Tabla 7. Actividad quitinolítica recombinante enzimas quitinasa ChiA, ChiC y CBP de *S. marcescens* Bar86.

Muestra	$\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
pETChiA	0.067
pETChiC	0.20
pETCBP	0.06

9.3.3 Identificación y purificación de la proteína recombinante ChiC

Se realizó un Western blot para corroborar la expresión de la proteína recombinante ChiC, realizando una inducción en el vector pETChiC con 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante toda la noche. La banda obtenida fue de 55 kDa que corresponde a la quitinasa C de *S. marcescens* como se reporta en la literatura (**figura 27**).

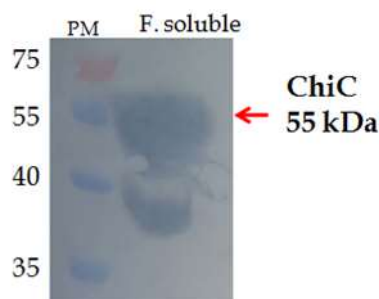


Figura 27. Análisis de Western blot. Quitinasa recombinante ChiC de la cepa *S. marcescens* Bar86 fusionada a un Tag de histidinas (peso molecular final de 55 kDa) expresada en la fracción soluble y expresada en el plásmido pET28a(+). Inducción overnight con IPTG 1mM. Membrana de nitrocelulosa incubada con el anticuerpo monoclonal Anti-His conjugado a fosfatasa alcalina y revelado con BCIP-NBT. Peso molecular (PM) en kilo Daltons.

Seguido a esto, se inició el proceso de purificación a través del uso de una columna Ni-NTA de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen), de las cuales se obtuvieron seis fracciones las cuales se analizaron por SDS-PAGE al 11.5% (**figura 28, A**) y se concentraron las fracciones 3 y 4 en un tubo filtro concentrador de 30 kDa obteniendo 3.4 mg/mL. Posterior a la concentración nuevamente se analizaron las fracciones obtenidas por SDS-PAGE obteniendo nuevamente la banda de 55 kDa que corresponde a la quitinasa C (**figura 28, B**).

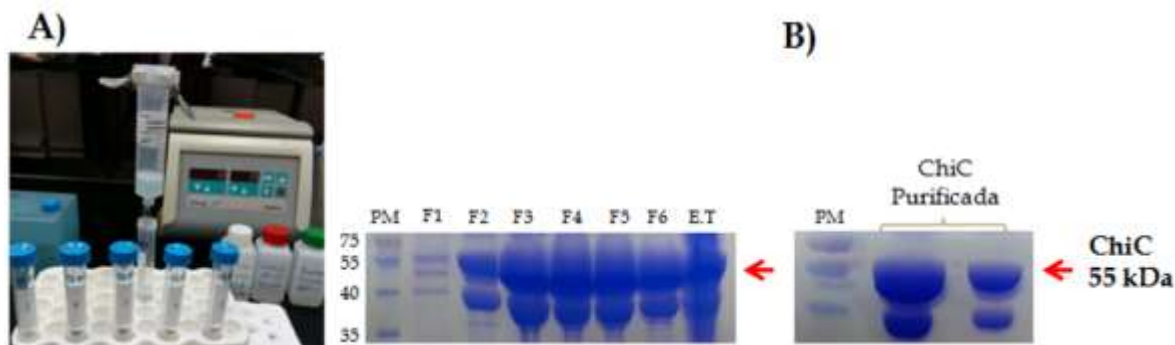


Figura 28. Purificación y análisis de la proteína recombinante pETChiC proveniente de *S. marcescens* Bar86. **A)** Se obtuvieron seis fracciones (F1-6) de la fracción soluble del pETChiC; a partir de un cultivo de 1L inducido con IPTG 1 mM. Se analizó el extracto total (E.T) del cultivo. Peso molecular en kilo Daltons. **B)** Proteína concentrada de las fracciones 2 y 3 con una banda de 55 kDa correspondiente a la quitinasa ChiC.

9.3.4 Actividad enzimática en placa de la proteína recombinante ChiC

Posterior a la purificación de la proteína recombinante ChiC por columna de Níquel y análisis de las fracciones obtenidas por SDS-PAGE al 11.5%, se llevó a cabo un estudio de tipo cualitativo en placas de LB adicionadas con quitina coloidal al 1%. Lo que se pudo observar fue que aproximadamente a las 48h se observó un halo alrededor de los sitios dónde se colocó una gota (10 μ l) de la proteína recombinante con concentraciones de 0.03, 10, 200 y 680 μ g/ μ l (**figura 29**). La formación de los halos fue similar a lo que sucede en el crecimiento de la bacteria *S. marcescens* Bar86 (**figura 24**).

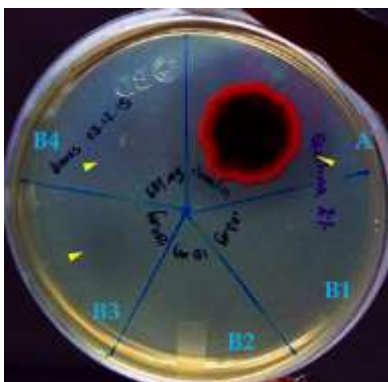


Figura 29. Actividad de proteína recombinante ChiC en placas de agar Lb adicionadas con quitina coloidal al 1%. **A.** Cultivo de la bacteria *S. marcescens* Bar86. **B1 a B4.** Cuatro concentraciones diferentes de quitinasa recombinante de 0.03, 10, 200 y 680 μ g.

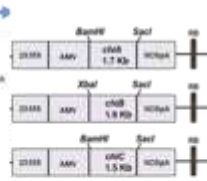
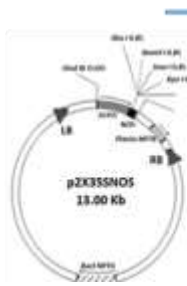
9.4 Transformación de *N. tabacum*

9.4.1 Construcción del vector de transformación

Como paso previo a la transformación de plantas de *Nicotiana tabacum*, se clonaron cada una de las secuencias génicas (*ChiA*, *ChiB*, *ChiC* y *CBP*) en el vector de transformación p2x35SNOS y generar las construcciones p2x35SChiA, p2x35SChiB, p2x35SChiC y p2x35SCBP en la cepa de *E. coli* DH5 α y se corroboró la presencia del gen de interés por análisis de restricción enzimática (no se muestra).

Posteriormente para la transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* las construcciones obtenidas previamente (p2x35SChiA, p2x35SChiB, p2x35SChiC y p2x35SCBP) fueron movilizadas por electroporación en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y se inició la transformación de plantas. Se corroboró la presencia del plásmido y de cada una de las secuencias quitinolíticas realizando restricción enzimática con las enzimas correspondientes. En la **figura 30** se muestran los fragmentos esperados, para p2x35SChiA de 13 kb que corresponde al plásmido y el segundo de 1.7 kb, para p2x35SChiB de 13 kb que corresponde al plásmido y el segundo de 1.6 kb que corresponde a ChiB y por último p2x35SChiC con 13 kb que corresponde al plásmido y el segundo de 1.5 kb que corresponde a ChiA, para el caso de p2x35SCBP se realizó la amplificación del gen por PCR ya que fue difícil observar por restricción la liberación del fragmento.

Mapa del plásmido p2x35SNOS



Restricción enzimática de las clonas de *A. tumefaciens* transformadas

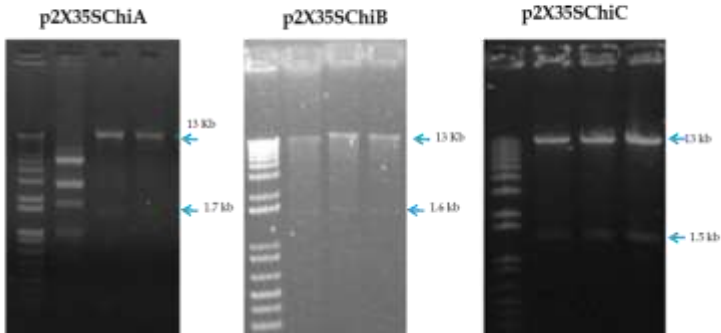


Figura 30. Digestión de las clonas obtenidas del proceso de electroporación de células de *A. tumefaciens* LBA4404. Del lado derecho se muestra la restricción de las construcciones p2x35SChiA, p2x35SChiB y p2x35SChiC para la transformación de discos de hoja de *N. tabacum* con la liberación de cada uno de los fragmentos y tamaños esperados. Del lado izquierdo una representación del mapa de transformación de los cuales se les realizó el análisis de restricción.

9.4.2 Transformación de explantes de *N. tabacum*

La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 que contienen cada una de las construcciones p2x35/ChiA, p2x35/ChiB, p2x35/ChiC y p2x35/CBP fue usada para la infección de los explantes de hoja de tabaco (discos de 7 mm) para generar las 4 distintas líneas de plantas transgénicas que expresan cada una de las quitinasas bacterianas (**figura 31**).

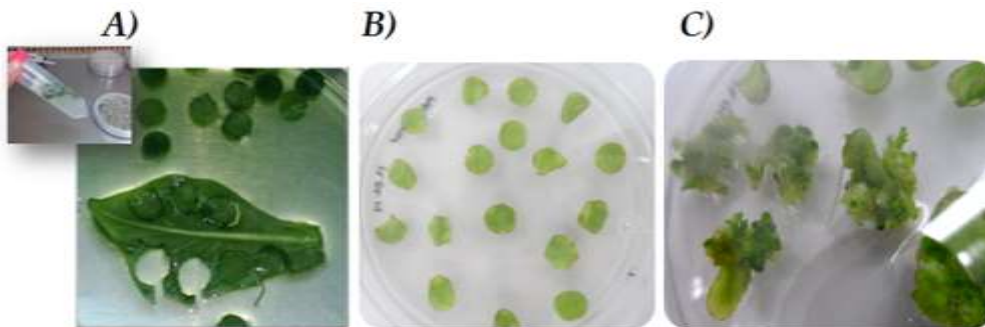


Figura 31. Aspectos generales de la transformación genética en discos de hoja de *N. tabacum*. **A)** Infección y co cultivo de hojas de plantas de *N. tabacum* con *A. tumefaciens* LBA4404 que contiene las 4 distintas construcciones p2x35/ChiA, p2x35/ChiB, p2x35/ChiC y p2x35/CBP **B)** y **C)** Regeneración y selección de plantas transgénicas con el antibiótico kanamicina a 100 mg/L.

9.4.3 Análisis molecular de las plantas transformadas

9.4.3.1 PCR (DNA)

Se extrajo ADN de hojas de las plantas transformadas para realizar un PCR y corroborar la presencia del transgen de interés (batería quitinolítica de *S. marcescens* Bar86) en cada una de las líneas transformadas p2x35/ChiA, p2x35/ChiB, p2x35/ChiC y p2x35/CBP; así como la presencia del gen de resistencia a antibiótico (NPTII) (**figura 32-35**, respectivamente).

Líneas transgénicas de tabaco transformadas con el gen que codifica para la quitinasa A (*ChiA*) de *S. marcescens* Bar86 (**figura 32**).

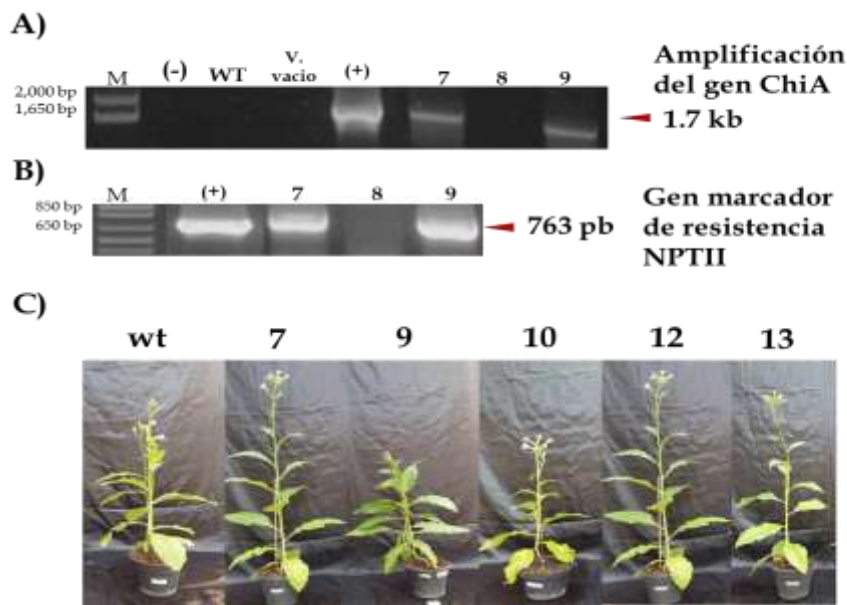


Figura 32. Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de *N. tabacum* transformadas con el gen *chiA* de *S. marcescens* Bar86. **A)** Carril (-): H₂O como control de contaminación de la mezcla de reacción para la amplificación. Carril (+), vector 2x35ChiA con el cual se transformaron las plantas portador del gen de interés (*chiA*). Carril WT, amplificación de DNA de planta silvestre. Carril V. Vacío, plantas transformadas con vector de transformación vacío. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *chiA* en plantas transformadas de *N. tabacum*. **B)** Amplificación del gen *NPTII* de resistencia a kanamicina en plantas transformadas de *N. tabacum*. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el gen marcador de resistencia a kanamicina (*NPTII*). Carril (+): vector 2x35ChiA con el cual se transformaron las plantas portador del gen de resistencia a kanamicina. **C)** Aspecto fenotípico de las plantas transgénicas de tabaco.

Líneas transgénicas de tabaco transformadas con el gen que codifica para la quitinasa B (*ChiB*) de *S. marcescens* Bar86 (figura 33)

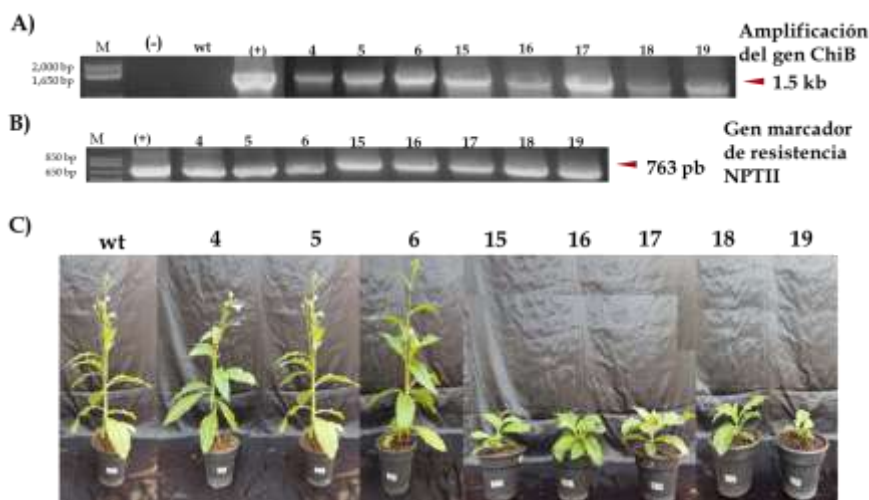


Figura 33. Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de *N. tabacum* transformadas con el gen *chiB* de *S. marcescens* Bar86. **A)** Carril (-): Planta silvestre como control. Carril (+), vector 2x35ChiB con el cual se transformaron las plantas portador del gen de interés (*chiB*). Carril WT, amplificación de DNA de planta silvestre. Carril V. Vacío, plantas transformadas con vector de transformación vacío. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *chiB* en plantas transformadas de *N. tabacum*. **B)** Amplificación del gen *NPTII* de resistencia a kanamicina en plantas transformadas de *N. tabacum*. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el gen marcador de resistencia a kanamicina (*NPTII*). Carril (+): vector 2x35ChiB con el cual se transformaron las plantas portador del gen de resistencia a kanamicina. **C)** Aspecto fenotípico de las plantas transgénicas de tabaco transformadas.

Líneas transgénicas de tabaco transformadas con el gen que codifica para la quitinasa C (*ChiC*) de *S. marcescens* Bar86 (figura 34).

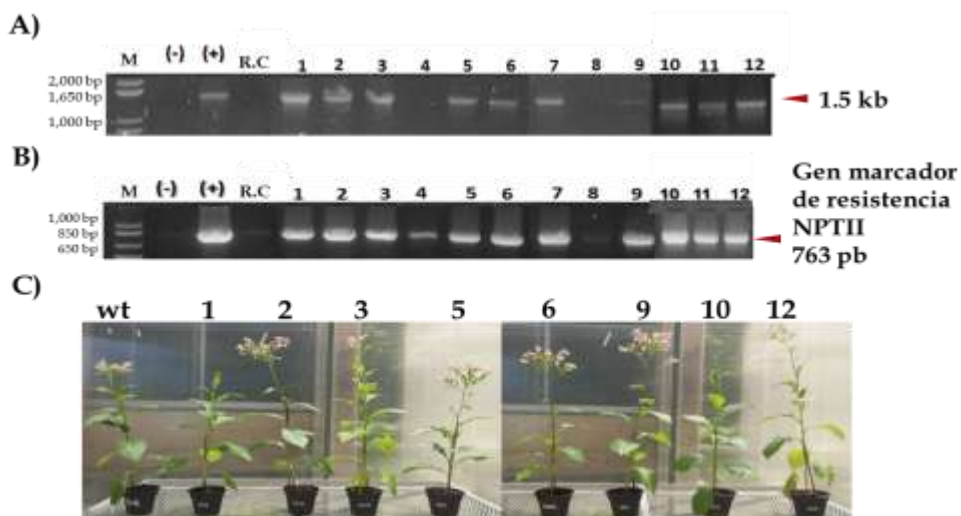


Figura 34. Análisis molecular mediante PCR en plantas transgénicas de *N. tabacum* transformadas con el gen *chiC* de *S. marcescens* Bar86. **A)** Carril (-): H₂O como control de contaminación de la mezcla de reacción para la amplificación. Carril (+), vector 2x35CBP con el cual se transformaron las plantas portador del gen de

interés (*chiC*). Carril WT, amplificación de DNA de planta silvestre. Carril V. Vacío, plantas transformadas con vector de transformación vacío. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *chiC* en plantas transformadas de *N. tabacum*. **B)** Amplificación del gen *NPTII* de resistencia a kanamicina en plantas transformadas de *N. tabacum*. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el gen marcador de resistencia a kanamicina (*NPTII*). Carril (+): vector 2x35ChiC con el cual se transformaron las plantas portador del gen de resistencia a kanamicina. **C)** Plantas transgénicas de tabaco transformadas con el gen que codifica para la enzima quitinolítica ChiC de *S. marcescens* Bar86.

Líneas transgénicas de tabaco transformadas con el gen que codifica para la quitinasa CBP (*CBP*) de *S. marcescens* Bar86 (**figura 35**).

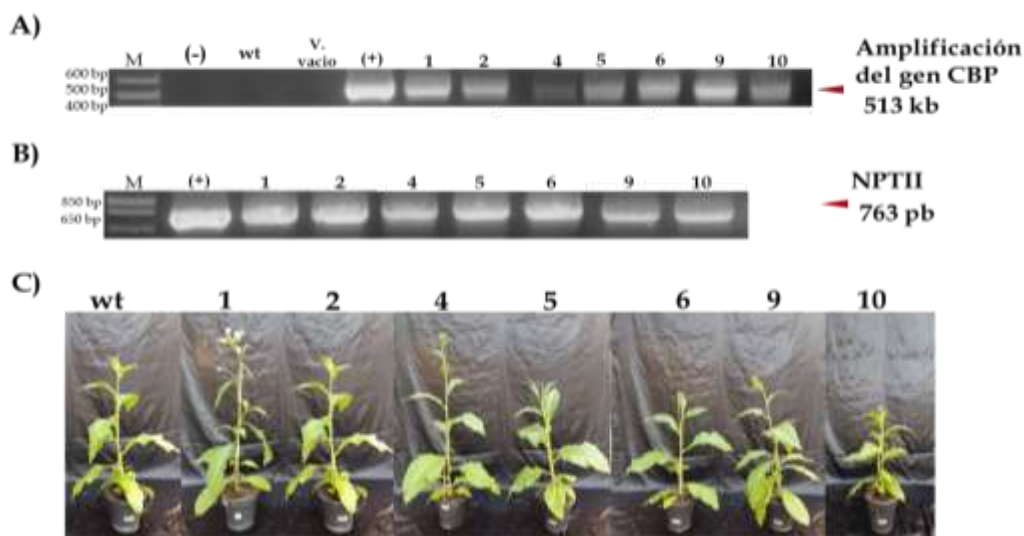


Figura 35. Plantas transgénicas de *N. tabacum*. Amplificación de DNA de las líneas de plantas transformadas con el gen *cbp* de *S. marcescens* Bar86. **A)** Carril (-): H₂O como control de contaminación de la mezcla de reacción para la amplificación. Carril (+), vector 2x35/CBP con el cual se transformaron las plantas portador del gen de interés (*cbp*). Carril WT, amplificación de DNA de planta silvestre. Carril V. Vacío, plantas transformadas con vector de transformación vacío. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *chiC* en plantas transformadas de *N. tabacum*. **B)** Amplificación del gen *NPTII* de resistencia a kanamicina en plantas transformadas de *N. tabacum*. Carriles 1-10, productos de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el gen marcador de resistencia a kanamicina (*NPTII*). Carril (+): vector 2x35CBP con el cual se transformaron las plantas portador del gen de resistencia a kanamicina. **C)** Plantas transgénicas de tabaco transformadas con el gen que codifica para la proteína de unión a quitina *cbp* de *S. marcescens*.

9.4.3.2 RT-PCR (RNA-cDNA)

Para confirmar la expresión del transgen a nivel de RNAm se llevó a cabo la amplificación por la técnica de RT-PCR. Se realizó la extracción total de RNA de hojas de las plantas de tabaco homocigas transformadas con la quitinasa ChiC. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de RNA total previo a un tratamiento con DNasa y se amplificó con los oligonucleótidos ChiC-F y ChiC-R.

Se seleccionaron 3 líneas homocigas: 3.1, 5.5 y 12.4; las cuales muestran la integración y expresión del transgen *chiC* con diferentes niveles de expresión (**figura 36**).

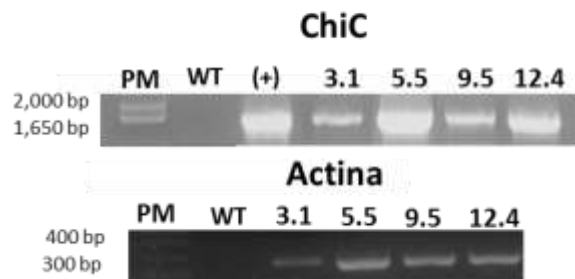


Figura 36. Análisis por RT-PCR de plantas homózigas transformadas con *chiC* y una línea control ET no transformada. Para confirmar la integración y expresión del transgen se realizó la extracción de RNA total de hojas y se amplificó con los oligonucleótidos específicos ChiC-F y ChiC-R. El gen de actina fue amplificado como control de expresión.

9.5 Producción del anticuerpo de reconocimiento a la quitinasa ChiC de *S. marcescens* Bar86

La inmunización del conejo se realizó en el Instituto de Biotecnología (IBt-UNAM). El anticuerpo policlonal anti-ChiC fue empleado en la detección de la quitinasa ChiC en extractos crudos de las plantas transgénicas.

9.5.1 Detección de la quitinasa ChiC en extractos de plantas

Haciendo uso del anticuerpo anti ChiC generado, se procedió a detectar la proteína ChiC de extractos crudos de tres líneas homózigas de tabaco transformadas con la quitinasa ChiC las líneas fueron 3.1, 5.5 y 12.4; de acuerdo a los niveles de expresión por RT-PCR (**figura 36**). Se tomó como control plantas silvestres (wt) de tabaco.

El análisis se llevó a cabo por Western blot en un gel al 12% con extractos de tejidos de hojas macerados en buffer de acetato de sodio adicionado con 20 mM de NaCl pH 4.6 y resuspendidas en buffer PBS. La proteína se cuantificó por el método de Bradford y se analizaron 20 µg/ml de proteína total. Se obtuvieron bandas de 56 kDa de las líneas 3.1, 5.5 y 12.4 del mismo tamaño que la quitinasa ChiC pura utilizada para la inmunización del conejo. La detección no sucedió con el extracto de la planta wt como era esperado (**figura 37**).

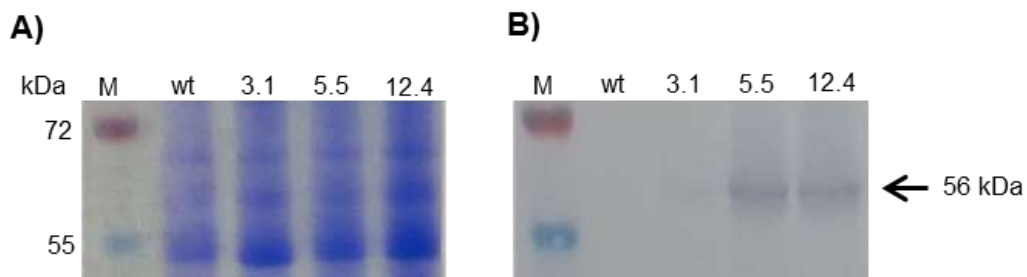


Figura 37. Análisis de expresión de la proteína *chiC* en extractos crudos de plantas de tabaco. **A)** Electroforesis de extractos crudos de proteínas en geles SDS-PAGE de las líneas transgénicas de tabaco 3.1, 5.5 y 12.4 y plantas silvestres (wt, control negativo); M, marcador molecular en kilo Daltons, (kDa). **B)** Ensayo Western blot

de extractos de extractos crudos de hojas que revelan una banda de 56 kDa correspondiente a la endochitinasa ChiC.

9.6 Determinación de la actividad quitinolítica en plantas transgénicas

Para comprobar la actividad quitinolítica de las líneas transformadas 3.1, 5.5 y 12.4 que expresan la quitinasa C (ChiC), así como de plantas control no transformada se llevó a cabo extracción de proteína total de tejido de hoja. A los extractos obtenidos se les midió los azúcares reductores producidos por la hidrólisis de la quitina a través del método colorimétrico DNSA (Ácido 3-5 Dinitrosalicílico). Los resultados se interpolaron en una curva patrón de glucosamina. Los resultados mostraron que la línea 12.4 y 5.5 presentaron la actividad más alta con 47.7 y 44.3 pmol de NAGLc que resultó ser tres veces más que la línea control sin transformar. La línea transgénica 3.1 tuvo una actividad de 28.17 pmol de NAGLc casi dos veces más que línea control sin transformar con 15.7 pmol de NAGLc (**figura 38**).

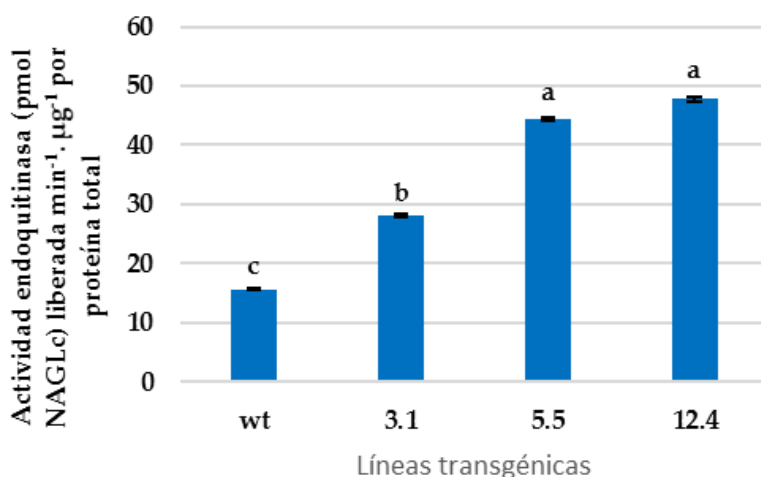


Figura 38. Actividad quitinolítica de extractos de proteína total de líneas transgénicas 3.1, 5.5, 12.4 y una planta no transformada, wt. Las barras de error indican el error estándar. En cada barra se muestran diferentes letras que indican diferencia estadística significativa entre las líneas transgénicas ($P = <0.0001$). Al análisis se repitió cuatro veces.

En un estudio preliminar, se seleccionaron dos líneas homocigas F^2 independientes de plantas transformada con las quitinasas ChiA, ChiB y CBP (**figura 39**) y se compararon con las tres líneas transformadas con la quitinasa ChiC (**figura 38**) y así analizar su actividad quitinolítica. Se observó que la actividad quitinolítica es baja-media con valores promedio de 20 pmol de NAGLc. La línea 1.5 transformada con la quitinasa ChiA, fue la segunda más alta; mostrando dos veces más la actividad quitinasa seguida por las líneas 5.5 y 12.4 transformadas con el gen de la quitinasa *chiC* comparada con la planta control no transformada, wt (**figura 39**).

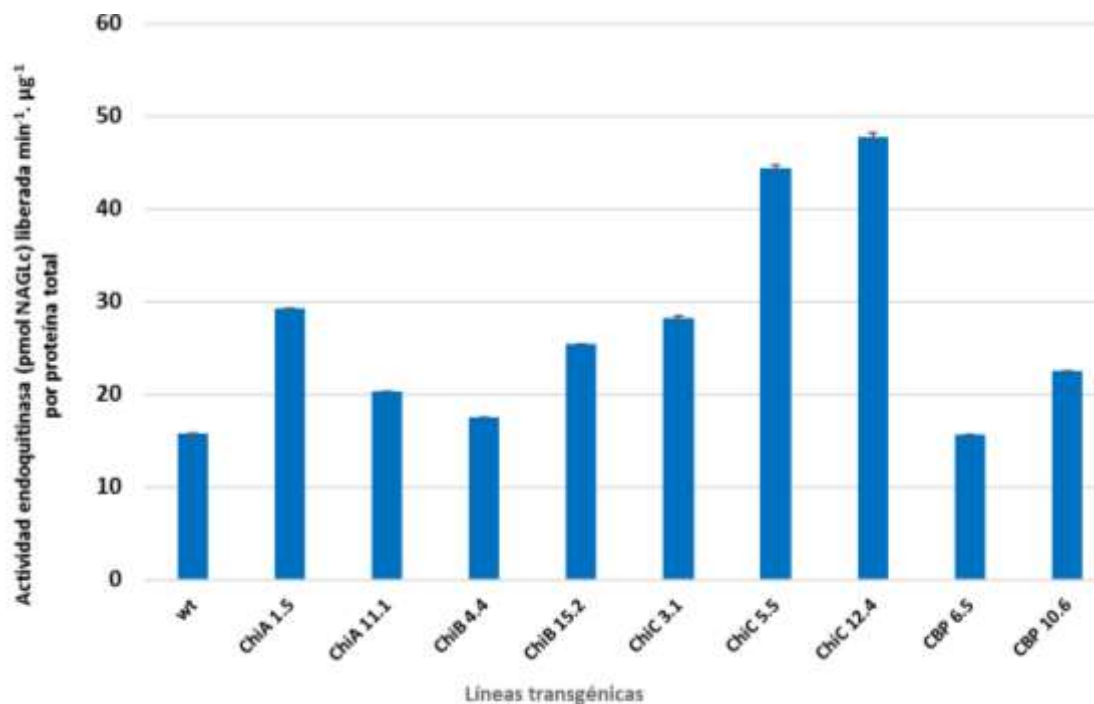


Figura 39. Actividad quitinolítica de extractos de proteína total de plantas transformadas con las quitinasas ChiA, ChiB, ChiC y CBP de *S. marcescens*. Como control una planta no transformada, wt. Las barras de error indican el error estándar.

9.6.1 Pruebas de tolerancia a estrés biótico en plantas transgénicas

9.6.1.1 Análisis de infección con *B. cinerea*

Se cortaron hojas de 5 semanas de edad que provenían de condiciones estériles las cuales fueron inoculadas con un disco de *B. cinerea* en fase de crecimiento. Al quinto día de incubación, los síntomas en las tres líneas transgénicas (3.1, 5.5 y 12.4) consistieron en clorosis leve e hipersensibilidad. En contraste, las hojas de las plantas no transformadas mostraron extensas áreas de necrosis rodeadas de halos cloróticos (**figura 40 A**). Los datos indican que las plantas transgénicas fueron resistentes al ataque de patógenos fúngicos por *B. cinerea* (**figura 40 B**)

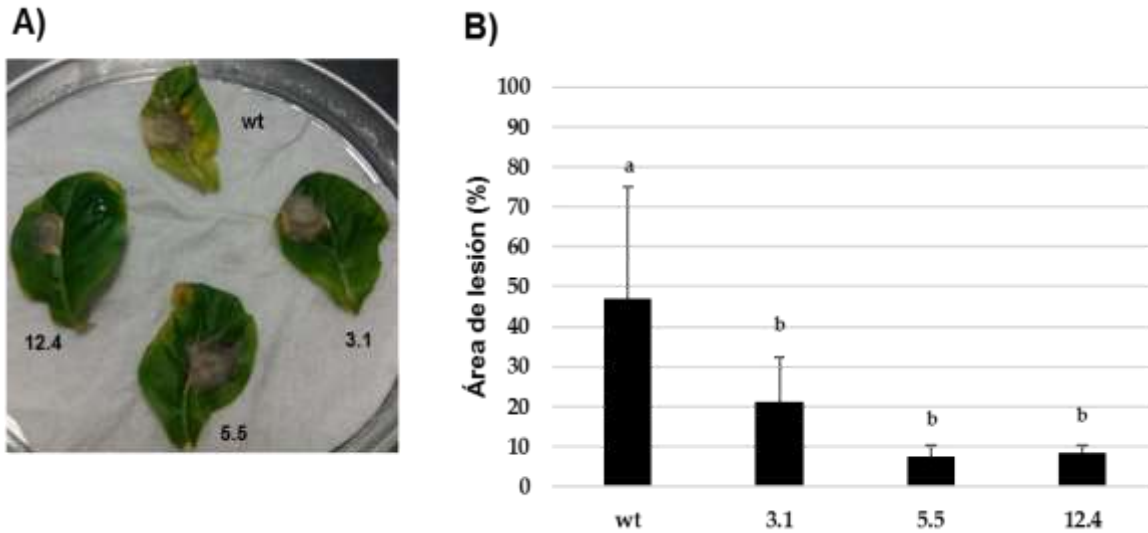


Figura 40. Ensayo de resistencia al hongo fitopatógeno *B. cinerea*. **A)** Fenotipo de las plantas transgénicas después de la inoculación con micelio de *B. cinerea* durante 7 días. **B)** Porcentaje del área de infección en las plantas control y líneas de tabaco transformado. El daño foliar causado por *B. cinerea* fue significativamente diferente comparadas con el control con un valor de $p = < 0.0001$. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas. Las barras de error indican la desviación estándar de las medias. Se realizaron tres réplicas independientes para cada experimento.

9.6.1.2 Ensayos de inhibición fúngica con extractos de proteína total de plantas transgénicas de tabaco

Para establecer cuantitativamente la inhibición fúngica de *B. cinerea* se analizaron extractos crudos foliares de tres líneas transgénicas de tabaco (3.1, 5.5 y 12.4) con expresión constitutiva a la quitinasa ChiC (**figura 41 B**). Los resultados obtenidos muestran que el extracto crudo de la línea 3.1 tras incubarse con esporas de *B. cinerea* presentó un porcentaje de inhibición moderado (52.8%), seguida de las líneas 12.4 (65.1%) y 5.5 (75.4%), **figura 41 A**.

El efecto de los extractos de proteína total sobre el crecimiento de *B. cinerea* se observó microscópicamente después de 48h de incubación. En el caso de la planta control no transformada, el crecimiento de hifas parecía normal, muy ramificadas y daban lugar a una alta biomasa fúngica. El daño estructural y fisiológico a las hifas se observó en el caso de las líneas 12.4 y 5.5, que mostraron mayor inhibición. La línea 3.1 que mostró porcentajes de inhibición medio (52.8%) también se observó una menor formación de biomasa fúngica en comparación con el control (**figura 41 B**). Este mismo efecto se demuestra en el crecimiento de hifas de una única espora (**figura 41 C**).

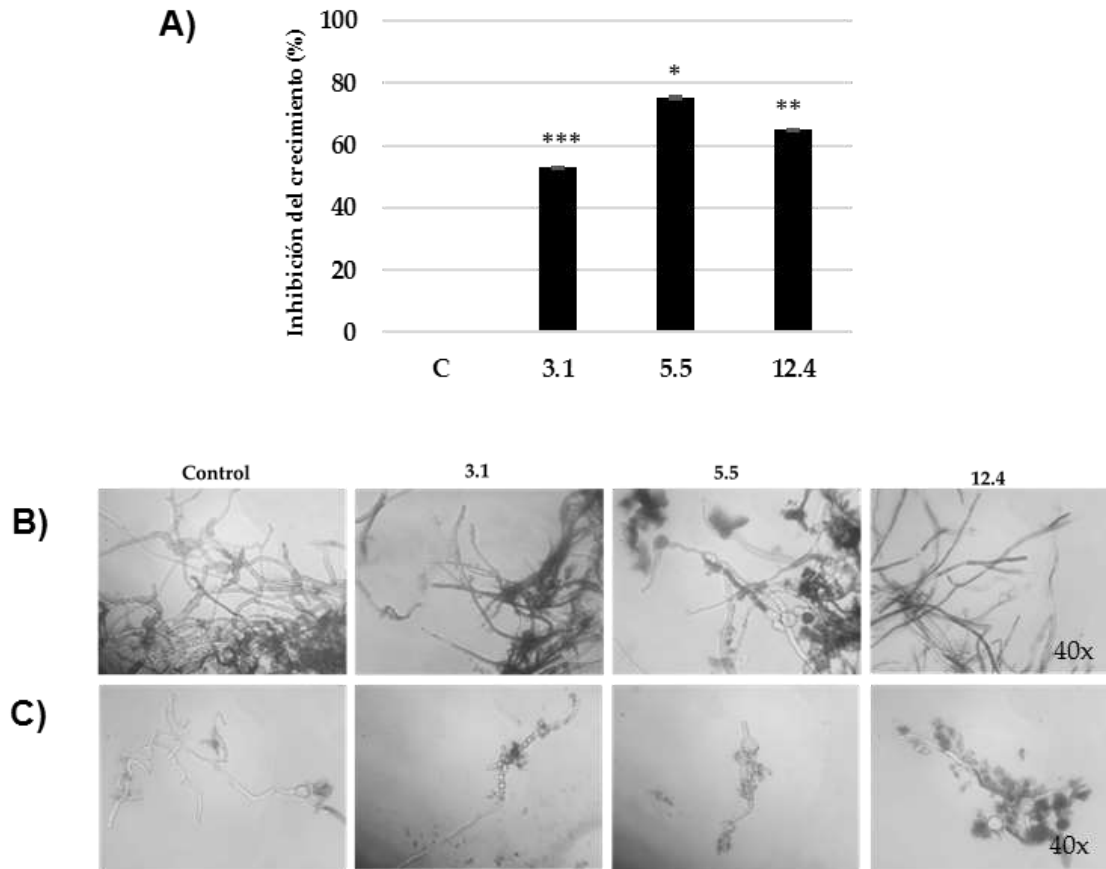


Figura 41. El efecto de la proteína quitinasa ChiC en extractos de hojas de plantas de tabaco transgénico en estado homocigo y su efecto sobre la germinación de esporas de *B. cinerea* y el crecimiento de hifas. **A)** Después de 48h de incubación, el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico se define como 100 veces la relación entre el A_{595} corregido de la planta control menos la A_{595} corregida de la muestra problema y la A_{595} corregida de la planta testigo. Cada valor representa el promedio \pm de los experimentos por triplicado (prueba t-Student; ***, $p = 0.0002$; *, 0.0165; **, 0.0053 respectivamente para cada línea comparada con el control). **B)** Análisis microscópico de la apariencia de las hifas de *B. cinerea* después de la incubación durante 48h en presencia de los diferentes extractos vegetales crudos. Objetivo de Magnificación 40x. **C)** Análisis microscópicos de la apariencia de las hifas de una sola espora de *B. cinerea* después de la incubación durante 48h en presencia de los diferentes extractos vegetales crudos. Aumento 40x.

9.7 Bioensayo de toxicidad con larvas de *D. magnifactella*

Para estimar la toxicidad de las plantas transgénicas sobre los insectos, se realizó un ensayo en el cual se alimentaron larvas del tercer instar de *D. magnifactella* con hojas de líneas transgénicas en estado homocigo 3.1, 5.5 y 12.4 y como control plantas de tabaco no transformadas, wt (**figura 42 A**).

Las larvas fueron alimentadas por 14 días y en dónde al final del experimento no se observaron cambios en tamaño y peso comparadas con las que se alimentaron de plantas no transformadas (**figura 42 B**).

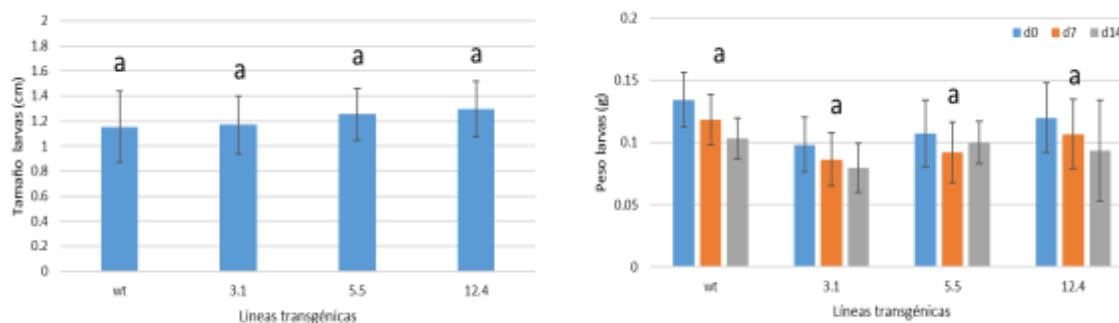


Figura 42. Bioensayo de alimentación de larvas de *D. magnifactella*. **A)** Tamaño de larvas de *Diatraea magnifactella* del tercer instar alimentadas con hojas de las tres diferentes líneas transgénicas de tabaco (3.1, 5.5, 12.4) y plantas control, wt a los 7 días de alimentación. **B)** Análisis del peso de las larvas de *Diatraea magnifactella* a lo largo de 14 días de alimentación. El peso de las larvas fue graficado y sometido a análisis estadístico. Las barras muestran la desviación estándar de un análisis por triplicado. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes y aquellas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

9.7.1 Bioensayo de toxicidad con larvas de *S. frugiperda*

Para estimar la toxicidad de las plantas transgénicas sobre larvas neonatas de *S. frugiperda* se realizó un ensayo de alimentación con hojas transgénicas de las tres líneas transgénicas de tabaco en estado homocigo 3.1, 5.5 y 12.4 y como control plantas no transformadas de tabaco, wt (**figura 43**). Lo que se observó fue una diferencia significativa en la mortalidad de los insectos desde el primer día. Las líneas transgénicas aumentan significativamente la tasa de mortalidad en larvas neonatas [línea 12.4 presentó un 90% (27 de 30 larvas muertas), línea 5.5 presentó 83% (25 de 30 larvas muertas), línea 3.1 presentó 73% (22 de 30 muertas) vs. línea control con un 50% (15 de 30 larvas muertas), $P = < 0.0001$]. La mayoría de las larvas que se alimentaron con hojas durante 7 días murieron (**figura 43**).

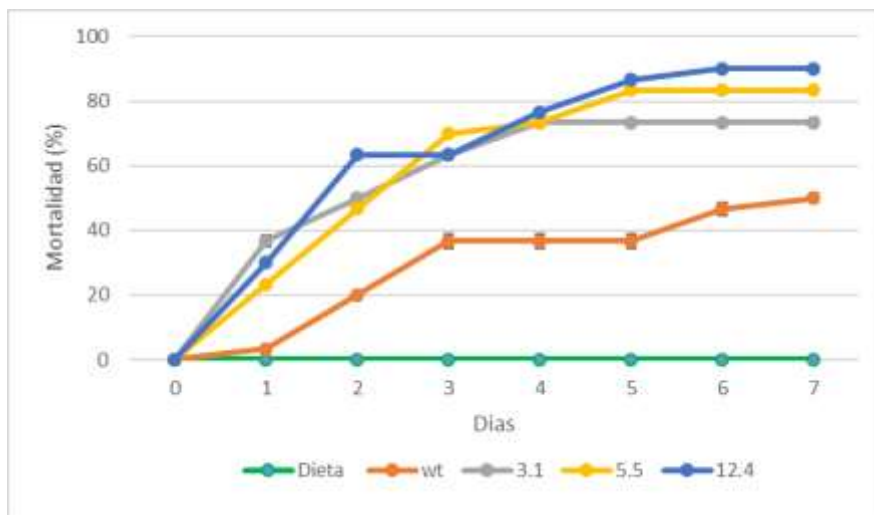


Figura 43. Bioensayo de alimentación de larvas de *S. frugiperda*. Toxicidad de las plantas transgénicas para las larvas de *S. frugiperda* en un ensayo de alimentación de plantas. Los datos mostrados representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error indican la desviación estándar de las medias. Cada grupo experimental estaba compuesto por 10 larvas y la mortalidad de las larvas se reporta como el porcentaje del número inicial de larvas. La dieta es alimento para el crecimiento de *S. frugiperda*. La curva de supervivencia fue significativamente diferente de las líneas transgénicas comparadas con las plantas no transformadas, (One way ANOVA, prueba de Tukey, $p < 0.0001$).

9.8 Pruebas de estrés abiótico en plantas transgénicas de tabaco

9.8.1 Pruebas de tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV)

Discos de hoja. La prueba de tolerancia en de discos de hoja de 5 semanas de edad aplicando exógenamente el MV. Los discos que se incubaron en agua pura no mostraron diferencias entre plantas transgénicas y WT. Posterior a la incubación en 3 y 6 μM de MV, los síntomas de clorosis fueron evidentes. Los discos de hoja de plantas WT mostraron los síntomas a partir de las 48h en 3 μM de MV; las plantas transgénicas de la línea 5.5 y 12.4 fueron las que retrasaron los síntomas de clorosis hasta las 72h en ambas concentraciones (**figura 44**).

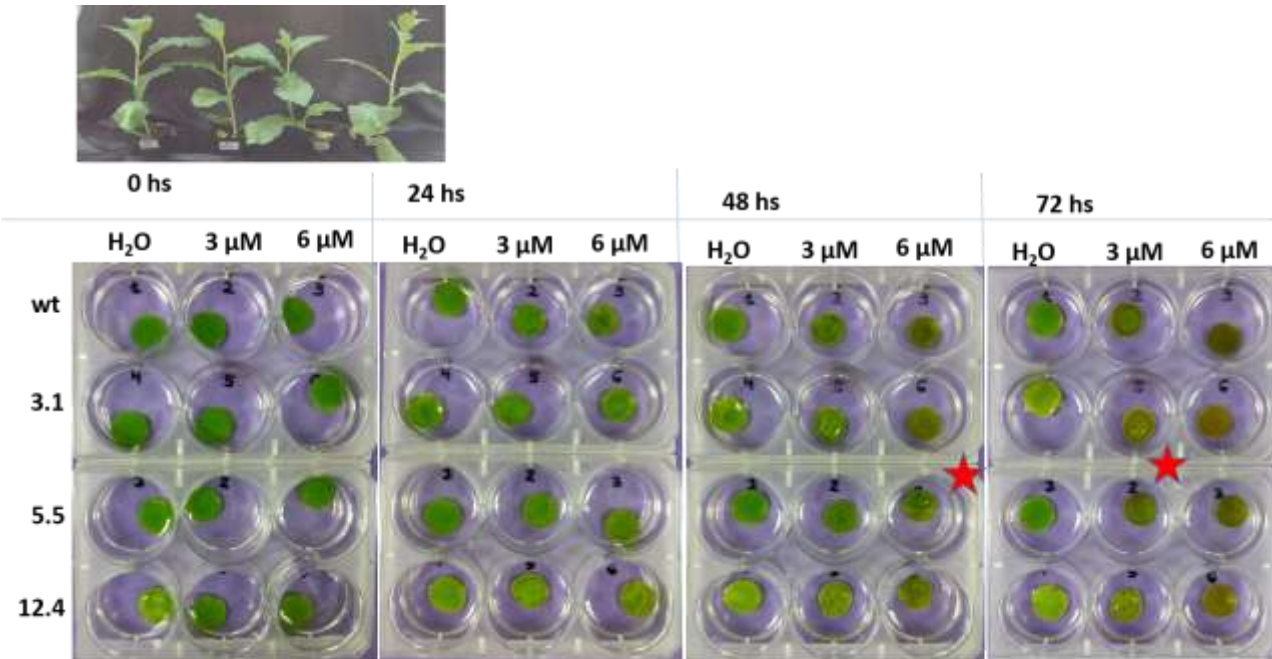


Figura 44. Contenido de clorofila en discos de hoja en tratamiento con MV. Discos de 5 semanas de edad de líneas transgénicas y una línea control, wt fueron sometidas a un tratamiento de tolerancia al estrés oxidativo con 3 y 6 μM por 72h. Estas fueron monitoreadas cada 24h y así analizar cualitativamente la presencia de clorosis y/o necrosis del tejido. Agua fue utilizada como control.

9.8.2 Tolerancia a estrés por salinidad

Plantas de 5 semanas de edad fueron regadas por un periodo de 2 semanas con 250 mM de NaCl. Se les analizaron los siguientes parámetros:

Contenido de MDA. Para la primera semana de tratamiento se pudo observar que el daño a los lípidos de la membrana es similar tanto en las plantas control (**figura 45 A**, Control) como en las sometidas al tratamiento salino; con un promedio de 18.5 nm g⁻¹ sin ningún cambio significativo (**figura 45 A**, NaCl 250 mM).

Para la segunda semana, las plantas en tratamiento mostraron que la línea transgénica 5.5 presentó casi la mitad de daño comparado con la línea silvestre y 3.1 un mayor daño con 35 nm g⁻¹ (**figura 45 B**, NaCl 250 mM); las plantas control presentaron un daño similar en las diferentes líneas transgénicas y wt (**figura 45 B**, Control).

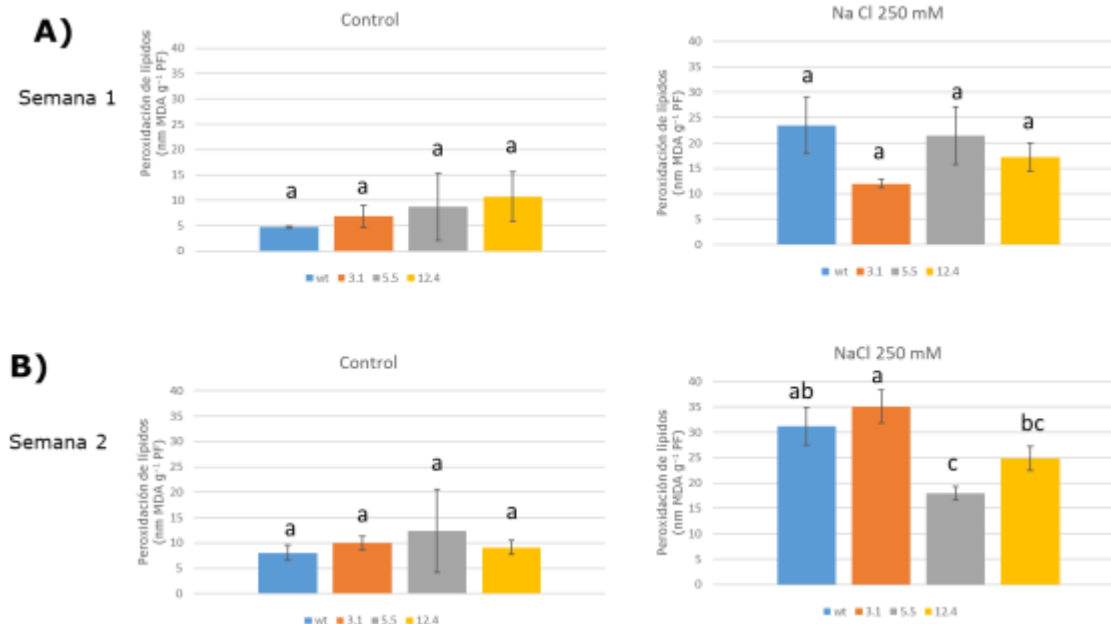


Figura 45. Análisis del contenido de MDA bajo condiciones de estrés salino. **A)** Contenido de MDA en la primera semana de tratamiento con NaCl 250 mM y plantas control sin riego con NaCl 250 Mm, costado izquierdo. **B)** Contenido de MDA en la segunda semana de tratamiento con NaCl 250 mM y plantas control sin riego de NaCl 250 mM, costado izquierdo. El contenido de MDA de las líneas transgénicas y wt fue graficado y sometido a análisis estadístico. Las barras muestran la desviación estándar de un análisis por triplicado. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes y aquellas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Contenido de clorofila. Para la primera semana de tratamiento con riego de NaCl 250 mM, el contenido de clorofila a y b se mantuvo sin cambios en todas las líneas con un rango de 8 mg l⁻¹ (**figura 46 A**, NaCl 250 mM). Las plantas control sin riego mostraron rangos de 3 mg l⁻¹ para clorofila a y de 19.5 mg l⁻¹ para clorofila b (**figura 46 A**, Control). En ambos tratamientos no hubo cambios significativos entre las diferentes líneas (**figura 46 A**).

Para la semana 2, las plantas en condiciones de estrés mantuvieron su contenido de clorofila a y b con rangos de 8 mg l⁻¹ sin diferencias significativas (**figura 46 B**, NaCl 250 mM).

Las plantas bajo condiciones control mostraron un contenido de clorofila a similar entre las diferentes líneas sin cambios significativos en un rango de 10 mg l⁻¹; en cuanto al contenido de clorofila b la línea 3.1 mostró mayor de 9.9 mg l⁻¹, el resto de las líneas 7 mg l⁻¹, (**figura 46 B**, Control).

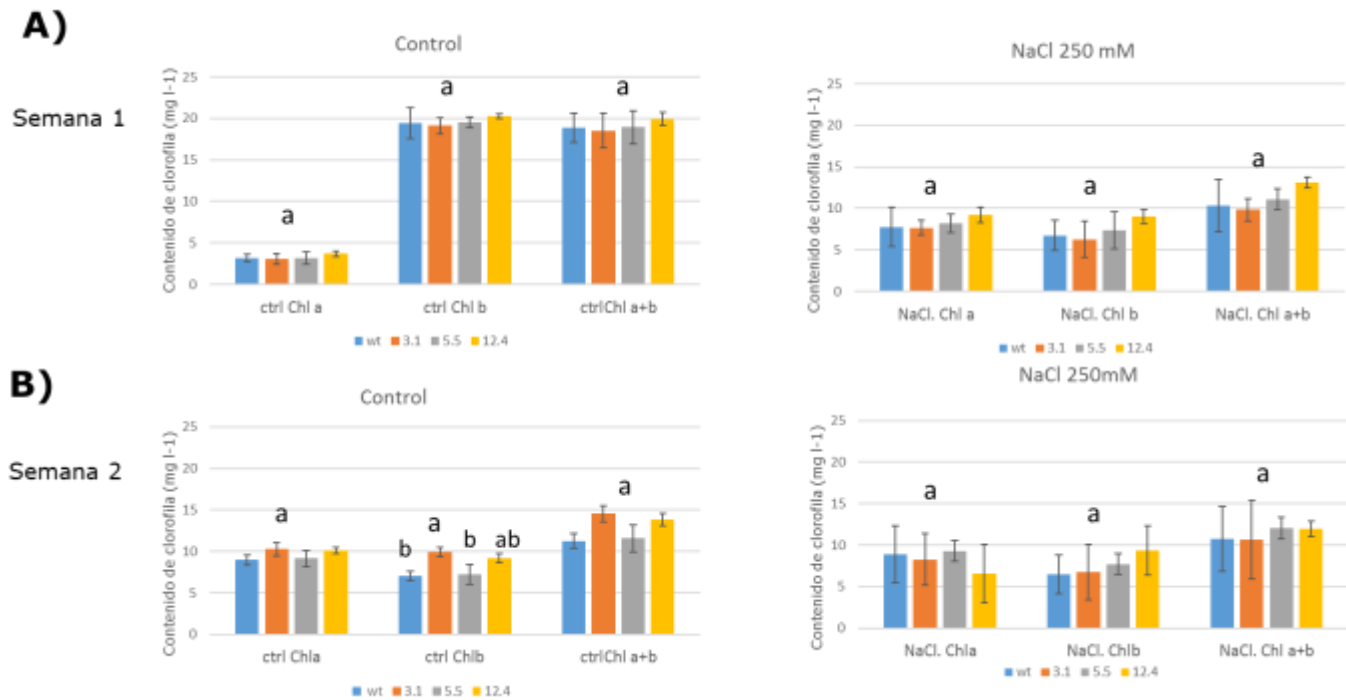


Figura 46. Análisis de contenido de clorofila bajo condiciones de estrés salino. **A)** Contenido de clorofila de líneas transgénicas y wt durante la primera semana de estrés. **B)** Contenido de clorofila de líneas transgénicas y wt durante la segunda semana de estrés. El contenido de clorofila de las líneas transgénicas y wt fue graficado y sometido a análisis estadístico. Las barras muestran la desviación estándar de un análisis por triplicado. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes y aquellas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

9.8.3 Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía y salinidad

La evaluación de la germinación de las líneas transgénicas en medio MS suplementado con 150 mM de cloruro de sodio (NaCl) para el estrés salino y para el estrés osmótico se utilizó sorbitol 300 mM.

Salinidad. A partir del día 3 se observó el inicio de la germinación siendo las líneas transgénicas las que mostraron mayor rapidez. Para el día 3 la línea 12.4 alcanzó el 70% en comparación con la línea control que fue del 43% de germinación. Seguido de estas encontramos las líneas 5.5 y 3.1 con 66 y 56% respectivamente. Para el día 4 la línea 5.5 alcanzó el 100% de germinación seguido de la línea 12.4 con 96% a diferencia de la línea control que se retrasó por 24h en alcanzar el 96% de germinación (**figura 47 A**).

Sequía. A partir del día 3 se registró el inicio de la germinación siendo la línea 5.5 la que para entonces alcanzó el 56% seguida de la línea 12.4 con 50% a diferencia de la línea control que mostró sólo el 26%. Fue al día 4 que alcanzó el 96 y 86% de germinación de las líneas 5.5 y 12.4 a diferencia del control con 80% (**figura 47 B**).

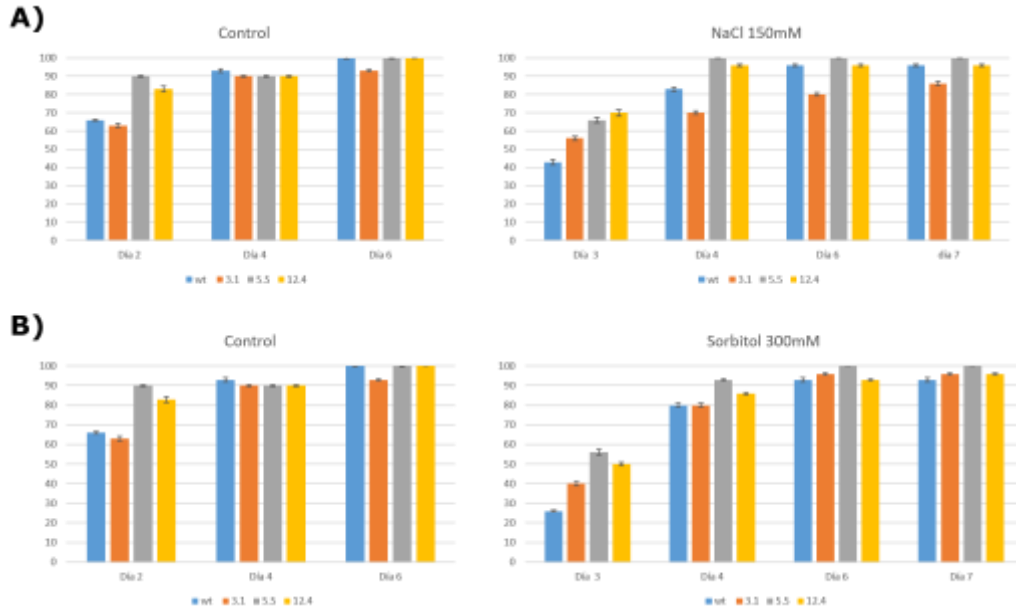


Figura 47. Evaluación de la germinación bajo condiciones de estrés osmótico y sequía. **A)** Análisis de la germinación de línea silvestre y diferentes líneas transgénicas bajo condiciones de estrés osmótico en cajas de MS suplementadas con 250 mM de NaCl. **B)** Análisis de la germinación de línea silvestre y diferentes líneas transgénicas bajo condiciones de estrés por sequía en cajas de MS suplementadas con 300 mM de sorbitol.

9.9 Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tabaco

9.9.1 Crecimiento y desarrollo

Una de las características fenotípicas de las plantas transformadas en condiciones de crecimiento y desarrollo óptimo, mostraron un acelerado crecimiento en comparación con las plantas wt. Esta característica se puede ver en las diferentes líneas transgénicas, sin embargo; la línea 12.4 es más evidente (**figura 48**).



Figura 48. Fenotipo de las diferentes líneas transgénicas y wt en condiciones normales de crecimiento en invernadero a las 4 semanas de crecimiento.

9.9.2 Biomasa

La evaluación de la cantidad total de materia viva (biomasa) de cada individuo de las líneas transgénicas 3.1, 5.5 y 12.4 de 2 meses de edad, así como de un control wt (**figura 49 A, B y C**). Estas no mostraron ninguna diferencia en cuanto a la cantidad de raíz (**figura 49 C**).

El análisis estadístico del peso fresco mostró una diferencia significativa entre la línea transgénica 5.5 y wt de 33.2 g a diferencia de la línea wt con 27.7 g. Sin embargo, en peso seco no mostraron ninguna diferencia entre líneas transgénicas y wt (**figura 49 D**).

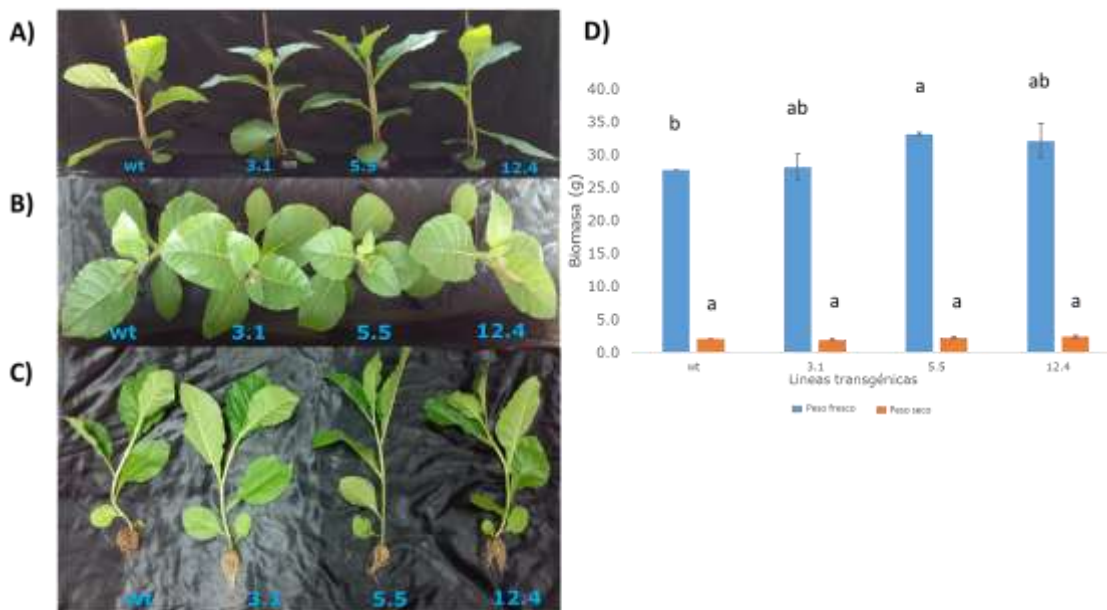


Figura 49. Evaluación de la biomasa de las diferentes líneas transgénicas y wt bajo condiciones normales de crecimiento en invernadero. **A)** Fenotipo de las plantas transgénicas y wt. **B)** Fenotipo de la parte aérea; plantas transgénicas y wt. **C)** Fenotipo completo de la parte aérea y radicular de las líneas transgénicas y wt. **D)** La biomasa de las líneas transgénicas y wt fue graficada en peso fresco y peso seco. Bajo cada condición se les realizó un análisis estadístico. Las barras muestran la desviación estándar de un análisis por triplicado. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes y aquellas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

9.9.3 Producción de semillas

En plantas adultas en etapa de reproducción se analizó el peso de las cápsulas maduras y secas de cada una de las líneas transgénicas, así como del control wt (**figura 50 A**). Lo que se observó es que no hay diferencia en cuanto a tamaño y peso. Todas presentaron un tamaño y peso uniforme con un promedio de 2.2 g (**figura 50 B**).

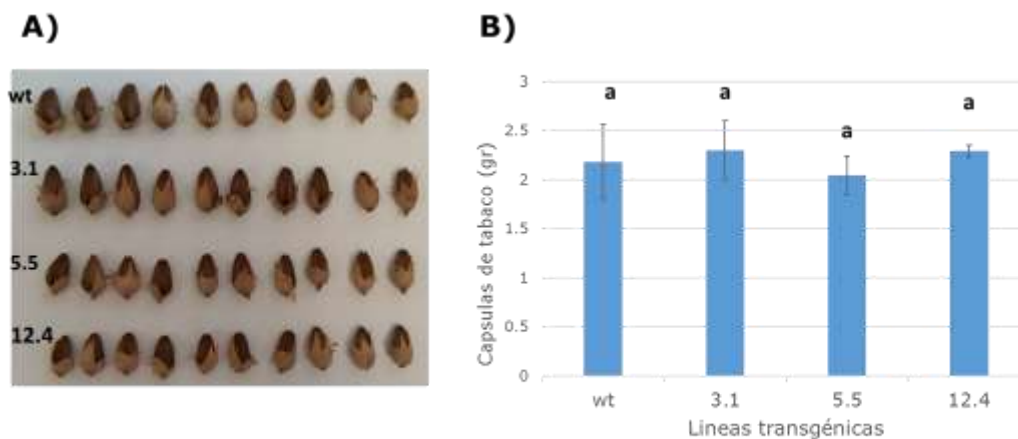


Figura 50. Evaluación del número de semillas de las diferentes líneas transgénicas y wt bajo condiciones óptimas de crecimiento en invernadero. **A)** Fenotipo de las capsulas de tabaco de las diferentes líneas transgénicas y wt. **B)** El peso de las capsulas fue graficado y sometido a análisis estadístico. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes y aquellas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

10. DISCUSIÓN

Las quitinasas pertenecen a una familia de enzimas presentes en el reino de las plantas, animales y bacterias. Estas enzimas catalizan el rompimiento de la unión β -1,4-glicosídico del biopolímero *N*-acetilglucosamina de la quitina (Graham et al., 1993; Brurberg, 1996).

Ante un ambiente estresante las plantas se vuelven más susceptibles, situación causada por diferentes tipos de estrés de tipo tanto abiótico (sequía, salinidad, metales pesados, entre otros) y estrés biótico (principalmente insectos y hongos fitopatógenos); las cuales provocan a su vez pérdidas económicas difíciles de estimar en todo el mundo debido a su amplio rango de plantas huésped (Ulate et al., 2014; Steiger, 2007; Someya et al., 2001). Debido a esto, diferentes estudios nos han conducido a desarrollar plantas con aumentada tolerancia a estos tipos de estrés (Lorito M. y Scala F. 1999, Liu et al 2010, de las Mercedes et al., 2006). Enzimas que degradan paredes celulares, como las quitinasas de *S. marcescens* han demostrado actividad antifúngica (Dunsmuir et al., 1993, Someya et al., 2001, Fuchs et al., 1986) ya que sus enzimas quitinolíticas actúan de diferente manera (-endo o -exoquitinasa) hacia su sustrato permitiendo una eficiente degradación de la quitina (Brurberg et al, 2000) como la que se presenta en las hifas de hongos fitopatógenos.

El presente estudio describe la identificación de dos aislados bacterianos endémicos de Tlaltizapan Morelos, provenientes de cadáveres del gusano barrenador de la caña *D. magnifactella*. La amplificación de los genes que codifican para las enzimas quitinolíticas ChiA, ChiB, ChiC y una proteína de unión CBP permiten estudiar el papel enzimático de cada una de éstas a través de su caracterización bioquímica por medio de ensayos *in vitro*, así como transformar plantas que sobre expresen cada uno de los genes y estudiar su tolerancia ante el estrés biótico y abiótico.

En ensayos cualitativos se comprobó que ambas cepas de *S. marcescens* son capaces de tomar como fuente de carbono la quitina coloidal que se encuentra en el medio formando el característico halo de degradación alrededor de la colonia bacteriana (Brurber et al., 2000), debido a la producción de compuestos como quitinasas, quitobiosidasas (Brurberg, 2000).

La amplificación de los genes quitinolíticos de *S. marcescens* Bar86 (ChiA, ChiC y la proteína de unión CBP) y su clonación en un vector de expresión permitió analizar su actividad quitinolítica. De las cuales la quitinasa ChiC fue la que mayor actividad quitinasa mostró y por lo cual se eligió para los posteriores estudios de estrés biótico y abiótico en plantas transgénicas de tabaco. La actividad quitinolítica de esta enzima fue de 0.234 U/ μ g, y a su vez fue comparada con otras quitinasas como la Chi62 de *S. marcescens* B4A con 0.21 U/ μ g (Babashpour, 2012), 0.03 U/ μ g ChiA *Serratia proteamaculans* (Mehmood et al., 2009), dos quitinasas de *Aeromonas schubertii* con 0.0026 ASCHI61 y 0.0018 ASCHI53 (Liu et al., 2009) y 0.25 U/ μ g de *Trichoderma asperellum* (Fernández et al., 2013); la actividad quitinolítica de la enzima ChiC de este estudio fue comparable con *Trichoderma*, género de mayor producción de enzimas quitinolíticas y actividad quitinolítica Fernández et al., 2013; Bolar et al., 2001; de las Mercedes et al., 2001.

En cuanto a la transformación genética de plantas de tabaco, se generaron plantas que expresaron cada uno de los genes quitinolíticos (ChiA, ChiB, ChiC y CBP). Se transformaron aproximadamente 300 discos de hojas para cada quitinasa en un co-cultivo que portaba cada uno de los plásmidos (p2X35SChiA, p2X35SChiB, p2X35SChiC y p2X35SCBP). Se empleó un promotor doble CaMV 35S en plantas de *N. tabacum* utilizando a *Agrobacterium* como vector. El uso de este promotor ha sido reportado como un medio efectivo para la transformación en *N. tabacum* para asegurar altos niveles de expresión en todos los tejidos (Liu et al, 2010). A los 15 días se pudieron observar brotes producto de la regeneración en placas de MS (Murashigue Skoog) suplementadas con kanamicina 100 mg/L como medio de selección. Se seleccionaron líneas que resultaron positivas a la prueba de PCR al gen de resistencia a kanamicina, *NPTII* y al gen de cada una de las quitinasas; de las cuales se obtuvieron líneas independientes T² homózigas con integración estable del T-DNA. En cuanto a estas plantas, (estudios preliminares de plantas transformadas con las quitinasas ChiA, ChiB y CBP), mostraron una actividad quitinasa media-alta, siendo las plantas que expresaron la quitinasa ChiC las de mayor actividad las cuales mostraron hasta tres veces más actividad quitinolítica que la planta control, similar a los que se ha observado en algodón, tabaco (Emani et al., 2003) y tomate (Shah et al., 2010), dando como resultado una reducción en la infección del 80% causada por *B. cinerea* así como un menor grado de necrosis y clorosis en hojas (Chen et al., 2014, Lorito et al, 1998; de las Mercedes 2006).

Un resultado similar se observó en ensayos *in vitro* que consistieron en utilizar la proteína presente en extractos totales de hoja de tabaco que sobreexpresan la quitinasa ChiC en donde se analizó su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de esporas de *B. cinerea*, los cuales microscópicamente demostraron propiedades anti fúngicas reduciendo el crecimiento de hifas. Estos efectos coinciden con los reportados anteriormente en plantas de tabaco transformadas con una quitinasa de *S. cerevisiae* (Carstens et al., 2003).

Con los resultados obtenidos en este estudio sobre la protección a la infección fúngica por *B. cinerea* y la inhibición al crecimiento de hifas podrían evidenciar que la actividad quitinolítica ChiC, puede, en parte, estar proporcionando protección directa a las plantas de tabaco resultado de la extensiva ruptura de la pared celular y a su vez la fuga citoplasmática de las células del hongo patógeno como se ha reportado anteriormente (Emani et al., 2003). Además de la actividad quitinolítica, un segundo mecanismo indirecto de protección es que debido a que la pared celular de los hongos libera componentes glucosídicos los cuales a su vez pueden provocar la inducción de mecanismos de defensa de las plantas (Ludwig et al., 1990; Graham et al., 1993; Lamb et al., 1989; Shibuya y Minami, 2001). Por lo tanto, es posible que la eficacia de la endoquitinasa transgénica se deba tanto a su acción directa sobre la quitina de la pared celular del hongo invasor como a una acción indirecta a través de la liberación de oligosacáridos elicitores del patógeno, dando lugar a la inducción de la respuesta de defensa natural de la planta. Estas respuestas pueden incluir el refuerzo de las paredes celulares, la producción de fitoalexinas, inhibidores enzimáticos, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y varias enzimas líticas (Lamb et al., 1989), asegurando que la actividad de la quitinasa ya presente en el momento de la invasión fúngica, hidrolice la quitina presente en la pared celular del patógeno invasor.

Las plantas transgénicas obtenidas en este trabajo, así como a las plantas silvestres se les analizaron parámetros morfológicos como el fenotipo y su rendimiento, las cuales no mostraron

anormalidades morfológicas evidentes comparado con las plantas control. Este resultado fue consistente con estudios previos sobre tabaco, papa (Lorito et al., 1998) y brócoli (Mora y Earle, 2001) donde la expresión de endoquitinasa no afectó adversamente a las plantas. Otro parámetro fue la biomasa, en donde en estadios tempranos de crecimiento se observó un crecimiento más rápido y vigoroso en las líneas transformadas, sin embargo; cuando se analizó la biomasa seca no mostraron cambios significativos comparadas con el control. Esto se debe a que a pesar de que las quitinasas están involucradas en diferentes procesos de desarrollo y la generación de moléculas señal que regulan el proceso de organogénesis en las diferentes etapas de crecimiento, el tamaño máximo es igualado a las plantas control (Grover 2012; Van Loon et al., 2006).

En el caso de ensayos de toxicidad en plantas en larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* que fueron alimentadas con plantas que expresan la quitinasa ChiC de *S. marcescens* Bar86, se registró mortandad desde el primer día, resultados similares se obtuvieron con la expresión de una quitinasa del lepidóptero *Spodoptera littoralis* en plantas de caña las cuales alcanzaron un 70% de mortandad en larvas del primer instar comparadas a un 90% en este trabajo. Este efecto se atribuye a la capacidad de estas enzimas a actuar sobre estructuras como la cutícula de insectos y de la matriz peritrófica (PM) constituidas por quitina (Osman et al., 2015). Este mismo ensayo se realizó con larvas de *Diatraea magnifactella* del tercer instar en donde no se observó ningún efecto, lo cual se puede atribuir al grosor de la matriz peritrófica que poseen las diferentes especies de insectos o bien la ausencia de la misma (Saguez et al., 2005; Merzendorfer 2013).

Las quitinasas no solo participan bajo condiciones de estrés biótico (de las Mercedes et al., 2006, Lorito et al. 1999, Shah et al., 2010), sino también por estrés abiótico (de las Mercedes et al., 2006, Zagorchev et al., 2014, Yeh et al., 2000). Las líneas sobreexpresantes p2x35ChiC de *S. marcescens* fueron analizadas cualitativamente bajo condiciones de estrés oxidativo en una prueba con discos de hoja y métil viológeno (MV), en donde mostraron mayor tolerancia al estrés oxidativo a diferencia de la línea silvestre. Esto podría deberse a los niveles de expresión de la proteína ChiC, lo que podría indicar que están involucradas en la respuesta a estrés oxidativo conteniendo contra el daño celular y peroxidación de lípidos activando una o más rutas de señalización para contender contra el estrés (Van Loon et al., 2006), por lo que los niveles de clorofila se ven casi ininterrumpidos, dando lugar a un aspecto foliar más verde a pesar del paso de los días bajo condiciones oxidativas (Han et al., 2015). Aunado a los análisis de estrés abiótico, el estrés osmótico causado por salinidad sobre el proceso de germinación mostró que las líneas transgénicas germinación más rápido para el día 3, comparadas con las plantas silvestres. Esto se podría atribuir a que la sobre expresión mejora la tolerancia; disminuyendo el daño a la membrana ya que se ha reportado que las quitinasas tienen función durante la germinación sobre proteínas de la pared las cuales tienen unidas a azúcares como el arabinogalactan que contiene cantidades detectables de N-acetilglucosamina sobre el cual las quitinasas ejecutan su función liberando oligosacáridos que podrían estar actuando como elicitores desencadenando una o más señales de defensa (van Hengel et al., 2001; Zargochev et al., 2014; de las Mercedes et al., 2006) que se traducen en una más rápida germinación y tolerancia al estrés en el medio.

Actualmente aún resulta difícil de estudiar todos los procesos en los cuales están implicadas las quitinasas debido a la gran diversidad de estas enzimas (Passarinho y Vries, 2002) y a su vez a la gran variedad de glicanos y moléculas presentes en la pared celular, membrana plasmática y citoesqueleto (Minic, 2008), esenciales para la arquitectura primaria de la pared celular las cuales están constituidas principalmente por carbohidratos liberando oligosacáridos que son blanco de enzimas quitinolíticas en diversos procesos a lo largo de la vida de la planta, los cuales responden concertadamente con otras moléculas tanto en procesos de defensa al estrés biótico así como a algún tipo de estrés abiótico o ambos al mismo tiempo (Zagorchev et al, 2014).

11. CONCLUSIONES

El aislado bacteriano Bar86 provenientes de *S. marcescens*, nativo de Morelos es capaz de secretar una batería quitinolítica compuesta por ChiA, ChiB, ChiC y la proteína CBP de unión a quitina al medio de crecimiento.

La endoquitinasa ChiC posee la mayor actividad quitinolítica.

El anticuerpo policlonal anti-chiC generado en conejo, fue capaz de reconocer la proteína en extractos crudos de plantas transgénicas.

Las plantas transgénicas que expresan las quitinasas ChiA, ChiB, ChiC y CBP no mostraron diferencias morfológicas comparadas con la línea silvestre.

Las plantas transgénicas homocigas que sobreexpresaron la quitinasa ChiC mostraron resistencia contra el hongo *B. cinerea*, inhibiendo el crecimiento de hifas, así como un efecto letal sobre larvas neonatas de *S. frugiperda* cuando se alimentaron de éstas. Aunado a esto, se observó una mayor tolerancia al estrés abiótico causada por salinidad, sequía y al estrés oxidativo causado por metil viológeno.

12. PERSPECTIVAS

Analizar la actividad quitinolítica de las plantas transformadas con las quitinasas ChiA, ChiB y CBP y estudiar el posible efecto sinérgico entre ellas.

Realizar estudios de tolerancia al estrés biótico y abiótico en plantas transformadas con la quitinasa ChiA, ya que fue la segunda quitinasa que mostró altos niveles quitinolíticos después de la quitinasa ChiC.

Estudiar el efecto antifúngico de estas enzimas quitinolíticas con otros hongos fitopatógenos de interés agronómico.

Transformar plantas de caña con la quitinasa ChiC y estudiar su efecto sobre la mortalidad de larvas de *D. magnifactella*.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Albenne C., Canut H., Jamet E. **2013**. Plant cell wall proteomics: the leadership of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 4:1-17
2. Bolar J.P., Norelli J. L., Harman G.E., Brown S.K., Aldwinckle H.S. **2001**. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10(6), 533–543.
3. Boletín informativo sobre microbiología centro de análisis clínica Rotger. **2006**. Gaceta microbiológica. *Serratia marcescens*, la bacteria “prodigiosa”.
4. Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressman R.R., Biddle P., Knowlton S. **1991**. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science.* 1194.
5. Brurberg M.B., Nesl I.F., Eijsinkl G. H. **1996**. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology.* 142:1581-1589.
6. Brurberg M.B., Synstad B., Klemsdal S.S, van Aalten M.F., Sundheim L., Eijsink G.H. **2000**. Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Res. Devel. in Microbiology.*
7. Carstens M., Vivier M.A., Pretorius I.S. **2003**. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1-2* gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 12:497–508.
8. Chen P.J. Senthilkumar R., Jane W.N., He Y., Tian Z., Yeh K.W. **2014**. Transplastomic *Nicotiana benthamiana* plants expressing multiple defence genes encoding protease inhibitors and chitinase display broad-spectrum resistance against insects, pathogens and abiotic stresses. *Plant Biotech J.* 12(4), 503–515.
9. Cletus J., Balasubramanian V., Vashisht D., Sakthivel N. **2013**. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. *Biotechnol Lett.* 35:1719–1732.
10. de las Mercedes D.M. **2001**. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet.* 38:335-342.
11. de las Mercedes D.M.; Pintor-Toro J.A.; Cubero B. **2006**. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology.* 142:722–730.
12. Day R.B., Okada M., Ito Y., Tsukada K., Zaghoulani H., Shibuya N. Stacey G. **2001**. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiol.* 126: 1162-1173.
13. Dean R., Van Kan J., Pretorius Z., Hammond-Kosack K., Di Pietro A., Spanu P., Rudd J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster D. **2012**. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology.* 13(4): 414-430.
14. Dunsmuir P., Howie W., Newbigin E., Joe L., Penzes E., Suslow T. **1993**. Resistance to *Rhizoctonia solani* in transgenic tobacco. *Current plant science and biotechnology in Agriculture.* 14:567-571.
15. Emani C.; Garcia, J.M.; Lopata-Finch, E.; Pozo, M.J.; Uribe, P.; Kim, D.-J.; Sunilkumar, G.; Cook, D.R.; Kenerley, C.M.; Rathore, K.S. **2003**. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*: Fungal-resistant transgenic cotton. *Plant Biotechnol. J.* 1:321–336.

16. Fernández K.F.; Cortijo-Triviño D.; Batista, K.A.; Ulhoa, C.J.; García-Ruiz, P.A. **2013**. Chitin hydrolysis assisted by cell wall degrading enzymes immobilized of *Thichoderma asperellum* on totally cinnamoylated D-sorbitol beads. *Mat Sci Eng C-Mater.* 33:(5), 3077-81.
17. Gopalakrishnan B., Muthukrishnan S., Kramer K.J. **1995**. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. *Insect Biochem Mol Biol.* 25:255-265.
18. Graham L., Sticklen M.B. **1993**. Plant chitinase. *Can J Bot.* 72: 1057-1083.
19. Grimont F., Grimont A.D.P. The Genus *Serratia*. **2006**. *The Prokaryotes.* 219-244
20. Grover A. **2012**. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Crit Rev Plant Sci,* 31:57–73.
21. Hamid R., Khan M.A., Ahmad M., Ahmad M.M., Abdin M.Z., Musarrat J., Javed S. **2013**. Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci.* 5(1):21-9.
22. Han Yangyang., Chena Yanhui., Yina Suhong., Zhanga Meng., Wanga Wei. **2015**. Over-expression of TaEXPB23, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol.* 173:62-71.
23. Henrissat B. **1991**. A classification of Glycosyl-Hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280:309-316.
24. Henrissat B. **1998**. Glycosidase families. *Biochemical Society Transactions.* 26:153–156
25. Henrissat B. Coutinho P.M., Davies G.J. **2001**. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 47:55–72.
26. Islam S., Akanda A.M., Prova A., Islam M.T., Hossain M.M. **2016**. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promoting and disease suppression. *Front Microbiol.* 6:1360.
27. Jacobs C.G.C., Wang Y., Vogel H., Vilcinskis A., Van der Zee M., Rozen D.E. **2014**. Egg survival is reduced by Grave-soil microbes in the carrion beetle, *Nicrophorus vespilloides*. *BMC Evol Biol.* 14:208.
28. Jarvis W. L. The biology of Botrytis. **1980**. Ed. Coley-Smith, J.R. Verhoeff, K. Jarvis, W. pp 318.
29. Plant chitinases--regulation and function.
30. Kasprzewska A. **2003**. Plant Chitinases--Regulation and Function. *Cell Mol Biol Lett.* 8(3):809-24.
31. Kesari P., Patil D.P., Kumar P., Tomar S., Sharma A.K., Kumar P. **2015**. Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. *Proteomics* 15:1693–1705.
32. Khanafari A., Assadi M.M., Fakhr F.A. **2006**. Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online J Biol Sci.* 6(1): 1-13.
33. Kissoudis C., van de Wiel C., Visser G R., F van der Linden G. **2014**. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Front Plant Sci.* (207)5: 1-20.
34. Koyro H.W., Ahmad P., Geissler N. **2012**. Abiotic Stress Responses in Plants: An Overview. In: Ahmad P., Prasad M. (eds) *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer, New York, NY.
35. Lamb C.J., Lawton, M.A., Dron, M., Dixon, R.A. **1989**. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell.* 56:215–224.

36. Lee Young-Pyo., Kim Sun-Hyung., Bang Jae-Wook., Lee Haeng-Soon., Kwak Sang-Soo., Suk-Yoon Kwon. **2007**. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Rep.* 26:591–598
37. Legrand M., Kauffmann S., Geoffroy P., Fritig B. **1987**. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:6750-6754.
38. Li H., Greene H. **2010**. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. *PLoS ONE* 5(1): e8654.
39. Limon M.C., Lora J.M., Garcia I., de la Cruz J., Llobell A., Benitez T., Pintor Toro J.A. **1995**. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 28:478–483.
40. Liu G., Wei X., Qin Y., Qu Y. **2010**. Characterization of the endoglucanase and glucomannanase activities of a glycoside hydrolase family 45 protein from *Penicillium decumbens* 114–2. *J. Gen. Applied Microbiol.* 56: 223–229.
41. Liu T. L., Liu L., Jiang X., Hou J., Fu K., Zhou F., Chen J. **2011** *Agrobacterium*-mediated transformation as a useful tool for the molecular genetic study of the phytopathogen *Curvularia lunata*. *Eur J Plant Pathol.* 126(3), 363-371.
42. Lobo B.M., Molina A., Solano R. **2002**. Constitutive expression of ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* 29(1):23-32.
43. López I., Larrea F.R, Cocolin L., Orr E., Phister T, Marshall M, VanderGheynst J., Mills D.A. **2003**. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied environ microbiol.* 69(11): 6801–6807.
44. Lorito M., Woo S.L., Garcia I., Colucci G., Harman G.E., Pintor-Toro J.A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence C.B., Zoina A. **1998**. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol.* 142:722–730.
45. Ludwig A., Boller T. **1990**. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. *FEMS Microbiol Lett.* (69), 61-66.
46. Lichtenhalter H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology*, Pacher, L & Douce, A. (eds), Academic Press New York, 148:350-382.
47. Matroodi S., Motallebi M., Zamani M., Moradyar M. **2013**. Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. *World J Microbiol Biotechnol.* (29): 1517–1523.
48. Mekhael R., y Yousif S.Y. **2009**. The role of red pigment produces by *Serratia marcescens* as antibacterial and plasmid curing agent. *The 2nd Kurdistan Conference on Biological Sciences.* 12(1): 268-274.
49. Melchers L.S., Apotheker-de Groot M., A. van der Knaap J., Ponstein A.S., Sela-Buurlage M.B., Bol J.F., Comelissen B.J.C., van den Elzen P.J.M., Linthorst H.J.M. **1994**. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J* 5:(4), 469-480.
50. Melchers L.S., Stuiver M.H. **2000**. Novel genes for disease-resistance breeding *Curr. Op. Plant Biol.* 3, 147.

51. Merzendorfer, H. **2013**. Insect-Derived Chitinases. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 136,19-50 (2013).
52. Minic Z. **2008**. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, 227(4):723–740.
53. Mohammed A.M., Tork S., Al-Garni M.S., Kabli A.S. **2011**. Chitinolytic enzyme production and genetic improvement of a new isolate belonging to *Streptomyces anulatus*. *Ann Microbiol.* 61(453-461).
54. Monreal J. y Reese E.T. **1969**. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol.* 15:689-696.
55. Mora, A.A., Earle, E.D. **2001**. Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Mol. Breed.* 8:1-9.
56. Nagpure A., Choudhary B., Gupta R.K. **2014**. Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Crit Rev Biotechnol.* 34(3):215–232.
57. Nicolás C., Hermosa R., Rubio B., Mukherjee P.K., Monte E. **2014**. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance- status and prospects. *Plant Sci.* 228: 71–78.
58. Oerke E.C., Dehn H.W., Schonbeck F., Webber A., **1994**. Production and Crop protection estimated losses in major food and cash crop. Elsevier, 808.
59. Osman G.H.; Assem S.K.; Alreedy R.M.; El-Ghareeb D.K.; Basry M.A.; Rastogi A.; Kalaji H.M. **2015**. Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm. *Spodoptera littoralis*. *Sci. Rep.* 5, 18067.
60. Passarinho P.A., Vries S.C. **2002**. Arabidopsis Chitinases: a Genomic Survey. *American Society of Plant Biologists in The Arabidopsis Book.*
61. Punja Z.K., Zhang Y.Y. **1993**. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J. Nematol.* 25(4):526-540.
62. Raviv Buzi, Aghajanyan Lusine, Gila Granot, Makover Vardit, Frenkel Omer, Gutterman Yitzchak, Grafi Gideon. **2017**. The dead seed coat functions as a long-term storage for active hydrolytic enzymes. *PLoS ONE* 12(7):e0181102.
63. Roberts W.K., Selitrennikoff C.P. **1988**. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *J Gen Microbiol.* 134:169-176.
64. Román G.M.I, Dunn F.M., Valencia R.T., Meléndez H.F., Palacios H.G., Navarro G.K. **2014**.
65. Potentiation of the synergistic activities of chitinases ChiA, ChiB and ChiC from *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 by chitobiase (Chb) and chitin binding protein (CBP). *World J Microbiol Biotechnol.* 30:33-42.
66. Santos, P., Fortunato, A., Ribeiro, A., and Pawlowski, K. **2008**. Chitinases in root nodules. *Plant Biotechnol.* 25:299–307.
67. Saguez J., Hainez R., Cherqui A., Van W.O, Jeanpierre H., Lebon G., Noiraud N., Beaujean A., Jouanin L., Laberche J.C, Vincent C., Giordanengo P. **2005**. Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linne) and *in vitro*. *Transgenic Res.* 14:57–67.
68. Sehdev P.S., Donnenberg M.S. **1999**. "Arcanum: The 19th-century Italian pharmacist pictured here was the first to characterize what are now known to be bacteria of the genus *Serratia*". *Clin Infect Dis.* 29(4):770, 925.

69. Shah M.R.; Mukherjee P.K.; Eapen S. **2010**. Expression of a fungal endochitinase gene in transgenic tomato and tobacco results in enhanced tolerance to fungal pathogens. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 16:39–51.
70. Shapira R., Ordentlich A., Oppenheim A.B. **1989**. Control of plant diseases by chitinase Expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathology*. 79: 1246-1249.
71. Shibuya, N.; Minami E. **2001**. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**:223-233.
72. Shinshi H., Neuhaus J.M., Ryals J., Meins F. **1990**. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol*. 14: 57-368.
73. Someya N., Nakajimai N., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K. **2001**. Synergistic Antifungal Activity of Chitinolytic Enzymes and Prodigiosin Produced by Biocontrol Bacterium *Serratia marcescens* Strain B2 against Gray Mold Patogen, *Botrytis cinerea*. *Gen. Plant Pathol.* 67:312-317.
74. Steiger D. **2007**. Global economic importance of *Botrytis* protection. In: Book of Abstracts, 14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa, Fourie, P. Vivier, M., Edition. Cape Town, South Africa: African Sun MeDIA Pty (Ltd.) 21-26.
75. Suzuki K., Taiyoji M., Sugawara N., Nikaidou N., Henrissat B., Watanabe T. **1999**. *The third chitinase gene (chiC) of Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem. J.* 343:587-596.
76. Suzuki K., Sugawara N., Susuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N., Watanabe T. **2002**. Chitinases A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem* 343:587-596.
77. Swegle M., Kramer K.J., Muthukrishnan S. **1992**. Properties of Barley Seed Chitinases and Release of Embryo-Associated Isoforms during Early Stages of Imbibition. *Plant Physiol.* 99: 1009-1014.
78. Taira T. **2010**. Structures and antifungal activity of plant chitinases. *J. Appl. Glycosci.* 57: 167–176.
79. Tyler L., Bragg J.N., Wu J., Yang X., Tuskan G.A., Vogel J.P. **2010**. Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics* 11: 600.
80. Ulate B.B., Cruz A.M., Amrine K.C., Labavitch J.M, Powell A.L., Cantu D. **2014**. Genome wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Front. Plant Sci.* 5:435.
81. UIPP. **2002**. Paris, France: Union des Industries de la Protection des Plantes. *Annual Report*.
82. Vaaje-Kolstad G., Horn J.S., Sørli M., Eijsink V.J.H. **2013**. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J.* 280:3028–3049.
83. van Aalten D.M., Komander D., Synstad B., Gaseidnes S., Peter M.G. **2000**. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:8979–8984.

84. van Hengel A.J, Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., Kammen Ab van., de Vries S.C. **2001**. N-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol*, 125(4), 1880–1890.
85. van Loon L.C., Van Strien E.A. **1999**. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*. 55:85-97.
86. van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. **2006**. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol*. 44:135–162.
87. 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.
88. Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I. **2013**. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342:118-123.
89. Wingler A., Purdy S., MacLean J.A., Pourtau N. **2006**. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal Exp Bot*. 57:391-399.
90. Dong-Yue Y., Na-Na M., Kun-Yang Z., Shao-Bo Z., Zhong-Ming L., Xing-Hong Y. **2017**. Overexpression of tomato SIGGP-LIKE gene improves tobacco tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress. *J Plant Physiol*. 209:31-41.
91. Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M., Xiong F., Yang S.C.D, Wiseman S.B., Sarhan F., Danyluk J., Xue Y.Q., Hew C.L., Doherty-Kirby A., Lajoie G. **2000**. Chitinase Genes Responsive to Cold Encode Antifreeze Proteins in Winter Cereals. *Plant Phys*. 124:1251-1263.
92. Zagorchev L., Kamenova P., Odjakova M. **2014**. The Role of Plant Cell Wall Proteins in Response to Salt Stress. *TheScientificWorldJOURNAL*. 1-9
93. Zhang H., Zhang D., Chen J., Yang Y., Huang Z., Huang D., Whag X.C., Huang R. **2004**. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol*. 55: 825-834.
94. Ziaei M. Motallebi M., Zamani R.M., Panjeh Z.N. **2015**. Co-expression of chimeric chitinase and a polygalacturonase-inhibiting protein in transgenic canola (*Brassica napus*) confers enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biotechnol Lett*. 38(6), 1021-1032.

Anexo A.

Productos de la secuenciación de los genes *chiA*, *chiB*, *chiC* y *cbp* de *S. marcescens* Bar86

- ***ChiA***

```
GGATCCATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAG
GCCGCCGCGCCGGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGCAACACCAAGTTCGCCATCGTTGAAGTTGACCAGGC
GGCTACCGCTTATAATAATTTGGTGAAGGTAATAAATGCCGCGATGTTTCCGTCTCCTGGAATTTTGAATG
GCGACGCGGGCAGCAGCGCCAAGATTTTATAAATGGTAAAGAGGCGTGGAGTGGTCTTCACGGATCTCC
GGTACGGCGAATTTTAAAGTGAATAAAGGCGGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGAATGCCGACGGCT
GCACCGCCAGTGACGCCACCGAAATTGTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGGCGCCGTGAAAGAGC
CGCTGCTGGAAAAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCTGGCAAAGTGGTCGGTCTATTTTCGTCGAGTGGGGC
GTTTACGGGCGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCGGCGCAAAACCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTTATCC
CGATCTGCGGCGGCAATGGCATCAACGACAGCCTGAAAGAGATTGAAGGCAGCTTCCAGGTGTTGCAGCGC
TCCTGCCAGGGCCGCGAGGACTTCAAAGTCTCGATCCACGATCCGTTTCGCGCGCTGCAAAAAGCGCAGAAG
GGCGTGACCGCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAGCAGGCGCATCC
TGACCTGAAAATCCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGCCGTTCTTCTTCATGGGCGACAAGGTGA
AGCGCGATCGTTTCGTCGGTTCGGTGAAGAGTTCCTGCAGACCTGGAAGTCTTCGACGGCGTGGATATCG
ACTGGGAGTTCGCGGGCGCAAAGGCGCAACCCTAACGGGCAGCCCGCAAGACGGGGAAACCTATGTGTT
GCTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTGCGGCGAAACCGGCCGCAAGTATGAGCTGACCT
CCGCCATCAGCGCCGTAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAACTCGATGGATCACA
TCTTCCTGATGAGCTACGACTTCTATGGCGCCTTCGATCTGAAGAACCTGGGGCATCAGACCGCGCTGAATGC
GCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACACCACGGTGAACGGCGTCAATGCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCA
AGCCGGGCAAGATCGTGGTCGGCACCGCCATGTATGGCCGCGGCTGGACCGGGTGAACGGCTACCAGAAC
AACATTCCGTTACCGGTACCGCCACTGGGCCGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGGACTACCGC
CAAATCGCCGCCAGTTCATGAGCGGCGAGTGGCAGTATACCTACGACGCCACGGCGGAAGCGCCTTACGT
GTTCAAACCTTCCACCGGCGATCTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCGGTGCAGGCCAAAGGCAAGTACGT
GCTGGATAAGCAGCTGGGCGGCCTGTTCTCCTGGGAGATCGACGCGGATAACGGCGATATTCTCAACAGCAT
GAACGCCAGCCTGGGCAATAGCGCCGGCGTTCAATAAGAGCTC
```

- *ChiB*

ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAGGCCGCC
GCGCCGGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGCAACACCNAGTTCGCCATCGTTGAAGTTGACCAGGCGGCTAC
CGCTTATAATAATTTGGTGAAGGTAAAAAATGCCGCCGATGTTTCCGTCTCCTGGAATTTATGGAATGGCGAC
GCGGGCACGACGGCCAAGATTTTATTAATGGTAAAGAGGCGTGGAGTGGTCCTTCNACCGGATCTTCCGGT
ACGGCGAATTTTAAAGTGAATAAAGGCGGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGCAATGCCGAGGCTGCA
CCGCCAGTGACGCCACCGAAATTGTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGGCGCCGTTGAAAGAGCCG
CTGCTGGAAAAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCTGGCAAAGTGGTCGGTTCTTATTTTCGTCGAGTGGGGC
GTTTACGGGCGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCGGCGCAAAACCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTTATCC
CGATCTGCGGCGCAATGGCATCAACGACAGCCTGAAAGAGATTGAAGGCAGCTTCCAGGTGTTGCAGCGC
TCCTGCCAGGGCCGCGAGGACTTCAAAGTCTCGATCCACGATGCCGTTCCGCCGCTGCAAAAAGCGCAGAA
CGGGCGTGAACGCCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACCTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAGCAGGCGCA
TCCTGACCTGAAAAATCCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGGACGCTGTCCGACCCGTTCTTCTTCATGGGCGACA
AGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTCGGTTCGGTGAAAAGAGTTCCTGCAGACCTGGAAGTTCCTCGACGGCGTG
GATATCGACTGGGAGTTCGCGGGCGGCAAAGGCGCAACCCTAACCTGGGCAGCCCGCAAGACGGGGAAAC
CTATGTGTTGCTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGCATCAGCTGTCGGCGGAAACCGGCCGCAAGTATG
AGCTGACCTCCGCCATCAGCGCCGTAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAACTCGA
TGATCACATCTTCTGATGAGCTACGACTTCTATGGCGCCTTCGATCTGAAGAACCTGGGGCATCAGACCGC
GCTGAATGCGCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACACCACGGTGAACGGCGTCAATGCGCTGCTGGCGC
AGGGCGTCAAGCCGGGCAAGATCGTGGTCCGACCCGCATGTATGGCCGCGGCTGGACCGGGGTGAACGG
CTACCAGAACAACATTCCGTTACCCGGTACCGCCACTGGGCCGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGT
GGACTACCGCAAATCGCCGGCCAGTTCATGAGCGGCGAGTGGCAGTATACCTACGACGCCACGGCGGAAG
CGCCTTACGTGTTCAAACCTTCCACCGGCGATCTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCGGTGCAGGCCAAAGG
CAAGTACGTGCTGGATAAGCAGCTGGGCGGCCTGTTCTCCTGGGAGATCGACGCGGATAACGGCGATATTCT
CAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAATAGCGCCGGCGTTCAATAA

- *ChiC*

ATGAGCACAAATAACACTATTAATGCCGTCGCCGCCGATGACGCGGCTATTATGCCGTCTATCGCCAATA
AAAAGATCCTGATGGGTTTCTGGCACAACCTGGGCCGCCGCGCCAGTGACGGTTATCAACAAGGCCAGT
TCGCCAATATGAATCTGACCGACATCCCCGCCGAGTACAACGTAGTGCCGTCGCCTTTATGAAAGGCCA
GGGCATCCCGACCTTCAAACCTTACAACCTGTCCGACGCCGAGTTTCGCCGCCAGGTGGGCGTGCTGAAC
AGCCAGGGCCGCGCGGTGCTGATCTCCCTCGGCCGCGCAGACGCGCATATCGAGCTGAAGACCGGCGA
CGAAGACAAACTGAAAGACGAGATTATTCGCCTGGTGAAATCTATGGCTTCGACGGCCTGGATATCGA
TCTGGAACAGGCGGCATCGGCCGCCAATAATAAAACCGTCTTGCCTGCGGCATTGAAAAAGTAAA
AGACCATTACGCCGCGCAGGGGAAAACTTTATTATCAGCATGGCGCCGGAATCCCGTATTTGCGCACC
AACGGCACCTATCTGGATTATATCAACGCCCTTGAAGGCTATTACGACTTTATTGCGCCGCAATATTATAA
CCAGGGCGGCGACGGTATTTGGGTGGATGAACTCAACGCCTGGATCACGCAGAATAACGACGCAATGA
AAGAGGACTTCCTACTATCTGACGGAAAGCCTGGTCACCGGCACCCGCGGCTATGCGAAAATCCCGG
CGGCGAAATTCGTTATCGGCCTGCCGAGCAACAACGATGCCGCCGCCACCGGCTACGTGATCGACAAAC
AGGCGGTGTATAACGCCTTCGCGCGTCTTGACGCCAAAACTGTGATCAAGGGCCTGATGACCTGGT
CGATCAACTGGGACAACGGCAAGAGCAAAGCCGGCGTGGCCTACAACCTGGGAATTCAAAACCCGCTAT
GCGCCGCTGATTCAGGGCGGCGTCACCCCGCCGCCGGAAGCCTAATGCGCCGACGGCGCTGACGGT
CGCCGAGCTGGGCGCCACCTCGCTGAAACTGAGCTGGGCCGCCGCCACCGGCGCCTCCCCGATCGCCAG
TTACACCGTCTACCGCAACGGCAACCCGACCGGCCAGACCGCCGACCTGTGCTGACCGACAGCGGCCT
GACCCCGGTACCCAGTACAGCTACTTCGTTACCGCAACCGACAGCCAGGGCAATACCTCGCTGCCGAGC
AGCGCGCTGGCGGTCAAACCCGCCAACGACGGCACGCCGCCGATCCGGGTACGCCCGAGTGGCAGAA
CACCACAGCTACAAGGCTGGCGACGTGGTGAGCTATAAAGGCAAGAAATACACCTGTATCCAGGCGCAC
ACCTCCAACGCCGGCTGGACGCCGGACGCCGCTTTACCCTGTGGCAGCTCATCGCCTAA

- *cbp*

CACGGTTATGTGAATCGCCGGCCAGCCGCGCCTATCAGTGCAAACCTGCAGCTCAACACGCAGTGCGGCA
GCGTGACGTACGAACCGCAGAGCGTCAAGGCCTGAAAGGCTTCCACAGGCCGCCCCGGCTGACGGCC
ACATCGCCAGCGCCGACAAGTCCACCTTCTTGAACCTGGATCAGCAAACGCCGACGCGCTGGAACAAGCT
CAACCTGAAAACCGGCCGAACTCCTTTACCTGGAAGCTGACCGCCGTCACAGCACCACCAGCTGGCGC
TATTTATCACCAAGCCGAACTGGGACGCTTCGACGCCGCTGACCCGCGCTTCTTTGACCTGACGCCGTT
CTGCCAGTTCAACGACGGCGGCGCCATCCCTGCCGCACAGGTCACCCACCAGTGCAACATACCGGCAGAT
CGCAGCGGTTGACAGTATCCTTGCCGTGTGGGACATAGCCGACACCGCCAACGCCTTCTATCAGGCGA
TCGACGTCAACCTGAGCAAATAA

Anexo B.

Esquema de inmunización empleado en la producción de Anti-ChiC.

[Stock] (mg/ml)	Semana	µg/conejo	10% extra	total	*2 conejos	µl de stock	PBS (µl)	Adyuvante	µl Ady	Fecha	Sangrías
0.1	1	50	5	55	110	110.00	1090	CFA	1200		Preimmune
.281	2	50	10	60	120	120.00	1080	IFA	1200		-
0.281	3	100	20	120	240	240.00	960	ALUM	1200		-
0.281	4	100	20	120	240	240.00	960	IFA	1200		1ra
0.281	5	125	25	150	300	300.00	900	ALUM	1200		-
0.384	6	125	25	150	300	300.00	900	IFA	1200		2da
0.384	7	150	30	180	360	360.00	840	ALUM	1200		3ra
0.384	8	150	30	180	360	360.00	840	IFA	1200		4ta
0.384	9	250	50	300	600	600.00	600	ALUM	1200		5ta
0.387	10	250	50	300	600	600.00	600	ALUM	1200		6ta

Ady: Adyuvante

CFA: Adyuvante completo de Freund

IFA: Adyuvante incompleto de Freund

Alu: Alúmina

Anexo C.

Artículo generado durante el desarrollo de esta tesis.



Article

Enhanced Tolerance against a Fungal Pathogen and Insect Resistance in Transgenic Tobacco Plants Overexpressing an Endochitinase Gene from *Serratia marcescens*

Samantha Sarai Navarro-González ¹, José Augusto Ramírez-Trujillo ¹, Guadalupe Peña-Chora ², Paul Gaytán ³, Abigail Roldán-Salgado ³, Gerardo Corzo ³ , Laura Patricia Lina-García ¹, Víctor Manuel Hernández-Velázquez ¹ and Ramón Suárez-Rodríguez ^{1,*}

¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

² Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

* Correspondence: rsuarez@uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7057

Received: 17 May 2019; Accepted: 14 July 2019; Published: 16 July 2019



Abstract: In this study we cloned a chitinase gene (*SmchiC*), from *Serratia marcescens* isolated from the corpse of a *Diatraea magnifactella* lepidopteran, which is an important sugarcane pest. The chitinase gene *SmchiC* amplified from the *S. marcescens* genome was cloned into the transformation vector p2X35SChiC and used to transform tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR1). The resistance of these transgenic plants to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* and to the pest *Spodoptera frugiperda* was evaluated: both the activity of chitinase as well as the resistance against *B. cinerea* and *S. frugiperda* was significantly higher in transgenic plants compared to the wild-type.

Keywords: *Serratia marcescens*; bacterial chitinase; antifungal activity; transgenic plants; *Spodoptera frugiperda*

1. Introduction

Productivity of crops grown for human consumption is at risk due to the incidence of pathogens and pests. Crop losses due to these harmful organisms can be substantial, and they may be prevented, or reduced, by crop protection measures [1]. Food supply for the population of billions of people depends on the effective protection of crops and animals from pests. The chemical control of pests was efficacious and attractive during the forties and fifties of the last century. However, the negative effects of the use of chemicals quickly became evident because of their adverse effects and the accumulation in soil, water, air, agricultural products and in the body fat of animals. In addition, the development of resistance in target organisms makes it necessary to search for more selective and environmentally acceptable agents for pest control [2,3]. Due to the importance of the chitinolytic enzymes in the growth and development of insects, nematodes and fungi, they are of note with respect to their development as biopesticides or defense proteins in transgenic plants and pest control agents. In this context, glycosyl hydrolase enzymes have the ability to hydrolyze the unbranched polymer of chitin comprised of β -1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc), the second most abundant polymer in nature, after cellulose [4], GlcNAc is widely distributed in nature in the outer skeleton of insects and in internal structures, as well as in fungi, yeasts, algae, crabs, shrimps, and plants [5].

Plant chitinases are classified as pathogenesis-related proteins (PR) as they are induced after biotic or abiotic stresses [6,7]. However, one of the most widely biotechnology strategies used for biological control is to overexpress genes such chitinases and glucanases from various sources in transgenic plants [8,9], so it is important to study its applicability in the improvement of plant health [10,11] as an alternative to the use of chemicals. Such enzymes are thought to play a dual role, both by inhibiting fungal growth by cell wall digestion and by releasing pathogen-borne elicitors that induce further defense reactions in the host [7,12]. Transgenic plants overexpressing chitinases from different sources have demonstrated enhanced levels of resistance to fungal infection, and also have delayed disease symptoms when challenged with fungal pathogens [13–16].

One of the first studies using hydrolytic enzymes was a bean chitinase, which inhibited the growth of the fungal pathogen *Trichoderma viride* [17]. Furthermore, transgenic tobacco seedlings constitutively expressing a bean chitinase gene under control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter showed that seedlings had an increased ability to survive in soil infested with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Here, susceptibility to infection ranged from 22.7 to 37.1% in transformed plants in comparison to untransformed plants with 53% mortality [18]. Tobacco plants overexpressing a chitinase gene *EuCHIT2* from *Eucommia ulmoides* showed circumstantial evidence that this hydrolytic enzyme increased the resistance against *Erysiphe cichoracearum* DC [19].

In addition to fungal control, to minimize the adverse effects of pesticides, different subspecies of *Bacillus thuringiensis* are the most well-known microbial entomopathogens that produce insecticidal proteins which specifically targets insect pests, particularly lepidoptera [20,21]. Although these strategies have reduced adverse effects compared to chemical insecticides, the development of resistance to the insecticidal proteins has raised concerns [22].

Chitinolytic bacteria have been correlated with insect biocontrol [23] and considered as a source of useful bioactive molecules and genes for this application [24]. Insect chitinases play a critical role in insect growth and development, and their overexpression at appropriate times could disrupt the cuticle and/or gut physiology in many insect species leading to negative effects and even death [25]. In fact, the usage of Gram negative bacterial strains like *S. marcescens* has been observed to be a great biocontrol agent against *Spodoptera litura* at different developmental stages [24,26], due to its ability to produce different chitinolytic enzymes [27]. In this way, the search for chitinolytic enzymes produced in transgenic plants with insecticidal activity is of scientific interest. For example, the expression of an insect chitinase from the cotton leaf worm, *S. littoralis*, in maize plants improved its tolerance against insects [28]. Studies of chitinase A (ChiA) protein from *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) demonstrated the ultimate liquefaction of infected host larvae [29].

In the present work we developed plants with stress tolerance by evaluation of transgenic tobacco lines harboring endochitinase *chiC* gene from *S. marcescens* (*SmChiC*) for resistance to the gray mold *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) and to the insect pest *S. frugiperda*. Three transgenic tobacco lines expressing constitutively endochitinase were assayed for infection of plants, antifungal inhibition on crude protein extracts, and by insect feeding toxicity assays. The results included in this study demonstrate that expression of this endochitinase gene enhanced tolerance to both the fungus and insect, compared with non-transformed plants.

2. Results

2.1. Bacteria Strain Identification and Phylogenetic Analysis

Identification of the strain isolate Bar86 was based on its 16S rDNA gene sequence, and it showing 99% identity with other *S. marcescens* in the existing database (Figure 1a). Figure 1b shows the results of a phylogenetic analysis, which reveals that *S. marcescens* Bar86 gene *SmchiC* is clustered within the bacteria chitinase group, and it has a closer relationship with *S. marcescens*. Meanwhile, the result of the phylogenetic analysis suggested that all chitinases evolved from the same ancestor, and that *SmchiC* shared a common evolutionary origin with chitinases from other bacteria (Figure 1b).

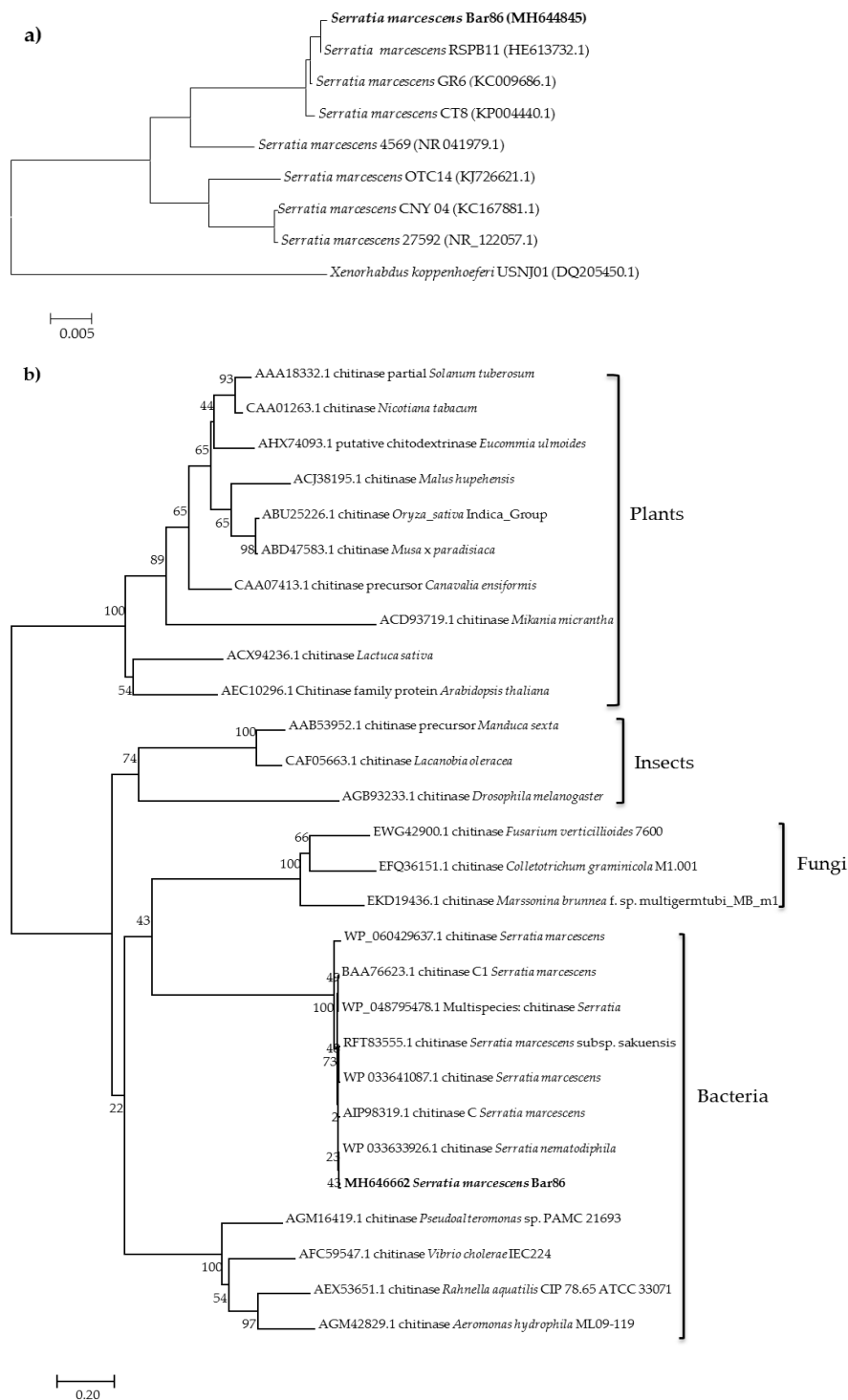


Figure 1. Phylogenetic analysis. (a) Relationships showing the relatedness of 16S rDNA between the new isolate of *Serratia marcescens* Bar86 and selected reference isolates derived from the GenBank database. (b) Phylogenetic tree of deduced SmChiC amino acid sequences with chitinases from plants, insects, fungi and bacteria.

2.2. Cloning of Chitinase Genes

The *SmchiC* gene was amplified from *S. marcescens* Bar86 genomic DNA using specific PCR primers based on the coding sequences of known *S. marcescens* ChiC proteins. PCR amplification resulted in a

product of 1443 bp, correlating with the size of coding sequences of known *S. marcescens* chitinolytic proteins in the current GenBank database.

2.3. Tobacco Transformation and Molecular Analysis

After transformation, which was mediated by the agrobacterium-method [30], from 36 kanamycin-resistant primary transformants 11 were positive for the amplification of *SmchiC* gene. All of them showed the amplification expected size of 1443 bp (Figure 2a) confirming transgenic events, and also the 763 bp PCR fragment of the selectable marker conferring resistance to kanamycin corresponding to *nptII* gene was corroborated (Figure 2b). Furthermore, RT-PCR analysis confirmed that the *SmchiC* gene was transcribed, and three transgenic lines were selected with low (3.1), medium (12.4) and high (5.5) expression levels, respectively (Figure 2c). The actin gene was used as housekeeping gene control (Figure 2d).

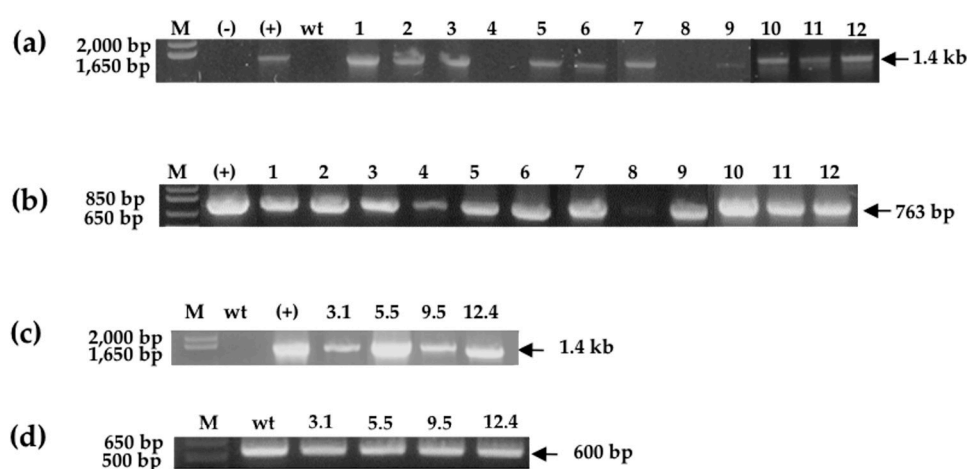


Figure 2. Molecular analysis of tobacco transgenic plants. (a,b) Primary transformant plants were analyzed for the presence of *SmchiC* and *nptII* genes by PCR amplification. Lane 1–12; transgenic tobacco lines, (-) water amplification control; (+) positive control (p2x35S*ChiC*) vector; WT wild-type plant (negative control); M, molecular markers. (c,d) chitinase and actin expression by RT-PCR in homozygous transgenic plants. Transformed tobacco lines, namely lines 3.1, 5.5, 9.5 and 12.4; wt wild-type plant (negative control); M, molecular marker.

2.4. Western Blot Analysis

Detection of *ChiC* protein in tobacco was carried out by Western blot, using a polyclonal antibody against *SmChiC*. Immunoblots showed the presence of a prominent 56 kDa band corresponding to the size of the native bacterial chitinase, indicating that the transgene was expressed constitutively in the heterologous tobacco system. Endogenous chitinases were not detected by the antibody (wt, negative control). Lines of the homozygous progeny showed the highest protein expression (5.5 and 12.4 lines); line 3.1 was hint low (Figure 3a,b).

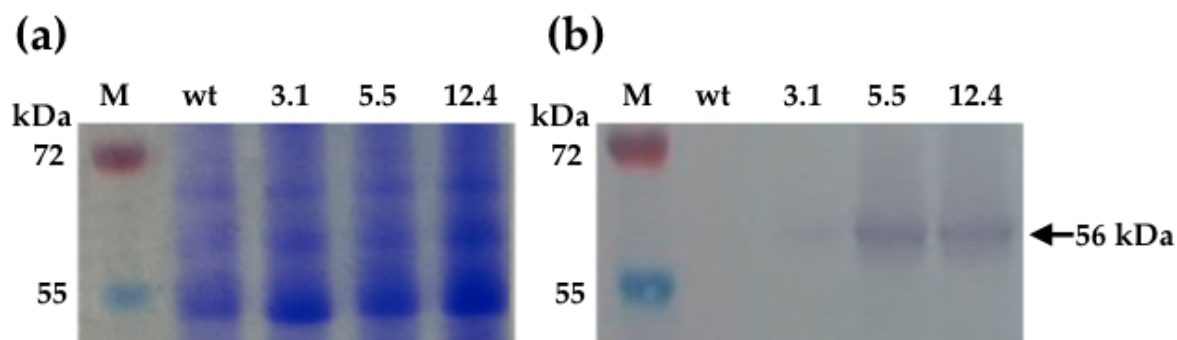


Figure 3. Detection of SmChiC protein in tobacco leaf extracts subjected to immunoblot analysis by Western blot. (a) SDS-PAGE analysis of crude leaf extracts, homozygous transgenic tobacco lines 3.1, 5.5 and 12.4; wt wild-type plant (negative control); M, protein molecular weight marker. (b) Western blot assay of crude leaf extracts revealing a band of 56 kDa corresponding to SmChiC endochitinase.

2.5. Endochitinase Activity

The chitinase activity in the leaves of transgenic and control plants was significantly higher in the three different transgenic tobacco lines (3.1, 5.5, and 12.4): but the lines 5.5 and 12.4 showed the highest activity (Figure 4).

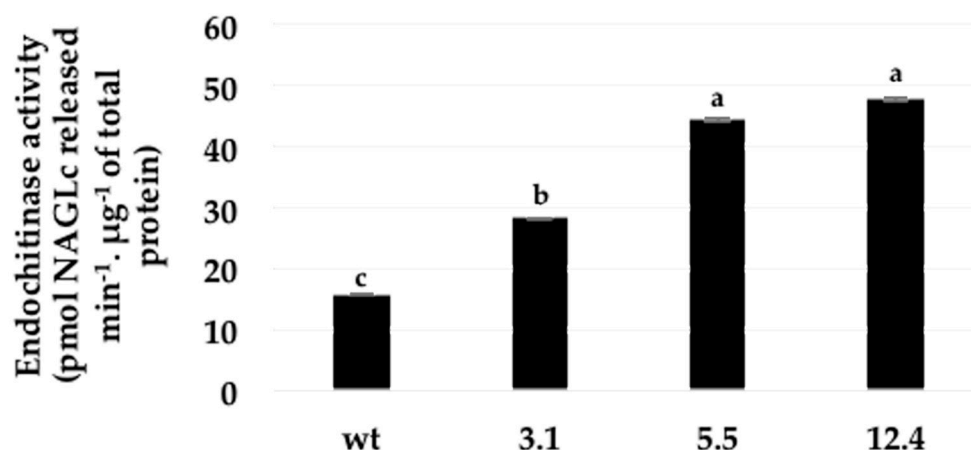


Figure 4. Endochitinase activity in crude leaves extracts of three different transgenic lines and untransformed (wt) plant. Error bars indicate standard deviation of means (SD). Within each frame different letters indicate statistically significant differences among transgenic lines ($p < 0.0001$), $n = 4$.

2.6. Antifungal Inhibition Activity Assays on Crude Protein Extracts

In vitro assays to quantitatively establish the fungal inhibition of the bacterial chitinase present in the leaf extracts of the transgenic lines were conducted on crude protein extracts from such three lines that showed expression of SmChiC at different levels (Figure 3b). The transgenic line 3.1 presented a moderately growth inhibition of 52.8 % against *B. cinerea*, whereas the other two lines 12.4 and 5.5 exhibited growth inhibitions of 65.1% and 75.4%, respectively against the same *B. cinerea* spores (Figure 5a).

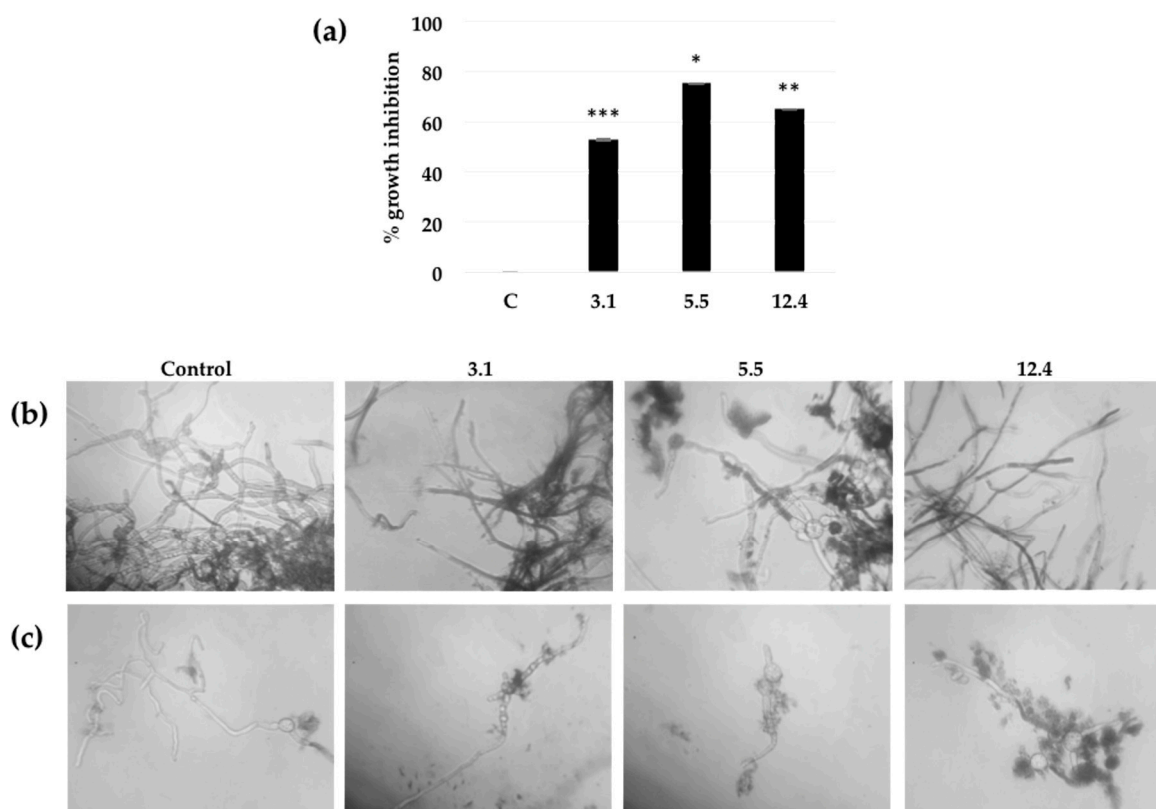


Figure 5. The effect of chitinase SmChiC protein in leaf extracts from homozygous transgenic tobacco plants over *B. cinerea* growth and spore germination. (a) After 48 h of incubation, percentage of fungal growth inhibition is defined as $100 \times \frac{\text{corrected } A_{595} \text{ of the control plant} - \text{corrected } A_{595} \text{ of the sample}}{\text{corrected } A_{595} \text{ of the control plant}}$. Each bar value represents the mean \pm SD of triplicate experiments (Student's *t* test; ***, $p = 0.0002$; *, 0.0165; **, 0.0053 for each line respectively versus control). (b) Microscopic analyses of the appearance of the *B. cinerea* hyphae after incubation for 48 h in presence of different plant crude extract. Magnification target (40 \times). (c) Microscopic analyses of the appearance of *B. cinerea* single spore hyphae after incubation for 48 h in presence of different plant crude extract. Magnification 40 \times .

The effect of the plant crude protein extracts on spore germination and hyphal development of *B. cinerea*, was microscopically observed after 48 h of incubation. Structural and physiological damage within the hyphae was observed when using the plant crude protein extracts of lines 12.4 and 5.5, which showed highest growth inhibition. The tobacco line 3.1 which had fairly low percentages of growth inhibition (52.8%), also showed less formation of fungal biomass compared to the effect of the leaf extract from control plants (non-transformed), where the germination and growth of hyphae is normal (Figure 5b,c).

2.7. Botrytis Cinerea Resistance Assays on Detached Leaves

Resistance against the fungal pathogen *B. cinerea*, was evaluated in homozygous *N. tabacum* plants using a detached leaf test. An agar disc (0.2 cm diameter) containing mycelia of *B. cinerea*, was placed on the adaxial surface of leaves. Seven days after inoculation, symptoms on the three transgenic lines (3.1, 5.5, and 12.4) included mild chlorosis or a hypersensitive-like necrosis. In contrast, leaves from untransformed plants showed extensive areas of necrosis signs surrounded by chlorotic halos (Figure 6a). The lesion areas were reduced in the transgenic plants, when compared to the wild type line. Data indicate that transgenic plants are less susceptible to *B. cinerea* (Figure 6b).

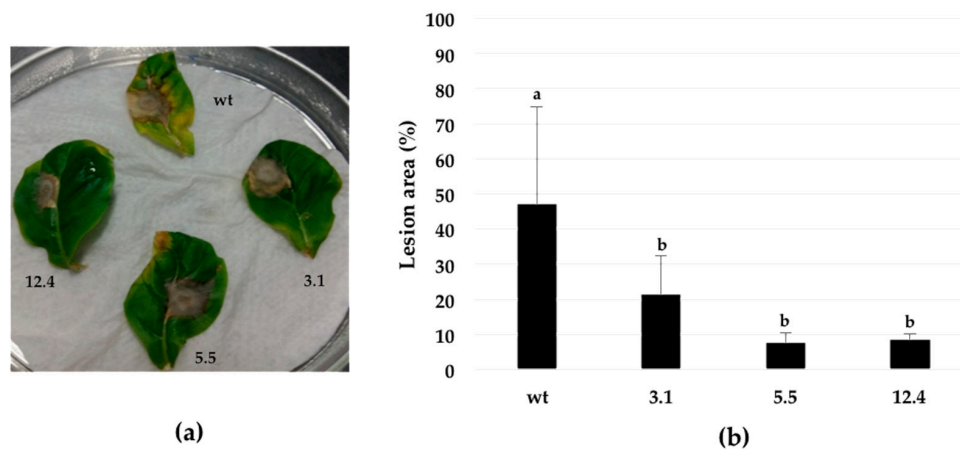


Figure 6. Resistance assay against phytopathogenic fungus *B. cinerea*. (a) Phenotype of transgenic plants after inoculation with mycelium of *B. cinerea* during 7 days. (b) Percentage of area leaf infection in control and transformed tobacco lines. Leaf damage by *B. cinerea* infection was significantly different from the control with a value at $p < 0.0001$. Different letters indicate statistically significant differences. Error bars indicate standard deviation of means (SD). Three independent replicates were performed for each experiment.

2.8. Insect Toxicity Assay

Estimation of the toxicity of transgenic plants to insects was carried using a plant-feeding assay. Neonate larvae of fall armyworm *S. frugiperda* were fed in the laboratory with three different homozygous transgenic lines and non-transformed tobacco plant was used as a control (Figure 7). A significant difference on insect mortality were observed since the first day and until the end of the experiment (day 7), transgenic lines significantly increased mortality rate in neonate larvae [12.4 transgenic line = 90% (27 of 30 larvae died), 5.5 transgenic line 83% (25 of 30 larvae died), 3.1 transgenic lines 73% (22 of 30 died) vs. control 50% (15 of 30 larvae died)]. Most of the larvae that fed on transgenic leaves for 7 d died (Figure 7).

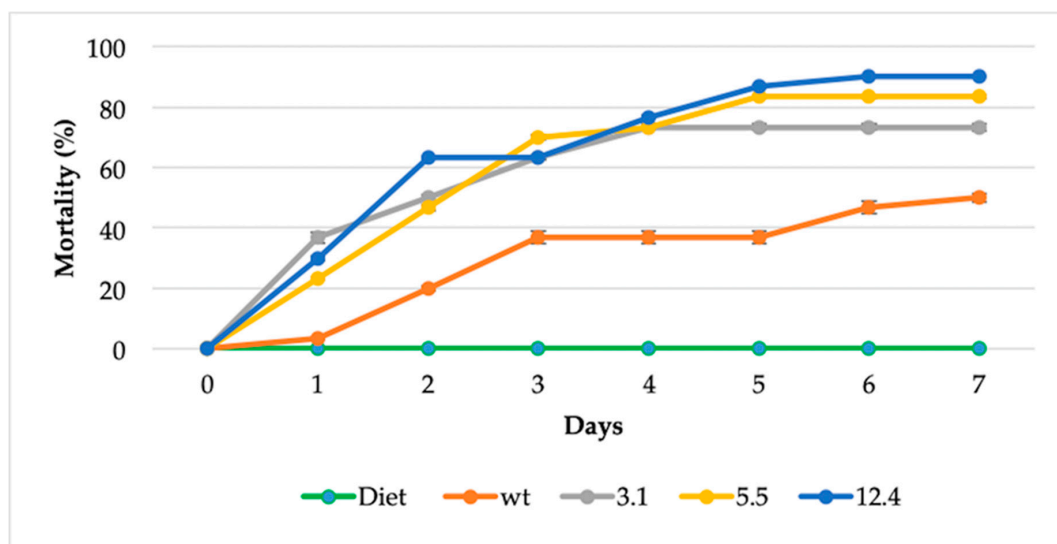


Figure 7. Toxicity of transgenic plants to *S. frugiperda* larvae on a plant-feeding assay. The data shown represent the mean of three independent experiments, and error bars indicate standard deviation of means (SD). Each experimental group was composed of 10 larvae and larvae mortality is reported as a percentage of the initial number of larvae. Diet is food for rearing *S. frugiperda*. The survival curve was significantly different from transgenic lines versus non-transformed plant (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.0001$).

3. Discussion

Plant chitinases play an integral role in the innate plant resistance to pest and diseases [4]. These enzymes form part of the PR proteins in plants and have been extensively used in modern biotechnology [18,31,32] to evaluate their potential to increase plant's resistance through genetic transformation technologies [13,33–35]. Chitinolytic bacteria of the genus *Serratia* are well known for their chitinase production [36,37]. Their ability to produce these hydrolytic enzymes could be considered an important virulence factor for contributing significantly as entomopathogen [26] as an effective biocontrol agent [38,39].

In this study, we have evaluated a bacterial endochitinase, which to the best of our knowledge has not been studied before in transgenic plants. Here, the *SmchiC* gene from *S. marcescens* was PCR-amplified from genomic DNA and cloned into a plant expression vector conferring constitutive expression in transformed tobacco plants.

Eleven transgenic lines F₀ were obtained with normal growth, which did not show differences compared with control tobacco plants (data not shown). This result is in agreement with earlier reports where expression of endochitinase did not adversely affect plants [7,13]. Plant selection continued until homozygous generation was reached and confirmed that they have integrated the transgene into their genome. RT-PCR analyses allowed the selection of low, medium and high transcript expression. These homozygous plants were used for further studies and was verified that the expression level is related to plant tolerance in different bioassays. The transcripts yielded active bacteria chitinase proteins that exhibited significant increases in endochitinase activities in the three different transgenic lines when compared with untransformed controls (Figure 4); these events have been already observed with chitinase-encoding genes by improving plant defense [13,40]. Here, transgenic lines showed less sensitivity to *B. cinerea* infection, as observed in transgenic cotton plants [41] and tobacco plants [7] expressing fungal chitinases.

In vitro assays proved that the antifungal activity of the transgenic lines lead to growth inhibition (52–75%) in all three transgenic lines (Figure 5), similar results have been previously observed were tobacco plants transformed with a *S. cerevisiae* chitinase showed strong antifungal activity, leading to fungal growth inhibitions of 25–70% in various transgenic lines [42]. *In planta* assays demonstrated that leaves of transgenic lines infected with *B. cinerea* were capable of withstanding the fungal infection by decreasing disease susceptibility according to lesion measurements and chlorosis appearance, unlike untransformed control plants (Figure 6). According to our results, the improved tolerance against the fungal pathogen observed in this study is not a unique consequence of their chitinolytic activity. Chitin residues of cell wall or apoplastic glycoprotein-derived oligomers released by the action of chitinase act as the elicitor molecules and induce the plant defense mechanism, which include increased lignifications, phytoalexin synthesis, generation of reactive oxygen species and expression of PR-proteins [7,43]. Although the biosynthetic origin of these oligomers has not been well established, there is some evidence that they might derive from partial hydrolysis of apoplastic N-linked glycoproteins [44,45].

Finally, feeding assays were performed to evaluate the insecticidal potential of the transgenic plants expressing a bacterial chitinase towards neonate larvae of *S. frugiperda* and enhanced mortality was observed within the first day (Figure 7). Transgenic lines showed a significant difference on insect mortality of 90% by the seventh day. Other studies have shown that overexpressing a chitinase from *S. littoralis* showed a larvae mortality of 63–70% [28]. The entomopathogenic activity of *S. marcescens* (strain SEN) was comparable to that of *B. thuringiensis* treated larvae, which showed insecticidal activity against all the developmental stages of *S. litura* larvae [26].

These bioassays have demonstrated that transgenic plants overexpressing bacterial chitinase, have the capability to contend against fungal infection most likely due to its capacity to degrade the linear polymer of chitin (Figure 4) consisting of β -1, 4 N-acetylglucosamine and in fungi, by affecting structural parts like mycelia (Figure 6) and in case of insects over integral parts like cuticle and peritrophic matrix (PM). In the latter, probably by cleaving chitin present in the peritrophic membrane

of the insect gut causing perforations, leading to disease and subsequent death of the infected larvae (Figure 7) [46]. Hence transgenic tobacco plants carrying the endochitinase *SmchiC* gene in their genome were protected from pathogenic fungi *B. cinerea* and from the pest insect *S. frugiperda*.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

A *S. marcescens* isolate was kindly provided by Dr. Guadalupe Peña-Chora, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Bacteria were isolated from a corpse of a larvae of the sugar cane borer *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Pieridae) collected in the field.

4.2. Screening of Bacterial Isolate for Chitinolytic Activity

Chitinolytic activity of the isolated bacteria was determined using nutrient agar medium supplemented with colloidal chitin (0.05%) [47]. Luria Broth (LB; Q-Biogene, Carlsbad, CA, USA) was used for cultivation of the strain. *S. marcescens* culture was incubated by shaking (200 rpm) at 30 °C overnight and 4 µL of the culture was dropped onto a LB agar plate and after five days of incubation at 30 °C, colonies showed halo zones and maintained on nutrient agar plates.

4.3. Bacterial Identification

Genomic DNA was extracted from the selected bacterial isolate Bar86 using PUREGENE® DNA Purification Kit. For bacterial identification, 16S rDNA was amplified using the universal bacterial primers 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') [48] and L1401 (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') [49]. Amplification was performed under the following conditions: one cycle at 95 °C, 5 min; 37 cycles of 95 °C, 50 s; 59 °C, 50 s; 72 °C, 1 min; and one cycle at 72 °C, 10 min. PCR products were purified and sequenced at the DNA core facility of the Institute of Biotechnology, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

The nucleotide sequences were aligned using CLUSTALW, and phylogenetic inferences for 16S rDNA and chitinases from other organisms, including plants, bacteria, fungi, and insects obtained using the maximum-likelihood method within the MEGA6 software with the neighbor-joining method. The sequence of the 16S rDNA gene was deposited in the GenBank with the accession number MH644845.

4.4. Chitinase Gene Isolation

SmchiC gene coding for the 55-kDa endochitinase was amplified by PCR using the primer pair ChiC-F (5' GGATCC ATG AGC ACA AAT AAC ACT AT 3', *Bam*HI site underlined) and ChiC-R (5' GAGCTC TTA GGC GAT GAG CTG CCA CAG 3', *Sac*I site underlined), designed based on consensus sequences derived from *S. marcescens* chitinase *chiC* nucleotide sequences available in GenBank. Amplification was performed under the following conditions: one cycle at 95 °C, 5 min; 28 cycles of 95 °C/45 s; 58 °C/45 s; 72 °C/60 s and one cycle at 72 °C/3 min. PCR product was cloned into pTZ57R/T cloning plasmid, thus generating the intermediate vector pTZchiC. The orientation within the plasmid and open reading frame integrity of the bacterial chitinase gene were confirmed by DNA sequencing, by means of automatic DNA sequencing using both M13 primers. The sequence was deposited in the GenBank with the accession number MH646662.

4.5. Tobacco Transformations

Transformation vector p2x35SchiC was constructed in the following manner. The *Bam*HI-*Sac*I fragment (1.6 Kb) from pTZchiC containing *chiC* gene was excised and cloned into the same sites of p2x35SNOS, between the double CaMV 35S promoter to obtain the plant transformant construct

named p2x35SchiC. This vector was mobilized into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 by the electroporation method.

Nicotiana tabacum cv. Petit Havana was used for the experiments. Transformation of *N. tabacum* was done according to the previously reported method [30]. Disc leaf explants of 7 mm size from in vitro grown shoot cultures of *N. tabacum* was used for transformation using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring the recombinated plasmid p2x35SchiC. After co-culture, explants were transferred to Murashige and Skoog's [50] basal medium supplemented with kanamycin (100 mg L⁻¹) for selection of transgenic shoots and 500 mg L⁻¹ of cefotaxime to eliminate the *Agrobacterium*. Putative Kanamycin-resistant transformants with well-developed roots were transferred to pots containing vermiculite and grown under greenhouse conditions. The presence and expression of the transgenes in primary transformants (T0), was verified by PCR analysis. Transgenic T3 homozygous plants harboring single copy integrations of transgenes were used for biotic functional analysis.

4.6. Molecular Analyses of Tobacco Transgenic Lines

To confirm, the transgene presence and integration DNA isolation from putative transgenic plants was achieved using the hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol. Leaf material (100 mg) was ground to a fine paste with 500 µL of CTAB buffer (Tris 1 M pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0, NaCl 5 M, PVP 40) using a pestle. Plant extract mixture was incubated for 15 min at 55 °C and after incubation, the sample was centrifuged at 12,000× g for 5 min to spin down cell debris. To the supernatant was added 250 µL of chloroform:isoamyl alcohol (24:1), followed by mixing by inversion and centrifugation at 13,000 rpm for 1 min. The aqueous phase was transferred into a new centrifuge tube (contains the DNA) and diluted with 50 µL of 7.5 M ammonium acetate followed by the addition of 500 µL of ice-cold absolute ethanol. The mixture was centrifuged (13,000 rpm for 1 min) and the pellet was resuspended in 100 µL of DNase-free water.

To confirm the transgene presence and integration PCR amplification analysis for the *NPTII* gene was conducted using the primers nptII_F (5'-GAACAAGATGGATTGCACGC-3') and nptII_R (5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3') with an expected band size of 763 bp (35 cycles; 35 s at 94 °C; 5 min 94 °C; 45 s 57 °C and the primers used to amplify the SmchiC_F (5'GGATCC ATG AGC ACA AAT AAC ACT AT 3') and chiC_R (5'GAGCTC TTA GGC GAT GAG CTG CCA CAG 3'), with an expected band size of 1.4 kb (35 cycles; 3 min at 95 °C; 45 s 95 °C; 45 s 58 °C).

Transgenic lines harboring the transgene were assayed by RT-PCR to qualitatively see the expression at mRNA level. A total RNA extraction was performed with TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's protocol.

4.7. Progeny Segregation

The primary transgenic lines were grown and self-pollinated in a greenhouse. T2 seeds of each line were surface sterilized and placed on Petri plates containing MS salts media (half-strength), supplemented with kanamycin (100 mg L⁻¹). Seeds were germinated at 24 °C under a 16 × 8 h photoperiod for 14 d in a growth chamber. Seedlings were scored for their resistance to kanamycin and segregation was analyzed. Several T2 lines with single gene segregation for kanamycin resistance were grown in a greenhouse for flowering and their seeds were analyzed for segregation of the marker. Those lines that showed 100% resistance to kanamycin were considered homozygous.

4.8. Preparation of Crude Protein Extracts from Transgenic Tobacco Lines

To extract proteins, 3 g of leaf tissue were ground with extraction buffer which consisted of Trizma base 50 mM, magnesium acetate 10 mM, glycerol 10%, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 mM, and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM. The samples were centrifuged at 7500 rpm -4 °C and the supernatant was precipitated with ice cold acetone. The samples were centrifuged to remove solvent and total proteins, pellets were dissolved in 25 mM sodium citrate (pH 6.0) buffer for the antifungal activity assay, or PBS buffer for the endochitinase activity assay and western blot assay.

4.9. Western Blotting

Total protein extract (40 µg) was electrophoresed on 12% polyacrylamide gel and transferred to cellulose membranes, using a trans-blot wet transfer cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) overnight at 30 V. After protein blotting, the membrane was blocked by soaking in milk-based blocking buffer (5% powdered milk in 0.5% Tween 20) for 2 h at room temperature and then probed overnight at 4 °C temperature with the anti SmChiC antibody (1:2000 dilution in blocking buffer) as a primary antiserum. The membrane washed three times with TBST to remove the antibody excess, and then the immune-reactive protein bands were visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit (IgG-H+L) as a secondary antibody (5:10,000 dilution in blocking buffer) for 1 h. Three final TBST washes to remove excess antibodies were done and then equilibrated with APB buffer for 15 min. The alkaline phosphatase activity was determined by incubating the membrane at room temperature into an equal volume of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT).

4.10. Endochitinase Assay

The dinitrosalicylic acid (DNSA) method was used to determine the chitinolytic activity [51] by measuring the concentration of N-acetylglucosamine released [52]. Reaction mixtures contained 0.5 mL of 1.5% colloidal chitin (in 10 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.0) and 0.5 mL of enzyme sample. The mixture was incubated at 50 °C for 1 h. The reaction was stopped by placing the tubes in a boiling water bath for 5 min. After cooling, the reaction mixture was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Then, 0.5 mL of the supernatant and 0.5 mL DNSA reagent were mixed together and incubated in a boiling water bath for additional 10 min. The absorption of the test sample was measured at 540 nm in a UV spectrophotometer (6405 UV/Vis, Jenway, UK) along with substrate and enzyme blanks. All measurements were performed for triplicate in each sample. One unit of chitinolytic activity was defined as the amount of enzyme required to produce 1 µmol N-acetylglucosamine per minute at 50 °C. The protein concentration was determined by the Bradford method [53] using bovine serum albumin as standard.

4.11. *Botrytis cinerea* Spore Harvest for Antifungal Inhibition Assays

B. cinerea (B0510) was cultured on potato dextrose agar (PDA) medium (23 °C; dark) until sporulation occurred. Spores were prepared by a method modified from [54] by flooding the Petri dishes with sterile water and 0.05% of Tween 20. Plates were scraped to detach the conidia and the suspensions filtered through a funnel filled with cotton. Spore number was counted with a haemocytometer and adjusted to 1 × 10⁵ spores/mL and incubated on potato dextrose media (PD) for one hour.

4.12. Assays of Antifungal Inhibition Activity on Crude Protein Extracts

The inhibition assay was adapted from a previously reported method [55] and used to quantitatively determine the antifungal effect of the crude proteins in the leaf extracts from the transgenic lines on *B. cinerea* spore germination and fungal growth. The assays were performed in microtubes in a final volume of 1 mL. The crude protein samples 5 mg/mL constituted of 500 µL and 500 µL of potato dextrose broth (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) and *Botrytis* spores to a concentration of 4 × 10⁴ spores per mL. As a background control, 500 µL of 25 mM sodium citrate (pH 5.0) buffer was added to 500 µL of spore-containing PDB. The plates were incubated at 25 °C for 48 h. The absorbance at 595 nm (A) of the samples was determined every 24 h with a Jenway Spectrophotometer (6405 UV/Vis), starting at 0 h. Time zero values were used to normalize the 24 and 48 h values. These values are referred to as corrected A₅₉₅ values. Growth inhibition is defined as 100× the ratio of the corrected absorbance (A₅₉₅) of the control plant minus the corrected A₅₉₅ of the sample over the corrected A₅₉₅ of the control plant. To determine the condition of the *B. cinerea* hyphae, after 48 h of incubation, 10 µL of each sample was microscopically analyzed.

4.13. Resistance Assays of *Botrytis cinerea* on Detached Leaves

For pathogenicity tests, cultures of *B. cinerea* (B0510) were cultured on PDA medium (23 °C; dark). When the fungal mycelia reached the edge of the plate, a 0.5 cm diameter agar plug with mycelium was removed from a region close to the edge using a cork borer and used for inoculations. Healthy and young leaves were collected of 4-week-old tobacco plants and placed on wet paper towels in Petri dishes. One agar plug was placed on each leaf containing *B. cinerea* mycelium were placed directly on the adaxial side of the leaves and incubated in the dark. After one-week leaves were photographed and the percentage of leaf area with necrosis was determined using ImageJ.

4.14. Bioassays for Toxicity to Insects

Resistance assays against lepidoptera *S. frugiperda* was performed with *SmChiC*-overexpressing T3 plants using detached leaf method. In this method, detached leaves from control and transgenic lines were randomly selected and placed on moist paper into petri-plate. Neonate larvae were individually laid onto detached leaves of each transgenic and control plants for 7 d at at 25 °C under 12-12 light/dark regime. Bioassays were repeated three times using 10 larvae for each treatment. Mortality was scored daily.

4.15. Analysis

The results are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance test with test by Tukey analysis or Student's *t* test when appropriate.

5. Conclusions

In the present study we have demonstrated that the endochitinase *SmChiC* protein normally found in *S. marcescens* Bar86 and overexpressed in transgenic plants, enhanced the tolerance against *B. cinerea* infection and can play a crucial role in defense against herbivorous insects such as *S. frugiperda* as an oral insecticide. The events presumably occur because of the augmented chitinase activities presented in tobacco plants, which hydrolyzes β -1,4 bonds of the structural chitin present in fungi and herbivorous insects.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: J.A.R.-T. and R.S.-R. Performed the experiments: S.S.N.-G., J.A.R.-T., A.R.-S. and R.S.-R. Analyzed the data: S.S.N.-G., J.A.R.-T. and R.S.-R. Contributed reagents/materials/analysis tools: G.P.-C., P.G., G.C., L.P.L.-G., V.M.H.-V., J.A.R.-T. and R.S.-R. Wrote the paper: S.S.N.-G., J.A.R.-T. and R.S.-R. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Nancy Sofía Hernández Bueno and Felipe Olvera Rodríguez for technical assistance. To PRODEP-SEP, México for covering the costs to publish in open access.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

PR-	Pathogenesis-related
GlcNAc	β -1,4- <i>N</i> -acetylglucosamine
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
PM	Peritrophic matrix

References

1. Oerke, E.C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* **2006**, *144*, 31. [[CrossRef](#)]

2. Abulreesh, H.H.; Osman, G.E.H.; Assaeedi, A.S.A. Characterization of Insecticidal Genes of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Arid Environments. *Indian J. Microbiol.* **2012**, *52*, 500–503. [[CrossRef](#)]
3. El-Menofy, W.H.; Osman, G.H.; Assaeedi, A.; Salama, M.S. Construction of A Novel recombinant baculovirus containing Cry1Abb insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biol. Proced. Online* **2014**, *4*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cohen-Kupiec, R.; Chet, I. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 270–277. [[CrossRef](#)]
5. Nagpure, A.; Choudhary, B.; Gupta, R.K. Chitinases: In agriculture and human healthcare. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2014**, *34*, 215–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Takenaka, Y.; Nakano, S.; Tamoi, M.; Sakuda, S.; Fukamizo, T. Chitinase Gene Expression in Response to Environmental Stresses in *Arabidopsis thaliana*: Chitinase Inhibitor Allosamidin Enhances Stress Tolerance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 1066–1071. [[CrossRef](#)]
7. De las Mercedes, D.M.; Pintor-Toro, J.A.; Cubero, B. Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chitinases of Fungal Origin Show Enhanced Resistance to Biotic and Abiotic Stress Agents. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 722–730.
8. Melchers, L.S.; Stuijver, M.H. Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 147–152. [[CrossRef](#)]
9. Benito, E.P.; ten Have, A.; van't Klooster, J.W.; Van Kan, J.A.L. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **1998**, *104*, 207–220. [[CrossRef](#)]
10. Hong, J.K.; Hwang, B.K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CAC_{hi}2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CAC_{hi}2-overexpressing *Arabidopsis*. *Planta* **2006**, *223*, 433–448. [[CrossRef](#)]
11. Alexander, D.; Goodman, R.M.; Gut-Rella, M.; Glascock, C.; Weymann, K.; Friedrich, L.; Maddox, D.; Ahl-Goy, P.; Luntz, T.; Ward, E.; et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Plant Biol.* **1993**, *90*, 7327–7331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sharma, N.; Sharma, K.P.; Gaur, R.K.; Gupta, V.K. Role of Chitinase in Plant Defense. *Asian J. Biochem.* **2011**, *6*, 29–37. [[CrossRef](#)]
13. Lorito, M.; Woo, S.L.; Fernandez, I.G.; Colucci, G.; Harman, G.E.; Pintor-Toro, J.A.; Filippone, E.; Muccifora, S.; Lawrence, C.B.; Zoina, A.; et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 7860–7865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Limón, M.C.; Lora, J.M.; García, I.; de la Cruz, J.; Llobell, A.; Benítez, T.; Pintor-Toro, J.A. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* **1995**, *28*, 478–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jach, G.; Görnhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R.; Schell, J.; Mass, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* **1995**, *8*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Eissa, H.F.; Hassanien, S.E.; Ramadan, A.M.; El-Shamy, M.M.; Saleh, O.M.; Shokry, A.M.; Abdelsattar, M.; Morsy, Y.B.; El-Maghraby, M.A.; Alameldin, H.F.; et al. Developing transgenic wheat to encounter rusts and powdery mildew by overexpressing barley chi26 gene for fungal resistance. *Plant Methods* **2017**, *13*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schlumbaum, A.; Mauch, F.; Vögeli, U.; Boller, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **1986**, *324*, 365–367. [[CrossRef](#)]
18. Broglie, K.; Chet, I.; Holliday, M.; Cressman, R.; Biddle, P.; Knowlton, S.; Mauvais, J.; Broglie, R. Transgenic Plants with Enhanced Resistance to the Fungal Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **1991**, *254*, 1194–1197. [[CrossRef](#)]
19. Dong, X.; Zhao, Y.; Ran, X.; Guo, L.; Zhao, D.-G. Overexpression of a New Chitinase Gene EuCHIT2 Enhances Resistance to *Erysiphe cichoracearum* DC. in Tobacco Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2361. [[CrossRef](#)]
20. Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S.; Soberón, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 423–431. [[CrossRef](#)]
21. Bravo, A.; Gill, S.S.; Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **2007**, *49*, 423–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tabashnik, B.E.; Carrière, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 926–935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Wu, J.H.; Ali, S.; Ren, S.X. Evaluation of Chitinase from *Metarhizium anisopliae* as Biopesticide Against *Plutella xylostella*. *Pak. J. Zool.* **2010**, *42*, 9.
24. Bidari, F.; Shams-Bakhsh, M.; Mehrabadi, M. Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae). *J. Appl. Entomol.* **2018**, *142*, 162–172. [[CrossRef](#)]
25. Ding, X.; Gopalakrishnan, B.; Johnson, L.B.; White, F.F.; Wang, X.; Morgan, T.D.; Kramer, K.J.; Muthukrishnan, S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res.* **1998**, *7*, 77–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aggarwal, C.; Paul, S.; Tripathi, V.; Paul, B.; Khan, M.A. Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development. *BioControl* **2015**, *60*, 631–640. [[CrossRef](#)]
27. Brurberg, M.B.; Nes, I.F.; Eijsink, V.G.H. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* **1996**, *142*, 1581–1589. [[CrossRef](#)]
28. Osman, G.H.; Assem, S.K.; Alreedy, R.M.; El-Ghareeb, D.K.; Basry, M.A.; Rastogi, A.; Kalaji, H.M. Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm. *Spodoptera littoralis*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18067. [[CrossRef](#)]
29. Rao, R.; Fiandra, L.; Giordana, B.; de Eguileor, M.; Congiu, T.; Burlini, N.; Arcielloa, S.; Corrado, G.; Pennacchio, F. AcMNPVChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 1205. [[CrossRef](#)]
30. Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffmann, N.L.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. A simple method for transferring genes into plants. *Science* **1985**, *227*, 1229–1231.
31. Folders, J.; Algra, J.; Roelofs, M.S.; van Loon, L.C.; Tommassen, J.; Bitter, W. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a Gradually Secreted Protein. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 7044–7052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Babashpour, S.; Aminzadeh, S.; Farrokhi, N.; Karkhane, A.; Haghbeen, K. Characterization of a chitinase (Chit62) from *Serratia marcescens* B4A and its efficacy as a bioshield against plant fungal pathogens. *Biochem. Genet.* **2012**, *50*, 722–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhu, Q.; Maher, E.A.; Masoud, S.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J. Enhanced Protection Against Fungal Attack by Constitutive Co-expression of Chitinase and Glucanase Genes in Transgenic Tobacco. *Tob. Nat. Biotechnol.* **1994**, *12*, 807–812. [[CrossRef](#)]
34. Lin, W.; Anuratha, C.S.; Potrykus, I.; Muthukrishnan, S.; Datta, S.K. Genetic Engineering of Rice for Resistance to Sheath Blight. *Nat. Biotechnol.* **1995**, *13*, 686–691. [[CrossRef](#)]
35. Datta, K.; Tu, J.; Oliva, N.; Ona, I.; Velazhahan, R.; Mew, T.W.; Muthukrishnan, S.; Datta, S.K. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci.* **2001**, *160*, 405–414. [[CrossRef](#)]
36. Mehmood, M.A.; Xiao, X.; Hafeez, F.Y.; Gai, Y.; Wang, F. Purification and characterization of a chitinase from *Serratia proteamaculans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 1955–1961. [[CrossRef](#)]
37. Javed, S.; Ahmad, M.M.; Ahmad, M.; Abdin, M.Z.; Hamid, R.; Khan, M.A.; Musarrat, J. Chitinases: An update. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2013**, *5*, 21–29. [[CrossRef](#)]
38. Parani, K.; Shetty, G.P.; Saha, B.K. Isolation of *Serratia marcescens* SR1 as a Source of Chitinase Having Potentiality of Using as a Biocontrol Agent. *Indian J. Microbiol.* **2011**, *51*, 247–250. [[CrossRef](#)]
39. Gutiérrez-Román, M.I.; Dunn, M.F.; Tinoco-Valencia, R.; Holguín-Meléndez, F.; Huerta-Palacios, G.; Guillén-Navarro, K. Potentiation of the synergistic activities of chitinases ChiA, ChiB and ChiC from *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 by chitobiase (Chb) and chitin binding protein (CBP). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 33–42. [[CrossRef](#)]
40. Liu, Z.; Shi, L.; Yang, S.; Lin, Y.; Weng, Y.; Li, X.; Hussain, A.; Noman, A.; He, S. Functional and Promoter Analysis of ChiV3, a Chitinase of Pepper Plant, in Response to *Phytophthora capsici* Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1661. [[CrossRef](#)]
41. Emani, C.; Garcia, J.M.; Lopata-Finch, E.; Pozo, M.J.; Uribe, P.; Kim, D.-J.; Sunilkumar, G.; Cook, D.R.; Kenerley, C.M.; Rathore, K.S. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*: Fungal-resistant transgenic cotton. *Plant Biotechnol. J.* **2003**, *1*, 321–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Carstens, M.; Vivier, M.A.; Pretorius, I.S. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res.* **2003**, *12*, 497–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shah, M.R.; Mukherjee, P.K.; Eapen, S. Expression of a fungal endochitinase gene in transgenic tomato and tobacco results in enhanced tolerance to fungal pathogens. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2010**, *16*, 39–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zagorchev, L.; Kamenova, P.; Odjakova, M. The Role of Plant Cell Wall Proteins in Response to Salt Stress. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fry, S.C.; Aldington, S.; Hetherington, P.R.; Aitken, J. Oligosaccharides as Signals and Substrates in the Plant Cell Wall. *Plant Physiol.* **1993**, *103*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chandrasekaran, R.; Revathi, K.; Nisha, S.; Kirubakaran, S.A.; Sathish-Narayanan, S.; Senthil-Nathan, S. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2012**, *104*, 65–71. [[CrossRef](#)]
47. Roberts, W.K.; Selitrennikoff, C.P. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Microbiology* **1988**, *134*, 169–176. [[CrossRef](#)]
48. Marchesi, J.R.; Sato, T.; Weightman, A.J.; Martin, T.A.; Fry, J.C.; Hiom, S.J.; Wade, W.G. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 795–799. [[PubMed](#)]
49. Nübel, U.; Engelen, B.; Felske, A.; Snaird, J.; Wieshuber, A.; Amann, R.I.; Ludwig, W.; Backhaus, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5636–5643. [[CrossRef](#)]
50. Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497. [[CrossRef](#)]
51. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–430. [[CrossRef](#)]
52. Fenice, M.; Leuba, J.-L.; Federici, F. Chitinolytic enzyme activity of *Penicillium janthinellum* P9 in bench-top bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *86*, 620–623. [[CrossRef](#)]
53. Bradford, M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
54. Fiddaman, P.J.; O'Neill, T.M.; Rossall, S. Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using leaf disc bioassays. *Ann. Appl. Biol.* **2000**, *137*, 223–235. [[CrossRef](#)]
55. Ludwig, A.; Boller, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *69*, 61–66. [[CrossRef](#)]





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**”.

Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**".

Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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 AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**".

Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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. FERNANDO MARTINEZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**”.

Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**".

Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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. GUADALUPE PEÑA CHORA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**".

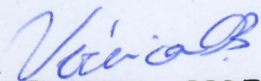
Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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. VERONICA OBREGON BARBOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a _____

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (Tutor)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Co Tutor)
Dr. Guadalupe Peña Chora
Dr. Mario Ramírez Yáñez
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Rubén Paul Gaytán Colin

Tesis: **Sobreexpresión de quitinasas de *Serratia marcescens* en plantas transgénicas de tabaco (*N. tabacum*) y su efecto contra el estrés biótico y abiótico**.

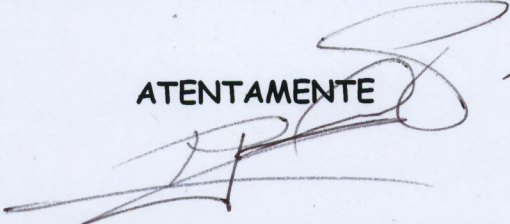
Alumno que la presenta a revisión: **SAMANTHA SARAI NAVARRO GONZALEZ**

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. RUBEN PAUL GAYTAN COLIN