



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Capacidad del tomate (*Solanum lycopersicum* cv
Ailsa Craig) sobreproductor de trehalosa para
contender el estrés biótico y abiótico

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Lic. Dayana Martínez Basulto

Director:

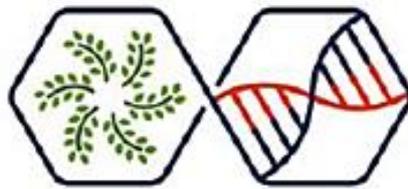
Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Codirector:

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Cuernavaca, Morelos

Octubre, 2023



**Laboratorio de Fisiología
Molecular de Plantas**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la codirección del Dr. Ramón Suárez Rodríguez y el Dr. José Augusto Ramírez Trujillo. Para la realización de los estudios de posgrado se contó con la beca otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación (807224).

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación (CONAHCyT-México) por la beca otorgada, que permitió el desarrollo de las actividades en el periodo de la Maestría.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB), institución que me permitió formar parte del grupo de alumnos del programa de Maestría en Biotecnología, donde aprendí mucho no solo de mi formación profesional.

Al laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, en especial a mis tutores de tesis, el Dr. Ramón Suárez Rodríguez y el Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, quienes me orientaron y guiaron en proceso de formación y me brindaron su apoyo incondicional.

Al resto de mis asesores, al Dr. Mario Ramírez Yáñez del Centro de Ciencias Genómicas (CCG), a la Dra. Verónica Obregón Barboza del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB UAEM) y al Dr. Erubiel Toledo Hernández de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB UAGro) por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis, sus opiniones y consejos. Haciendo particular mención al Dr. Mario por el apoyo en su laboratorio.

A las M. I Ariadna Zenil Rodríguez por toda la ayuda en la operación técnica del HPLC.

A todos los Drs que durante mi maestría me brindaron su conocimiento en cada una de las materias.

A mis compañeros de laboratorio por todo el apoyo experimental; además, porque me hicieron sentirme como en casa.

Lista de abreviaturas

µg	Microgramos
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
Cadh	ácido desoxirribonucleico complementario
CAT	catalasa
Chla	clorofila a
Chlb	clorofila b
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
EF1α	factor de elongación 1α
G	Gramos
G6P	glucosa-6-fosfato
H	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
JA	ácido jasmónico
Kcal	Kilocalorías
L	Litro
M	Molar
MDA	Malondialdehído
Mg	Miligramo
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Murashige y Skoog
MV	metil-viológeno
Nm	Nanómetro
NPTII	neomicina fosfotransferasa
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDA	agar papa dextrosa
PEG	Polietilenglicol
PepMV	virus del pepino dulce
POX	Peroxidasa
PPM	patrón de peso molecular
Psto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Pv	Patovar
qRT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ROS	especies reactivas de oxígeno
Rpm	revoluciones por minuto
SA	ácido salicílico
Seg	Segundos
SOD	superóxido dismutasa
T6P	trehalosa 6-fosfato
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TPP	trehalosa-6-fosfato fosfatasa
TPS	trehalosa-6-fosfato sintasa
Tre	Trehalosa
UFC	unidades formadoras de colonias
Wt	línea silvestre

μg
 μL

Microgramos
Microlitros

Índice de figuras

Figura 1. Hongo <i>Botrytis cinerea</i> en tallo de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	7
Figura 1. Estructura de la trehalosa. Disacárido α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido, unión de dos moléculas de glucosa por una configuración α , α -1.....	10
Figura 2. Ruta de síntesis de trehalosa en plantas. La TPS cataliza la condensación de UDP-glucosa a glucosa 6 fosfato para posteriormente ser defosforilada por la TPP.....	11
Figura 3. Análisis por PCR de las plantas de tomate. A. Amplificación del gen marcador NPTII. B. Amplificación del fragmento TPP de las diferentes líneas transgénicas.....	28
Figura 5. Características fenotípicas de las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	29
Figura 6. Efecto del estrés en la geminación de las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	33
Figura 7. Prueba de tolerancia al herbicida Paraquat en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	34
Figura 8. Prueba de tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa (Líneas 1, 4 y 5) en comparación con la línea silvestre (Wt).....	35
Figura 9. Efecto del estrés salino en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	38
Figura 10. Efecto del estrés por sequía en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	41
Figura 11. Prueba de tolerancia ante la infección del patógeno <i>Botrytis cinerea</i> en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	42
Figura 12. Prueba de tolerancia ante la infección del patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre.....	44
Figura 13. Prueba de tolerancia ante la infección del patógeno <i>Clavibacter michiganensis</i> m. en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa (1, 4 y 5) en comparación con la línea silvestre (Wt).....	46
Figura 14. Análisis de expresión mediante RT-PCR de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre.....	48

Figura 15. Análisis de expresión de NPTII mediante RT-PCR de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre.....	49
Figura 16. Análisis de expresión mediante qRT-PCR de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre.....	49
Figura 17. Perfil cromatográfico del estándar de trehalosa empleado para la cuantificación por HPLC.....	50
Figura 18. Determinación de la concentración de trehalosa ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco) en plantas transgénicas de tomate y plantas silvestres.....	51

Índice

1.Introducción	1
1.1. Importancia del tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	1
1.2.Estrés en plantas	1
1.2.1.Principales estreses que afectan a la familia Solanacea.....	3
1.3.Osmoprotectores.....	7
1.3.1.Trehalosa	7
1.4.Antecedentes	10
2.Justificación	14
3.Hipótesis	15
4.Objetivos	15
5.Estrategia metodológica	16
6.Materiales y métodos.....	17
6.1.Material vegetal	17
6.2.Análisis molecular de las plantas transformadas.....	17
6.2.1.Extracción de ADN.....	17
6.2.2.PCR (ADN).....	17
6.3.Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tomate en condiciones normales.....	18
6.3.1. Parámetros vegetativos.....	18
6.3.2.Producción de semillas y peso de los frutos	18
6.4.Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía, salinidad y azúcares exógenos.....	18
6.5.Pruebas de estrés abiótico en plantas transgénicas de tomate.....	19
6.5.1. Inducción al estrés oxidativo empleando el agente químico Paraquat.....	19
6.5.2.Determinación de la tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV).....	19
6.5.3.Tolerancia a estrés por salinidad y sequía.....	19
6.5.3.1.Contenido de clorofila	19
6.5.3.2.Contenido de malondialdehído (MDA).	20
6.6.Pruebas de tolerancia a estrés biótico en plantas transgénicas.....	20
6.6.1.Infección con hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i> B05.10	20
6.6.2.Infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	21
6.7.Extracción de ARN y síntesis de cADN	21

6.7.1. Análisis de expresión (RT- PCR y qRT-PCR).....	23
6.8. Cuantificación de los contenidos de trehalosa.....	23
7. Resultados.....	24
7.1. Análisis molecular de las plantas transformadas	24
7.2. Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tomate en condiciones normales.....	24
7.3. Evaluación del efecto de la sobreproducción de trehalosa en líneas homocigas de tomate en condiciones de estrés.....	26
7.3.1. Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía y salinidad.....	26
7.3.2. Evaluación de la tolerancia al herbicida Paraquat.....	30
7.3.3. Evaluación de la tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV).....	31
7.3.4. Evaluación de la tolerancia a estrés por salinidad	32
7.3.5. Evaluación de la tolerancia a estrés por sequía	34
7.3.6. Evaluación de la tolerancia ante el estrés biótico.....	37
7.3.6.1. Análisis de infección con micelio del hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i>	37
7.3.6.2. Análisis de infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato (Psto).....	38
7.3.6.2. Análisis de infección con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	39
7.4. Análisis de expresión del transgén TPS-TPP en condiciones de estrés.....	41
7.5. Cuantificación de trehalosa.....	44
8. Discusión	46
8.1. Producción de semillas y peso de los frutos.....	46
8.2. Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía, salinidad y azúcares exógenos.....	46
8.3. Evaluación de la tolerancia a estrés oxidativo por Paraquat y metil-viológeno (MV).....	48
8.4. Evaluación de la tolerancia a salinidad y sequía	49
8.5. Resistencia a patógenos fungales y bacterianos.....	52
8.6. Análisis de expresión del transgén TPS-TPP en condiciones de estrés	53
9. Conclusiones	55
10. Perspectivas.....	55
11. Referencias bibliográficas.....	56

1. Introducción

1.1. Importancia del tomate (*Solanum lycopersicum*)

A nivel mundial en gran cantidad de países, el tomate (*Solanum lycopersicum*), cuyo centro de domesticación es México, se considera como una de las hortalizas más importantes debido a su alta demanda causada por su valor nutricional, su uso a nivel industrial, en los últimos años esta producción ha ido en aumento; México se encuentra entre los principales países productores (Hernández-Herrera *et al.*, 2014; FAOSTAT, 2015). La producción obtenida ha incrementado mundialmente 9.5% en los últimos cuarenta años. Con la demanda por el incremento en la población, la producción de alimentos a nivel mundial necesitará incrementarse en un 38% antes de 2025 y un 57% antes de 2050 (Wild, 2003). Sin embargo, la mayor parte de los productos agrícolas se obtienen bajo un sistema de producción intensiva, con el alto uso de agroquímicos que pueden dañar la salud humana y el medio ambiente (FAO, 1997).

En México es importante el cultivo de tomate debido a que se encuentra en continuo aumento la demanda y producción del mismo. La producción de tomate en México creció a una tasa promedio anual de 3.3% entre 2005 y 2015, para ubicarse en 3.1 millones de toneladas (FIRA, 2016); para el año agrícola 2017 alcanzó un total de 3,055,861 tn (SIAP-SAGARPA, 2018). Los estados principales productores son Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Nayarit, Morelos y Michoacán (Jiménez, 2003; FAOSTAT, 2015). Sin embargo, su rendimiento se ve mermado por la incidencia de diversas plagas y enfermedades (Pelegrín *et al.*, 2004).

1.2. Estrés en plantas

El estrés ambiental provoca cambios que disminuyen el rendimiento en los cultivos. Factores abióticos como la disponibilidad de agua en el suelo, las temperaturas subóptimas y supraóptimas, la salinidad; causan restricciones en el crecimiento del cultivo, expresándose solo una pequeña fracción de su potencial genético. Por lo que es de gran importancia para la agricultura y el ambiente, comprender los procesos fisiológicos y los mecanismos de adaptación y aclimatación de las plantas al estrés ambiental.

La seguridad alimentaria se ve amenazada por la disminución en el rendimiento de los sistemas de producción agrícola, entre los factores que la limitan se encuentran los estreses bióticos y abióticos que no solo reducen la cantidad y la calidad de las

cosechas, produciendo pérdidas millonarias cada año, sino que además limitan entre otros aspectos, el terreno y las especies cultivables. Por lo tanto, es crucial comprender los procesos fisiológicos subyacentes a la tolerancia al estrés de cada cultivo a la hora de establecer programas de mejoramiento genético.

El estrés biótico en plantas es ocasionado por organismos vivos, que pueden ser microorganismos patógenos, insectos y nematodos herbívoros, así como otras plantas. Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos con origen en suelo constituyen una amenaza recurrente en los cultivos agrícolas (Huerta- Lara *et al.*, 2009). Bautista *et al.* (2010) mencionan que los principales hongos fitopatógenos presentes en hortalizas son: *Pythium* spp., *Fusarium* spp. y *Rizhoctonia* spp., además del oomiceto *Phytophthora capsici* que, en conjunto, atacan la raíz y tallo induciendo marchitez, pudrición, enanismo, tizones y manchas foliares, que provocan desde disminuciones del 60% del rendimiento hasta la pérdida total de los cultivos. Este tipo de estrés se encuentra altamente relacionado con factores abióticos ya que estos pueden influir de manera importante en el comportamiento, morfología, abundancia, ciclo de vida y por lo tanto en su interacción y susceptibilidad.

Es complicado conocer como la planta responde a nivel molecular de forma individual a cada uno de los estreses a los que se debe enfrentar, puesto que muchos de ellos están interconectados, como es el caso de la sequía, la salinidad y la temperatura. Los estreses abióticos, en general, pueden provocar daños a nivel celular afectando a las membranas, además de ocasionar daños a nivel oxidativo por la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), desnaturalización de proteínas y estrés osmótico (He *et al.*, 2018). Todos estos efectos conducen a una senescencia prematura de las hojas, así como necrosis, clorosis y disminución de la capacidad fotosintética, ocasionando una reducción en el crecimiento de las plantas y, por ende, en la producción de los cultivos (Wang *et al.*, 2003; Anjum *et al.*, 2011).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias para hacerles frente y éstas involucran moléculas de señalización como el Ca^{2+} , óxido nítrico, ROS, fitohormonas y poliaminas, así como factores de transcripción, formando una compleja red reguladora (He *et al.*, 2018). Uno de los fenómenos observado en los vegetales expuestos a estreses abióticos consiste en la síntesis de ácidos grasos que ayudan al remodelado y fluidez de la membrana celular, que se afecta ampliamente sobre todo en estrés causado por temperatura (Los y Murata, 2004). También inducen la síntesis de proteínas antioxidantes para hacer frente al estrés oxidativo originado por las ROS, como peroxidasas, catalasas y superóxido dismutasas (Gechev *et al.*, 2006; Sharma *et al.*,

2012). Las chaperonas, entre las que encontramos las proteínas de choque térmico, son fundamentales para prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas, ayudar al plegamiento o presentarlas a los lisosomas o proteosomas para su proteólisis, restaurando así la homeostasis celular (Kregel, 2002; Wang *et al.*, 2004). Por último, destacar el papel de los compuestos osmoprotectores. Estos son compuestos orgánicos e inorgánicos pequeños sin carga, de alta solubilidad y baja toxicidad, que se acumulan en el interior de las células para estabilizar las proteínas y membranas, y actúan como antioxidantes y para reestablecer el balance iónico y la homeostasis celular, además de poder ejercer un efecto señalizador en diversas cascadas de regulación para desencadenar la expresión de genes de respuesta a estrés. Entre ellos encontramos algunos azúcares, aminoácidos y derivados como la rafinosa, inositol, manitol o la prolina (Slama *et al.*, 2015).

1.2.1. Principales estreses que afectan a la familia Solanacea

Las solanáceas son una familia de plantas del orden Solanales, pertenecientes a las dicotiledóneas (Magnoliopsida), constituida por más de 95 géneros y alrededor de 3000 especies, siendo el género *Solanum* el más representado (Yadav *et al.*, 2016). Las solanáceas son una familia de plantas con gran relevancia en la agricultura a nivel mundial y, al igual que otros cultivos de interés agronómico como son la soya, el maíz, el arroz, entre otros, están sometidas a diversos factores bióticos y abióticos que afectan a su crecimiento y productividad.

Entre los estreses abióticos que mayor repercusión tienen en su producción, se encuentran la sequía y la temperatura (Sato *et al.*, 2000; Pervez *et al.*, 2009). Los cultivos de solanáceas son sensibles al estrés hídrico y a altas temperaturas en diferentes fases de su desarrollo. Entre los efectos generales ocasionados destaca una reducción en la germinación de las semillas, la disminución de la altura de la planta y de su rendimiento, el cual está directamente relacionado con la disminución del número de flores, frutos, y de su calibre (Pervez *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010; Wahb-Allah *et al.*, 2011).

En relación con los factores bióticos, esta familia también puede verse afectada por gran cantidad de microorganismos patógenos. Entre ellos podemos destacar algunos virus como el causante de la enfermedad virus del rizado amarillo de la hoja del tomate, el virus más devastador en las regiones tropicales y subtropicales del tomate cultivado, pudiendo ocasionar pérdidas cercanas al 100% en algunos casos (Moriones y Navas-

Castillo, 2000). Respecto a las infecciones bacterianas, *Ralstonia solanacearum* es la causante de la marchitez bacteriana, afectando principalmente al cultivo de la papa, aunque también al de tomate (Tans-Kersten *et al.*, 2001). Los hongos también son patógenos de esta familia, *Oidium neolycopersici* y *Botrytis cinerea* son los que mayor incidencia y pérdidas ocasionan en los cultivos de tomate, afectando también a otros cultivos de solanáceas (Williamson *et al.*, 2007) (Figura 1). Por otro lado, las solanáceas son además susceptibles al daño ocasionado por plagas de insectos herbívoros, destacando como tal a *Leptinotarsa decemlineata*. Este coleóptero se alimenta preferentemente de plantas de patata, aunque también lo hace de plantas de tomate y de berenjena (Alyokhin *et al.*, 2008).



Figura 4. Hongo *Botrytis cinerea* en tallo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016).

1.2.1.1. Principales enfermedades de *Solanum lycopersicum*

La superficie dedicada al cultivo de tomate ha disminuido gradualmente en los últimos años. Esta disminución se encuentra directamente determinada por la incidencia creciente de plagas y enfermedades radiculares (Sánchez, 1998). Para asegurar el éxito económico en la producción de tomate, es importante mantener a las plantas libres de enfermedades causadas por patógenos y reducir a un mínimo la presencia de las plagas que transmiten las diversas enfermedades virales que afectan al cultivo. Varios son los agentes de enfermedades de *Solanum lycopersicum* entre los que destacan las fanerógamas parasitarias, bacterias, fitoplasmas, virus, viroides, nematodos, insectos y hongos.

El tomate es un cultivo sensible al ataque de plagas, en especial de insectos. Los insectos plagas que causan las mayores pérdidas en el cultivo del tomate son: mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius, *Trialeurodes vaporariorum* West), áfidos (*Myzus persicae* Sulzer y *Aphis gossypii* Glover) y psílidos (*Paratriosa cockerelli* Sulc.), estos constituyen vectores de enfermedades virales que afectan hasta el 100 % del cultivo, así como los gusanos del fruto (*Helicoverpa zea* Boddie y *H. virescens* Fabricius) (Bravo, 2002).

Las enfermedades fúngicas son causadas principalmente por *Botrytis cinerea*, *Alternaria dauci* f. *solana*, *Laveillula taurina*, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). El hongo *Botrytis cinerea* es un importante patógeno de plantas cultivadas, los especialistas lo ubican en segundo lugar en importancia entre todos los hongos fitopatógenos conocidos (Dean *et al.*, 2012). La enfermedad de moho gris, causada por este hongo es una de las más severas reportadas. En el tomate puede tener distintas localizaciones en la parte aérea de la planta provocando sintomatologías de variada naturaleza como puede ser cancro del tallo y podredumbre de hojas, flores y frutos recién cuajados.

Entre las enfermedades radicales vasculares del tomate el marchitamiento vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici*) (Ramírez, 1998) es una de las que más pérdidas causa. La cenicilla causada por *Oidium neolycopersici* y la pudrición de fruto ocasionada por *Phytophthora capsici* (Fernández-Pavía *et al.*, 2008) son otras importantes enfermedades fúngicas que sufre este cultivo. Dentro de los principales patógenos que afectan el tomate se encuentra el tizón temprano, este patógeno tiene un ciclo de vida corto, por ello tiene una gran capacidad de reproducción y de dispersión (Muiño *et al.*, 2010). Daña órganos aéreos del tomate, especialmente a las hojas, en las cuales genera manchas necróticas, lo cual reduce la capacidad fotosintética de la planta y en ocasiones puede producir una defoliación grave (Mónaco *et al.*, 2001).

El rendimiento del cultivo del tomate también es afectado por varias especies bacterianas. El cancro bacteriano causado por la bacteria patógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una de las enfermedades más importantes que afectan los cultivos de tomate. Los primeros síntomas de la enfermedad son la necrosis marginal de los folíolos en forma unilateral que a su vez se tuercen hacia arriba como si se enrollaran. Los tejidos vasculares al principio toman un color amarillento que posteriormente se vuelven de color marrón. Los síntomas aparecen más rápido en las plantas jóvenes que en las adultas. Otro patógeno importante es *Ralstonia*

solanacearum que causa el marchitamiento bacteriano. *Pseudomonas syringae* es el agente causal de la mota bacteriana del tomate. Los síntomas de la enfermedad en tomate son manchas foliares de color marrón negruzco, que pueden estar rodeadas por un margen clorótico; manchas superficiales oscuras en frutos verdes; las motas en la fruta madura pueden hundirse y están rodeadas por una zona de maduración tardía. Atrofia y pérdida de rendimiento, particularmente si las plantas jóvenes están infectadas. Reducción del valor de mercado de la fruta moteada (Preston, 2000).

En la actualidad el tomate puede verse afectado por más de 15 virus (Olvido *et al.*, 2013), como el tobamovirus del tomate (ToBRFV), que causan graves pérdidas económicas. La marchitez manchada del tomate, virus del bronceado del tomate o peste negra es una de las virosis más dañinas de tomate debido a su amplia distribución, fácil y rápida transmisión y que produce graves daños sobre las plantas. El virus que causa esta enfermedad tiene gran variabilidad genética que le confiere una gran capacidad para superar la resistencia concebida a las plantas con la finalidad de controlarlo, así como elevada capacidad para adaptarse a cambios en las condiciones (Tentchev *et al.*, 2011). Luego de la infección aparecen lesiones necróticas de color bronce sobre las hojas. Inicialmente aparecen frecuentemente anillos cloróticos que necrosan con el tiempo; también se pueden observar dibujos geométricos característicos formado por líneas de color claro. Los frutos pierden su valor comercial debido a la aparición de moteado claro en forma de anillos concéntricos y abullonado. Otros virus que suelen causar grandes pérdidas en el cultivo del tomate son el virus del rizado amarillo del tomate y el virus del pepino dulce (PepMV). El virus del rizado amarillo del tomate es un virus de ADN transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, el vector al alimentarse de plantas enfermas succiona el virus el cual se inocula a plantas sanas por nuevas picaduras. Los síntomas más frecuentes son el amarilleo de las hojas apicales que se curvan hacia arriba pudiéndose necrosar (Accotto *et al.*, 2000). El PepMV es un virus de ARN con una característica que le hace realmente dañino, ya que tiene gran estabilidad y resistencia, por lo que puede persistir por largo tiempo en material vegetal infectado. Se presenta como un mosaico intenso amarillo o dorados en las hojas con diferentes distribuciones, puede aparecer necrosis en tallo y hojas, y las hojas se vuelven filiformes. Las plantas en general pueden presentar enanismo y marchitez, y los frutos son más pequeños y de baja calidad comercial con alteraciones del color y necrosis (Ling y Scott, 2007).

1.3. Osmoprotectores

La exposición a la sequía, la salinidad o las temperaturas extremas desencadenan respuestas comunes en las plantas; a nivel molecular, se adaptan al estrés abiótico mediante la regulación de la expresión diferencial de genes. Una respuesta adaptativa para mantener estable las condiciones intracelulares en presencia de factores de estrés ambiental es que muchas plantas incrementan su potencial osmótico a través de la acumulación de osmolitos intracelulares como la prolina, glicina betaína, manitol y trehalosa (Zhu, 2002). Debido el estrés hídrico, los tejidos vegetales acumulan activamente solutos para asegurar la sobrevivencia de las plantas (Attipalli *et al.*, 2004), uno de los principales solutos es la prolina y los azúcares solubles como la trehalosa, cuya síntesis se ha asociado con el mantenimiento de la turgencia de los tejidos para continuar con la función celular (Ramanjulu y Sudhakar, 2000).

1.3.1. Trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos monómeros de glucosa que están vinculados con un enlace 1,1-glicosídico (Figura 2). Se encuentra en muchos organismos como hongos, bacterias, nematodos, artrópodos y plantas (Elbein *et al.*, 2003) pero no se encuentra en vertebrados. Los niveles de trehalosa son muy bajos en la mayoría de las plantas superiores, con excepción de algunas especies de plantas de resurrección, por ejemplo, *S. lepidophylla*, donde su alto contenido de trehalosa se correlacionó con alta tolerancia al estrés (Iturriaga *et al.*, 2000). La trehalosa y los intermediarios en su biosíntesis tienen un papel importante en el metabolismo de las células vegetales para la tolerancia al estrés abiótico.

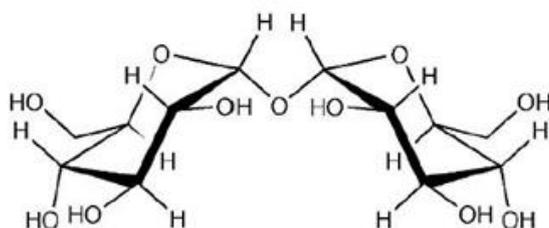


Figura 5. Estructura de la trehalosa. Disacárido α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido, unión de dos moléculas de glucosa por una configuración α , α -1 (Elbein *et al.*, 2003).

1.3.1.1. Vías de biosíntesis de trehalosa

Existen al menos cinco vías de biosíntesis de trehalosa en la naturaleza (Avonce *et al.*, 2006). La vía más común es la TPS-TPP, se encuentra en una amplia gama de organismos a partir de bacterias, arqueas, hongos, insectos y plantas (Figura 3). En

esta, la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) cataliza la transferencia de glucosa de UDP-glucosa a glucosa-6-fosfato (G6P), produciendo el intermedio trehalosa-6-fosfato (T6P). La trehalosa-6-fosfatasa (TPP) desfosforila T6P a trehalosa (Elbein *et al.*, 2003). La vía TreZ-TreY se distribuye en bacterias y arqueas termófilicas del género *Sulfolobus*, implica la conversión de maltooligosacáridos o almidón a trehalosa catalizada por la maltooligosil trehalosa sintasa (TreY) y posteriormente maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TreZ) (Maruta *et al.*, 1996). La vía de la trehalosa fosforilasa (TreP), se encuentra en hongos como *Agaricus bisporus* y protista como *Euglena gracilis*, la TreP cataliza la síntesis reversible de trehalosa, a partir de glucosa-1-fosfato y glucosa (Wannet *et al.*, 1998). En la vía TreS, la trehalosa sintasa (TreS) isomeriza el enlace α 1- α 4 de la maltosa al enlace α 1- α 1 de trehalosa. Esta vía se encontró por primera vez en *Pimelobacter* sp. (Elbein *et al.*, 2003) y se ha reportado sólo en bacterias.

La vía TreT implica a la trehalosa glicosiltransferasa (TreT) que cataliza la conversión reversible de ADP-glucosa y glucosa a trehalosa. Esta vía se encuentra en extremófilos como *Thermococcus litoralis* y *Thermotoga maritima* (Qu *et al.*, 2004). La trehalosa se hidroliza en dos unidades de glucosa por acción de la trehalasa. Esta reacción se ha observado en muchos organismos incluyendo hongos, bacterias, plantas e insectos (Elbein *et al.*, 2003).



Figura 6. Ruta de síntesis de trehalosa en plantas. La TPS cataliza la condensación de UDP-glucosa a glucosa 6 fosfato para posteriormente ser defosforilada por la TPP (Avonce *et al.* 2006).

1.3.1.2. Propiedades de la trehalosa y sus aplicaciones

La trehalosa se encuentra en el grupo de los azúcares reductores de acuerdo con sus características químicas; su fuerte estabilidad es el resultado de la baja energía (1 kcal mol⁻¹) del enlace glucósido de oxígeno que une los dos anillos de hexosa, en comparación con otros disacáridos no reductores, como la sacarosa, que tienen una energía de enlace de 27 kcal mol⁻¹ (Paiva y Panek, 1996). Por sus propiedades fisicoquímicas la molécula de la trehalosa puede resistir una temperatura de 100 °C, y un rango de pH de 3.5 – 10 por 24 horas, siendo resistente a la hidrólisis ácida, por esta razón demuestra la capacidad molecular para proteger, estabilizar las estructuras de las proteínas y mantener la integridad de las membranas ante diferentes tipos de estrés

(Patist y Zoerb, 2005). Durante la desnaturalización de proteínas y membranas, reemplaza el agua de los puentes de hidrógeno por residuos polares, en la desecación la trehalosa forma estructuras amorfas de cristal que limitan el movimiento molecular, lo que previene los agregados de proteína y la difusión de radicales libres.

La protección de las membranas celulares por este osmoprotector ocurre a través de la interacción de los grupos OH de las proteínas y de las cabezas polares de los lípidos que forman las membranas, de acuerdo con la teoría del remplazamiento de agua por trehalosa (Adams *et al.*, 1990; Crowe *et al.*, 1998). Los estudios evidencian que la trehalosa retarda la transición de líquido a gel al reemplazar de las moléculas de agua por las de trehalosa, así mantiene las membranas en forma de cristal líquido (Crowe *et al.*, 2001). La trehalosa encaja entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante sus hidroxilos; por lo que funciona en este sentido, incluso mejor que la sacarosa. Sólo ha sido reportada en las plantas de resurrección (*S. lepidophylla*) y en *Myrothamnus flabellifolia* la acumulación de trehalosa en plantas (Adams *et al.*, 1990; Drenan *et al.*, 1993). En plantas superiores no se ha detectado acumulación de trehalosa; pero están presentes los genes que codifican para las enzimas de síntesis de trehalosa (Blázquez *et al.*, 1998). La falta de acumulación de trehalosa en plantas que contienen las enzimas de síntesis, es debido a la alta actividad de trehalasa (enzima que la hidroliza), propuesta por Goddijn y Smeekens (1998).

Las propiedades fisicoquímicas de la trehalosa permiten las amplias posibilidades de aplicación biotecnológica de este compuesto (Paiva y Panek, 1996). Se ha demostrado que es capaz de preservar la estructura y función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Lins *et al.*, 2004). En presencia de trehalosa las proteínas preservan mejor su actividad bajo estrés abiótico, pues el disacárido reemplaza a el agua para formar una especie de cápsula protectora que rodea a la proteína deshidratada, así se conserva su estructura terciaria y su actividad. La interacción entre estas moléculas es por enlace por puente de hidrógeno que ocurre entre grupos polares de la proteína e hidroxilos del azúcar. La trehalosa sea un azúcar no reductor, a diferencia de la sacarosa, por tanto previene la reacción de Maillard en la que los grupos aldehído de los azúcares reducen a los grupos amino de los residuos de las proteínas, con lo que se produce el típico color café asociado a la degradación de las proteínas, reacción que se acelera con el incremento de la temperatura (Crowe *et al.*, 1984).

La trehalosa extracelular puede actuar como un inductor de las respuestas de defensa de las plantas. Está implicada como factor de virulencia o molécula señal en las interacciones entre plantas y una diversa gama de otros organismos, y estas interacciones también puede tener un efecto significativo en el metabolismo de trehalosa propio de la planta. Estudiar estas interacciones ofrece formas para mejorar las defensas de las plantas de importancia agrícola contra patógenos microbianos y plagas de insectos, al mismo tiempo que promueve asociaciones beneficiosas con bacterias y hongos simbióticos (Lunn *et al.*, 2014).

Con la finalidad de obtener plantas que sobreacumulen trehalosa para contender el estrés se han sobrepresado genes microbianos que codifican enzimas de la síntesis de este azúcar. Las plantas transgénicas que se han obtenido en disímiles investigaciones poseen tolerancia a diferentes estreses, pero también muestran alteraciones en el desarrollo, como crecimiento retardado, hojas en forma de lanceta y sistemas radiculares (Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997). Se han reportado efectos pleiotrópicos (Romero *et al.*, 1997) que unido a los bajos niveles de expresión obtenidos en la mayoría de los estudios indican que altas concentraciones de trehalosa, más que tener un efecto osmoprotector, pueden alterar el metabolismo del azúcar, el aparato fotosintético y el metabolismo del almidón, afectando así el desarrollo de la planta y la tolerancia al estrés (Cortina y Culiañez-Macia, 2005).

La trehalosa se ha convertido en un apreciado producto biotecnológico debido a sus propiedades, con diversas aplicaciones, algunas desarrolladas hasta nivel comercial (Schiraldi *et al.*, 2002). Asimismo, la trehalosa se utiliza para enmascarar olores y sabores en la comida, también es un importante ingrediente en la industria alimentaria como estabilizador y preservador de comida fresca. Se usa como crioprotector de células y enzimas, en la medicina y en la microbiología. También la trehalosa inhibe la agregación de proteína inducida por la poliglutamina encontrada en la enfermedad de Huntington (Paul *et al.*, 2008).

1.4. Antecedentes

Se han realizado varios trabajos para lograr un aumento en las concentraciones de trehalosa en plantas de interés agrícola (Tabla 1), teniendo en cuenta las características anteriormente mencionadas, con el objetivo de mejorar el rendimiento en condiciones de estrés y mejorar la tolerancia al mismo (Delorge *et al.* 2015). Los primeros intentos por obtener plantas transformadas capaces de acumular trehalosa se realizaron con tabaco empleando el gen *otsA* de *Escherichia coli* o el gen *ScTPS1* de levadura. Las

plantas obtenidas presentaron tolerancia a la sequía (Holmström *et al.*, 1996; Pilon-Smits *et al.*, 1998), sin embargo, también se reportaron en ellas efectos pleiotrópicos.

Varios estudios han sugerido que los genes *TPS* desempeñan un papel vital en la tolerancia al estrés en plantas, por ejemplo, en *S. lepidophylla*, el gen *TPS1* participó en la respuesta al estrés por calor y salinidad (Zentella *et al.*, 1999). Los niveles de expresión de *TPS* en el algodón aumentaron bajo estrés por sequía (Kosmas *et al.*, 2006). La sobreexpresión del gen *TaTPS11* del trigo mejoró la tolerancia al frío e influyó en el metabolismo de carbohidratos en plantas de *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2019). La sobreexpresión de *OsTPS1* mejoró la tolerancia de plántulas de arroz al frío, alta salinidad y sequía sin otros cambios fenotípicos significativos, al incrementar la cantidad de trehalosa y prolina, además regula la expresión de genes relacionados con el estrés (Li *et al.*, 2011). Mientras que los genes *TPS* en maíz estaban regulados positivamente en respuesta al estrés por salinidad y frío (Jiang *et al.*, 2010).

Se han llevado a cabo diversas investigaciones para estudiar la sobreexpresión de genes biosintéticos de la trehalosa para aumentar la tolerancia al estrés abiótico en plantas. En *Arabidopsis thaliana*, líneas transgénicas con una fusión de levadura trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa evidenciaron un aumento en la tolerancia a la sequía, salinidad, congelación y calor de manera significativa (Miranda *et al.*, 2007). La sobreexpresión de *AtTPS1* en *Arabidopsis* usando el promotor 35S confirió tolerancia a la deshidratación, sin alteraciones morfológicas visibles, salvo floración tardía y además condujo a un pequeño aumento en los niveles de trehalosa y trehalosa-6-P (Avonce *et al.*, 2004).

Con respecto a las TPP, se ha demostrado que las plantas que sobreexpresaban *AtTPPD* son más tolerantes al estrés por alta salinidad, lo que se correlacionó con altos niveles de almidón y una mayor acumulación de azúcares solubles (Krasensky *et al.*, 2014). La sobreexpresión de *AtTPPF* produce un aumento del contenido de trehalosa y azúcares solubles totales en condiciones de sequía y participa en la regulación de la transcripción de genes sensibles al estrés (Lin *et al.*, 2019). *AtTPPG* participa en la regulación del cierre estomatal (Van Houtte *et al.*, 2013). La sobreexpresión de *AtTPPI* aumentó significativamente la tolerancia a la sequía y mejoró la eficiencia en el uso del agua (WUE) al disminuir la apertura estomatal y mejorar la arquitectura de las raíces (Lin *et al.*, 2020). Además, *AtTPPI* desempeña un papel en la respuesta al estrés por salinidad, pero no parece ser esencial para el estrés oxidativo y osmótico (Kataya *et al.*, 2020).

En el arroz, la sobreexpresión regulada de un gen de fusión de genes biosintéticos de trehalosa de *E. coli* (*otsA* y *otsB*) permitió que líneas transgénicas exhibieran un crecimiento vegetal sostenido, menos daño fotooxidativo y un equilibrio mineral más favorable en condiciones de estrés por salinidad, sequía y bajas temperaturas. Los autores reportan que el efecto principal de la trehalosa no es como un soluto compatible, sino que el aumento de la acumulación de trehalosa está correlacionado con niveles más altos de carbohidratos solubles y una capacidad elevada para la fotosíntesis tanto en condiciones de estrés como sin estrés, de acuerdo con su papel sugerido en la modulación de la sensibilidad al azúcar y el metabolismo de los carbohidratos (Garg *et al.*, 2002). *OsTPS8* regula la tolerancia al estrés por salinidad en el arroz, pues controla las concentraciones de azúcares solubles e interviene en la regulación de la expresión de genes implicados en la señalización SAPK9 mediada por ABA (ácido abscísico) (Vishal *et al.*, 2019).

La transcripción del gen *NtTPPL* de tabaco fue inducida significativamente por el estrés por calor y solo ligeramente por NaCl, PEG (polietilenglicol) y tratamientos con bajas temperaturas (Wang *et al.*, 2005).

En alfalfa se expresó la enzima bifuncional TPS-TPP obteniéndose un incremento en la tolerancia a múltiples estreses abióticos, sin embargo, utilizando el promotor constitutivo 35S las plantas presentaron menor altura (Suárez *et al.*, 2009). En cambio, al utilizarse el promotor inducible por estrés RD29A las plantas de alfalfa fueron más altas con un aumento significativo en la biomasa. El bajo contenido de trehalosa acumulada en las plantas transformadas no fue suficiente para explicar su papel como osmoprotector, sin embargo, alteraciones en la expresión de genes de señalización y de respuesta a estrés podrían explicar este fenotipo (Suárez *et al.*, 2009).

En un estudio Lyu y colaboradores (2013), obtuvieron plantas transgénicas de tomate con fusión bifuncional de trehalose-6-fosfato sintasa y trehalose-6-fosfato fosfatasa de *E. coli* bajo el control del promotor CaMV35S. Estas plantas junto con plantas de tipo silvestre fueron sometidas a tratamiento de estrés salino. Las plantas transgénicas acumularon trehalosa en altas cantidades en sus hojas y se reportó un incremento en la tolerancia a salinidad, sequía; así como un incremento en la fotosíntesis en comparación de las plantas silvestres en estrés salino. Otras investigaciones demostraron que la expresión de *ScTPS1* en jitomate y en papa, mejoraron la tolerancia a sequía, salinidad y estrés oxidativo (Cortina y Culiañez-Macia, 2005; Yeo *et al.*, 2000).

La trehalosa extracelular es una señal que las plantas perciben como presencia de peligro y puede inducir respuestas de defensa en las mismas contra patógenos (Lunn

et al., 2014). La administración de trehalosa exógenamente a las plántulas de *A. thaliana* condujo a inducción de genes relacionados con la defensa contra patógenos, así como cambios en la expresión de factores de transcripción relacionados con el estrés y genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno (Aghdasi *et al.*, 2008). En un estudio realizado en plantas de trigo asperjadas con trehalosa, se encontró que esta induce resistencia al mildiú polvoroso (Tayeh *et al.*, 2014). Hodge y colaboradores en el 2013 realizaron un estudio donde infestaron *A. thaliana* con el pulgón del melocotón, *Myzus persicae*, obteniendo como resultado una acumulación sistémica de trehalosa, que dependía de la densidad poblacional de pulgones. Se propone que TPS11 es la fuente de trehalosa en *A. thaliana* y plantas de tomate infestadas con *Myzus persicae* (Singh *et al.*, 2011; Singh y Shah, 2012). Singh y col. (2011) concluyeron que *AtTPS11* es una enzima TPS-TPP bifuncional basado en la complementación funcional de mutantes *tps1D* y *tps2D* de levadura.

Tabla 1. Transformación genética en plantas con genes de síntesis de trehalosa

Gen	Organismo de origen	Planta	Tolerancia	Referencia
TPS1	Levadura	Tabaco	Sequía	(Holmström <i>et al.</i> , 1996)
OtsA	<i>E. coli</i>	Tabaco	Sequía	Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1998; Garg <i>et al.</i> , 2002)
TPS1	Levadura	Papa	Sequía	(Yeo <i>et al.</i> , 2000)
OtsA- OtsB	<i>E. coli</i>	Arroz	Sequía, salinidad, bajas temperaturas	(Garg <i>et al.</i> , 2002)
TPS1	Levadura	Tomate	Sequía, salinidad	(Cortina y Culiañez-Macia, 2005)
TPS1	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	Sequía	(Avonce <i>et al.</i> , 2004)
TPS1- TPS2	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	Sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas	(Miranda <i>et al.</i> , 2007)
TPS1- TPS2	Levadura	Alfalfa	Sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas	(Suárez <i>et al.</i> , 2009)

TPS1-	<i>E. coli</i>	Tomate	Sequía, salinidad	(Lyu <i>et al.</i> , 2013)
TPS2				
TPS11	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	Resistencia a	Singh <i>et al.</i> , 2011
			<i>Myzus persicae</i>	

Previo a este trabajo de investigación, en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas (CEIB) se obtuvieron líneas homocigas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreproductoras de trehalosa. Estas líneas presentan diferentes niveles de expresión de la fusión génica *TPS-TPP* bajo el promotor RD29A inducible por estrés y fueron obtenidas mediante transformación por la vía de *Agrobacterium tumefaciens*.

2. Justificación

El cultivo de tomate es sumamente importante tanto en México como a nivel mundial, la productividad agrícola de esta hortaliza se encuentra afectada por el cambio climático, las plagas y diversas enfermedades. Entre los factores bióticos que sobresalen como agentes de enfermedades de *S. lycopersicum* son las causadas por bacterias (Hernández-Romano *et al.*, 2019), fanerógamas parásitas, fitoplasmas, virus, viroides, nematodos, insectos y hongos, que por su gran diversidad de especies y hospedantes son los patógenos que pueden causar pérdidas económicas más importantes a nivel mundial (Agrios, 2005). Entre los organismos que ocasionan estas enfermedades destacan los hongos como son *Botrytis cinerea*, *Alternaria dauci* f. *solana*, *Laveillula taurina*, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016).

Los suelos enfrentan procesos de salinización cuando el manejo de éstos y del agua no es adecuado, lo cual ha ocasionado que el 13% de la tierra irrigada en México esté afectada por este factor (Flowers, 1999). Una parte importante de la producción de hortalizas de exportación como el tomate se lleva a cabo precisamente en varias zonas del norte del país. El tomate es uno de los productos agrícolas mexicanos más importante y el 85% de su producción tiene origen en sistemas con irrigación (SIAP, 2016). El tomate es considerado como planta moderadamente sensible a salinidad y sus rendimientos disminuyen a valores de conductividad eléctrica altos (Maas y Hoffman, 1977).

Se ha demostrado que la trehalosa actúa como un osmoprotector de moléculas biológicas que permite a las plantas contender contra el estrés abiótico; además existen

evidencias de que puede intervenir en la resistencia a patógenos fungales y bacterianos. Estas propiedades de la trehalosa están poco estudiadas en plantas de tomate y se hace sumamente importante determinar el papel que juega en líneas homocigas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreproductoras de trehalosa sometidas a estrés biótico y abiótico.

3. Hipótesis

La sobreacumulación de trehalosa, en plantas transgénicas de *S. lycopersicum* incrementa la tolerancia a los diferentes estreses bióticos y abióticos a los cuales se enfrentan las plantas de tomate.

4. Objetivos

Objetivo general

- Determinar el efecto de la sobreacumulación de trehalosa en tomate ante condiciones de estrés biótico y abiótico.

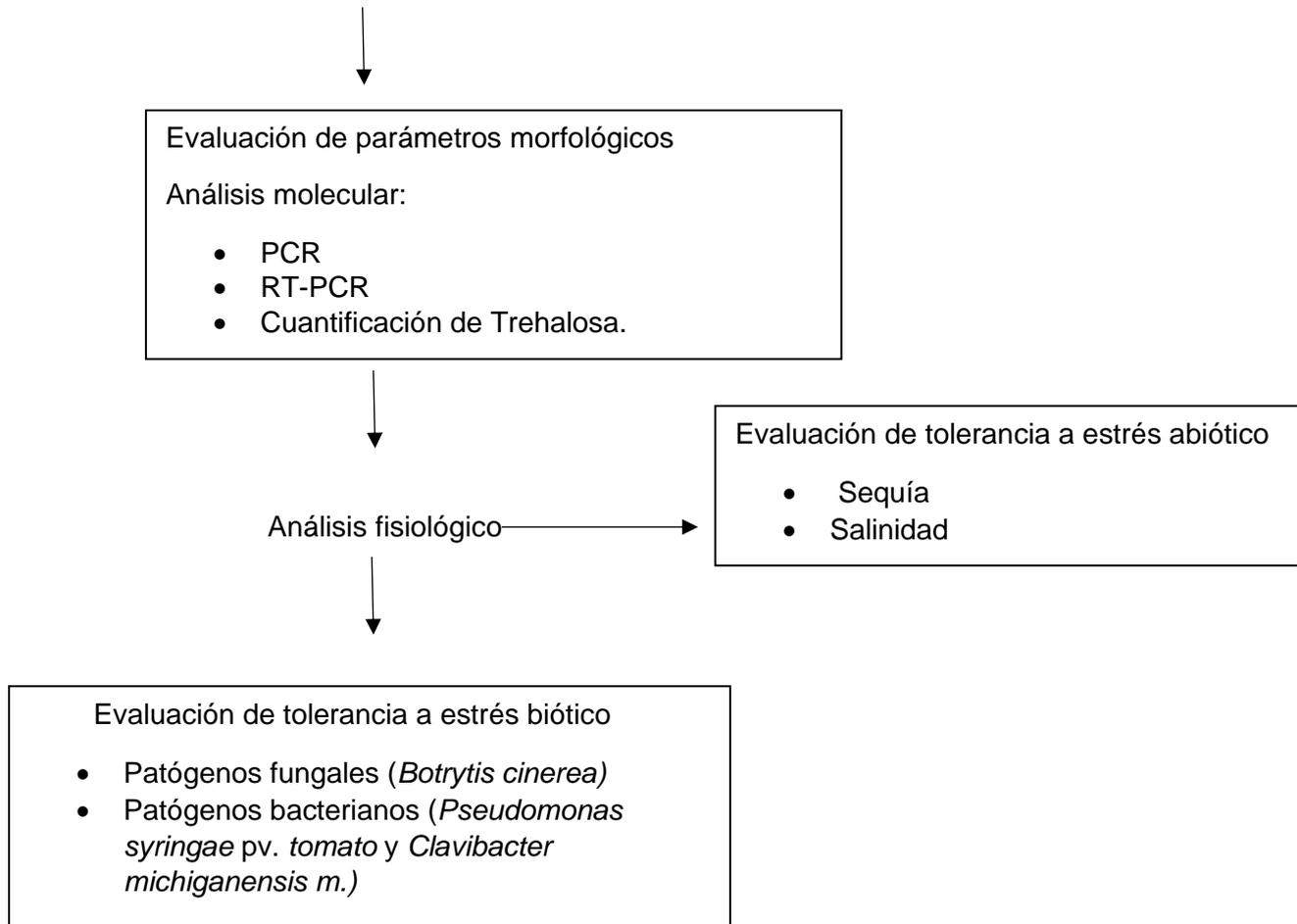
Objetivos específicos

1. Corroborar por técnicas moleculares la inserción (PCR) y funcionalidad (RT-PCR) del transgén en las líneas transgénicas de tomate.
2. Cuantificar los niveles de trehalosa en las plantas transgénicas de *S. lycopersicum*.
3. Evaluar la tolerancia al estrés abiótico en las líneas homocigas.
4. Evaluar la capacidad de resistencia a patógenos fungales y bacterianos en plantas de tomate.

5. Estrategia metodológica

Caracterización de líneas homocigas RD-TPS-TPP

Líneas homocigas de *S. lycopersicum*



6. Materiales y métodos

6.1. Material vegetal

En este estudio se utilizaron las líneas homocigas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreproductoras de trehalosa (líneas 1, 4 y 5) generadas en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas (CEIB). Estas líneas presentan diferentes niveles de expresión de la fusión génica *TPS-TPP* bajo el promotor RD29A inducible por estrés. Las líneas transgénicas de tomate fueron obtenidas mediante transformación mediada por *A. tumefaciens* LBA4404.

6.2. Análisis molecular de las plantas transformadas

6.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Allen *et al.*, 2006). Se homogenizaron 200 mg de tejido vegetal con 500 µL de solución buffer de CTAB, se incubó durante 15 min a 55°C, luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, después se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionaron 250 µL de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 min, nuevamente la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al cual se le añadieron 50 µL de acetato de amonio (7.5M) seguido de 500 µL de etanol absoluto frío, y se mezcló por inversión hasta precipitar el ADN. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN 3 veces con 500 µL de etanol frío al 70% y centrifugando a 13 000 rpm durante 1 min y eliminando el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla de ADN durante 15 min y se re-suspendió en 50 µL de TE-RNAsa (10 µg/mL). Las muestras de ADN se incubaron a 65°C durante 20 min y finalmente almacenadas a -20°C hasta su utilización en las reacciones de PCR.

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

6.2.2. PCR (ADN)

A partir de ADN genómico de tejido fresco de hoja de plantas de tomate silvestre (Wt) y líneas transgénicas se verificó la inserción del gen marcador de la neomicina fosfotransferasa (NPTII) y de la fusión génica *TPS-TPP*. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos: 5'-GAACAAGATGGATTGTTGCACGC y 5'-

GAAGAACTCGTCAAGAAG. El programa utilizado para la amplificación del transgén se describe a continuación, un ciclo a 94°C por 3 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C por 45 seg, 72°C por 1 min; y finalmente un ciclo a 72°C por 5 min.

6.3 Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tomate en condiciones normales

6.3.1. Parámetros vegetativos

Se evaluaron las variables altura de la planta, longitud de la raíz, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco tanto en las líneas transgénicas de tomate como en la silvestre en condiciones normales sin estrés, se tomaron 10 plantas de 5 semanas de edad por línea para las mediciones. A cada individuo se le retiró el exceso de sustrato adherido a la raíz con sumo cuidado de mantener la mayor cantidad de estas 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. Todas las variables fueron graficadas y se les realizó un análisis estadístico.

6.3.2 Producción de semillas y peso de los frutos

Para este análisis se cortaron frutos maduros de cada una de las líneas transgénicas para analizar el número de semillas presentes durante la etapa de reproducción, así como su morfología, peso y compararlos con la línea silvestre. Se tomaron de cada línea 3 plantas y se analizaron 10 frutos de cada una de estas. El peso de los frutos y la cantidad de semillas fueron graficados y se les realizó un análisis estadístico.

6.4 Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía, salinidad y azúcares exógenos

Para la evaluación de la germinación, las diferentes líneas transgénicas fueron colocadas en medio MS (Murashige y Skoog) suplementado con 35 y 50 mM de Cloruro de Sodio (NaCl) para el estrés salino, para el estrés osmótico se utilizó sorbitol a 70 y 100 mM y además en MS con sacarosa y trehalosa (10 y 20 mM). Las semillas fueron incubadas a 22°C con fotoperiodo 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.

6.5 Pruebas de estrés abiótico en plantas transgénicas de tomate

6.5.1. Inducción al estrés oxidativo empleando el agente químico Paraquat

Las plantas de 5 semanas de edad (Wt y líneas transgénicas) fueron asperjadas con 10 ml de solución de Paraquat (100 μ M) para inducir estrés oxidativo y poder observar el efecto en las plantas completas; el daño en las plantas fue monitoreado visualmente para 2 semanas, usando cinco réplicas (de tres individuos) de cada una de las líneas transgénicas y Wt.

6.5.2 Determinación de la 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 5 semanas. Los discos fueron colocados en placas de ELISA de 6 pozos que contengan 0, 3 y 6 μ M de MV y posteriormente se incubaron a 25°C por 72h bajo luz continua. El efecto del MV se analizó monitoreando los cambios fenotípicos cualitativos y documentándolos fotográficamente.

6.5.3 Tolerancia a estrés por salinidad y sequía

Para evaluar la tolerancia a estrés salino e hídrico, se analizaron plantas transgénicas que sobreexpresan la trehalosa, así como plantas silvestres de tomate de 5 semanas de edad, las cuales fueron regadas con una solución salina de 250 mM de cloruro de sodio (NaCl) y otro grupo se le suspendió el riego hasta que el porcentaje de agua en el suelo fuera inferior al 15%. Los ensayos se realizaron en condiciones de invernadero en donde los lotes de plantas se mantuvieron con ambos estreses por separado por 2 semanas y al término de este periodo se les realizó la medición de dos parámetros:

6.5.3.1 Contenido de clorofila.

La extracción de clorofila se llevó a cabo por el método descrito por Lichtenthaler y Wellburn en 1983, a partir de discos de hojas, empleando metanol al 100% para su extracción. La micro extracción se realizó manteniendo las muestras en hielo y la mínima cantidad de luz posible. Los discos de hojas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5mL, se adicionó 1mL de metanol frío y se maceró el tejido vegetal hasta su homogenización,

las muestras se centrifugaron durante 5min a una velocidad máxima de 4500rpm, después el sobrenadante se colocó en celdas para espectrofotómetro las cuales se mantuvieron en hielo y en oscuridad hasta la determinación de la lectura en el espectrofotómetro. Para el contenido de clorofila se determinó su absorbancia en dos longitudes de onda 665.2 y 652nm y su contenido (mg/L) mediante las siguientes fórmulas:

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

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

$$\text{Chla+b} = 22.12 * A_{652} - 2.71 * A_{665.2}$$

6.5.3.2 Contenido de malondialdehído (MDA).

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

$$\text{CMDA} = ((A_{535} - A_{600})1\text{mmol}/1.56*105\text{mL}) \times (106/1\text{mmol}) \times (1\text{mL}/0.1\text{g})$$

6.6 Pruebas de tolerancia a estrés biótico en plantas transgénicas

6.6.1. Infección con hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* B05.10

Empleando hojas jóvenes y saludables de 5 semanas de edad crecidas sobre sustrato fueron cortadas y retadas contra el patógeno fúngico *B. cinerea* B05.10. El hongo se creció en placas de agar papa dextrosa (PDA). Cuando el micelio alcanzó la orilla de la placa, se cortaron discos de agar y fueron 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 se colocaron 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.

6.6.2 Infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Se realizó la desinfección de semillas de tomate con jabón líquido y agua destilada estéril en relación 1:39 y se remojaron en una solución de NaClO al 3% durante 5 min al cabo de los cuales se realizarán tres enjuagues para su eliminación. Las semillas fueron puestas toda la noche en agua destilada para romper la dormancia.

La germinación de las semillas se llevó a cabo por colocación de estas en medio basal Murashige Skoog contenido en cajas magenta y luego fueron trasplantadas a maceta. En cada maceta se colocaron 3 plántulas. Se usaron 12 repeticiones por cada línea y para su crecimiento se colocarán bajo fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a 27±1 °C.

Después de 5 semanas de crecimiento, las plantas se inocularon por aspersión hasta punto de gota (para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) y se inocularon en el tallo usando una jeringa con 100 µL (para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) de una suspensión bacteriana a una concentración de 1x10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, la cual se obtuvo por inoculación de una asada de las cepas en tubos de 5 mL de LB con rifampicina y ácido nalidíxico, para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* respectivamente; con posterior agitación constante a 200 rpm durante 24 y 48h, a 28 y 30°C respectivamente; para la inoculación las células se lavaron 3 veces en sulfato de magnesio 10mM y se resuspendieron en esta misma solución. Posteriormente, las plantas fueron colocadas en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad, a 27±1 °C, hasta la aparición de lesiones características en las hojas por el ataque de cada patógeno.

Para la confirmación del daño ocasionado por las bacterias, se realizó el reaislamiento del patógeno mediante la técnica modificada de Agrios (1997).

6.7. Extracción de ARN y síntesis de cADN

Se analizaron plantas transgénicas que sobreacumulan trehalosa, así como plantas silvestres de tomate de 5 semanas de edad, las cuales fueron sometidas a estrés

(regadas con una solución salina de 250 mM de cloruro de sodio (NaCl), sequía y estrés biótico). El ensayo se realizó en condiciones de invernadero en donde las plantas se mantuvieron con estrés por 2 semanas y al término de este periodo se les realizó la medición. Se realizó la extracción de ARN total de cada muestra utilizando el reactivo Trizol® y siguiendo el protocolo de fabricante (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) en cinco fases. 1) Homogenización: Se pulverizaron ~100mg de material vegetal con nitrógeno líquido. Se homogenizó el material vegetal con 1mL de Trizol y se incubó a temperatura ambiente de 2-3 minutos. Se centrifugó la muestra por 10 min a 12 000rpm a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf. 2) Separación: Se adicionaron 200µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Se centrifugó la muestra por 15 min a 12 000rpm a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf. 3) Precipitación: Se adicionaron 500µL de isopropanol, se agitó y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min, después se centrifugaron por 10 min a 12 000rpm a 4°C. 4) Lavado: Se eliminó el sobrenadante, y el pellet de ARN se lavó con 1mL de etanol al 75%, posteriormente la muestra se agitó por vortex y se centrifugó por 5 min a 7 500rpm a 4°C. 5) Resuspensión: se dejó secar el pellet de ARN en un flujo de aire de 5- 10 min, finalmente se disolvió el pellet en 20µL en agua libre de RNasas (DEPC), se incubaron las muestras por 10 min a 55°C y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Después de obtener el ARN, se realizó un tratamiento para eliminar trazas de ADN genómico en la muestra. A partir de una alícuota de 2µg de ARN se realizó un tratamiento con DNasa I (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific), adicionando 1µL de Buffer 10X adicionado con MgCl₂, 0.5µL de DNasa I, y ajustando hasta 10µL con agua tratada con DEPC. Se incubaron las muestras a 37°C por 30 min, posteriormente se adicionó 1µL de EDTA (50mM) y se incubaron posteriormente a 65°C por 10 min. Finalmente se realizó la síntesis de la primera cadena de cADN siguiendo el kit RT-PCR (FERMENTAS). Se tomó 1µL de ARN tratado con DNasa, y se adicionó 1µL del primer oligo (dT), y se ajustó hasta un volumen de 12µL con agua DEPC, se mezcló gentilmente y las muestras se incubaron a 65°C por 5 min, después las muestras se enfriaron en hielo y mezclaron para posteriormente adicionar 4µL de solución Buffer 5X, enzima inhibidora de RNasas (RiboLock) 1µL, solución de dNTP (10mM) 2µL, transcriptasa reversa 1µL, obteniendo un volumen final de 20µL. Se incubaron las muestras a 42°C por 60 min y para terminar la reacción se incubaron nuevamente a 70°C por 5min. Cada muestra fue almacenada a -80°C hasta su posterior uso.

6.7.1 Análisis de expresión (RT-PCR y qRT-PCR)

Para evaluar los niveles de expresión de la fusión génica *TPS-TPP* en las diferentes líneas transformadas de *S. lycopersicum*, se realizó RT-PCR semicuantitativo y qRT-PCR para todas las líneas en los diferentes estreses ensayados (salinidad, sequía, ataque de patógenos). El programa utilizado para la amplificación del transgén se describe a continuación, un ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 45 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 45 seg; y finalmente un ciclo a 72°C por 5 min. Los niveles de expresión se normalizaron en base a la expresión del factor de elongación 1 α (EF1 α) de tomate, empleando oligonucleótidos específicos (Giorno *et al.*, 2010) y utilizando el siguiente programa para la amplificación: un ciclo a 94°C por 5 min; 25 ciclos a 94°C por 45 seg, 58°C por 45 seg, 72°C por 45 seg; y finalmente un ciclo a 72°C por 5 min.

En el PCR cuantitativo los niveles de expresión fueron calculados con el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Las reacciones se llevaron a cabo en un formato de 96 pozos con el sistema PCR tiempo real 7300 y el software del sistema 7300.

6.8. Cuantificación de los contenidos de trehalosa

Se analizaron plantas transgénicas que sobreacumulan trehalosa, así como plantas silvestres de tomate de 5 semanas de edad, las cuales fueron sometidas a estrés (regadas con una solución salina de 250 mM de cloruro de sodio (NaCl), sequía y estrés biótico). Para la determinación de trehalosa en plantas se emplearon 200 mg de tejido vegetal fresco (correspondientes a 5 individuos) que se maceraron en nitrógeno líquido y se resuspendieron en 1 mL de Etanol 80% (v/v). Posteriormente se incubaron a 80°C durante 5 min y se centrifugaron a 14000 rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se secó y posteriormente se resuspendió en 500 μ L de agua estéril grado HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) y se filtró empleando filtros de nylon de 0.2 μ m (Vázquez-Ortiz y Valenzuela-Soto, 2004). Las muestras se analizaron empleando una columna Supelcosil LC-NH₂ (Sigma Aldrich) con una fase móvil de acetonitrilo:agua (80:20 v/v) y un flujo de 1mL/min. Se realizó un estándar de trehalosa partiendo de 0.0625 mg/mL hasta 4 mg/mL, para la construcción de la curva de calibración se tomaron 10 μ L de cada punto de la curva que fue de 0.625 a 40 μ g. Las determinaciones de las muestras se realizaron por triplicado empleando un volumen de inyección de 10 μ L.

7 Resultados

7.1 Análisis molecular de las plantas transformadas

Para corroborar que las líneas de tomate empleadas en el estudio eran transgénicas se realizó la amplificación del gen de resistencia a kanamicina NPTII y el fragmento TPP de la fusión TPS-TPP. Se observa la amplificación positiva del gen de selección NPTII y TPP, a partir de ADN genómico de cada una de las líneas transgénicas de tomate, además se corrobora que en la línea silvestre (Wt) no hay amplificación del gen (Figura 4).

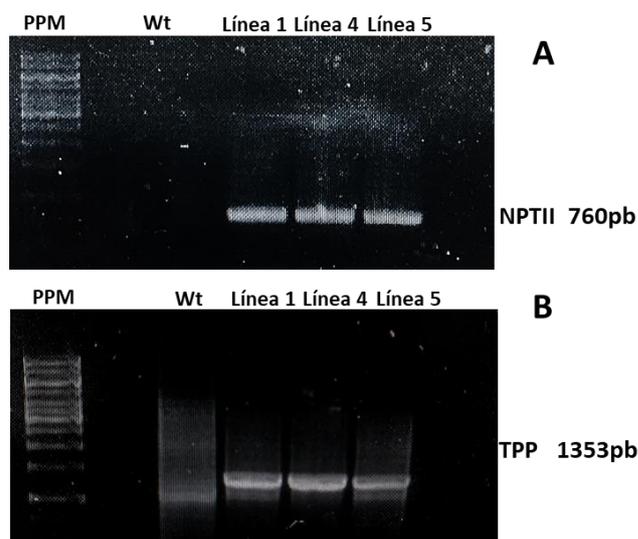


Figura 7. Análisis por PCR de las plantas de tomate. A. Amplificación del gen marcador NPTII. B. Amplificación del fragmento TPP de las diferentes líneas transgénicas.

7.2 Parámetros morfológicos evaluados en plantas de tomate en condiciones normales

Para evaluar el efecto de la sobreproducción de trehalosa en los parámetros morfológicos de las plantas se analizaron: el peso fresco y seco, altura de la planta, longitud de la raíz, diámetro del tallo, peso del fruto y el número de semillas por fruto en las líneas transgénicas 1, 4 y 5 con respecto a la línea silvestre. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas transgénicas y la línea silvestre para los parámetros evaluados, excepto en el peso del fruto donde se obtuvo que la línea 5 posee frutos de mayor peso que la silvestre (Figura 5).

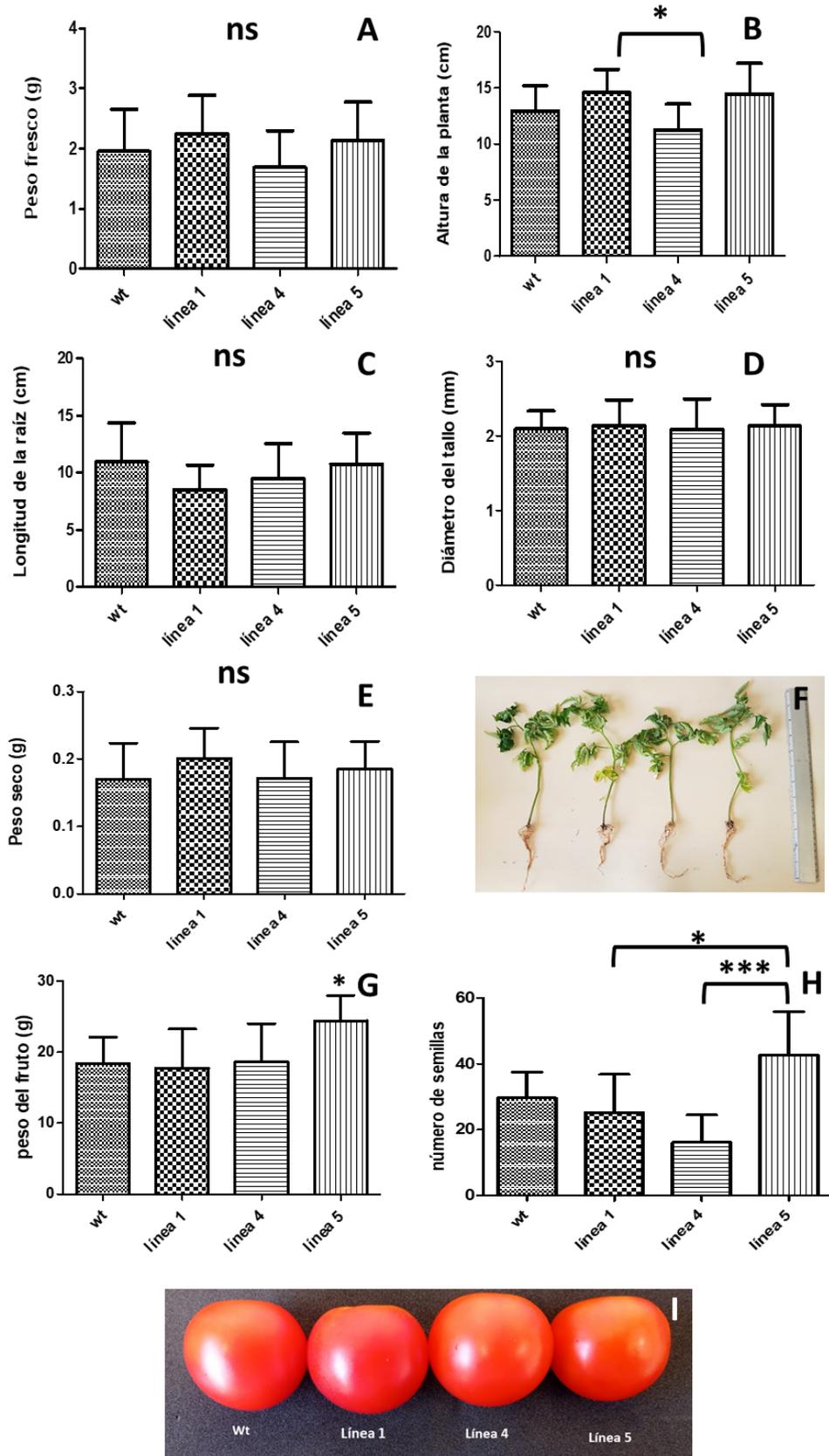


Figura 5. Características fenotípicas de las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A**. Peso fresco de las líneas transgénicas y la

línea silvestre. **B.** Altura de la planta de las líneas transgénicas y la línea silvestre. **C.** Altura de la planta de las líneas transgénicas y la línea silvestre. **D.** Diámetro del tallo de las líneas transgénicas y la línea silvestre. **E.** Peso seco de las líneas transgénicas y la línea silvestre. **F.** Fenotipo de las líneas transgénicas y la línea silvestre en condiciones normales. **G.** Peso del fruto de las líneas transgénicas y la línea silvestre. **H.** Número de semillas por fruto de las líneas transgénicas y la línea silvestre. **I.** Fenotipo de los frutos de las líneas transgénicas y la línea silvestre en condiciones normales. Los valores representan la media de 10 muestras, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 10 repeticiones.

7.3. Evaluación del efecto de la sobreproducción de trehalosa en líneas homocigas de tomate en condiciones de estrés

Para evaluar el efecto de la sobreproducción de trehalosa sobre la tolerancia en condiciones de estrés biótico y abiótico se emplearon plantas de tomate de 5 semanas de edad de las líneas homocigas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreproductoras de trehalosa, así como la línea silvestre Wt.

Se determinó la susceptibilidad a la infección por el hongo *B. cinerea* y a la infección por las bacterias *P. syringae* y *C. michiganensis* m.. Se evaluó el efecto de la salinidad empleando el contenido de clorofila y MDA como indicadores para determinar el efecto negativo que causa este estrés, se miden estos porque cambios en esos parámetros afectan de manera significativa los procesos fotosintéticos y son señal de posibles daños en las membranas celulares. Además, el efecto del herbicida Paraquat también se evaluó, así como es de su compuesto activo el metil-viológeno (MV), estos ocasionan un fuerte estrés oxidativo en plantas.

7.3.1 Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía y salinidad

En los resultados obtenidos en el experimento se puede observar que en condiciones normales de crecimiento la línea transgénica 4 presenta emergencia de radícula en el 100% de las semillas incluidas en el estudio en menor tiempo con respecto a las demás líneas, en el día 5 esta línea transgénica 4 ya presentaba 16.6% mientras que las demás líneas presentaron 0% de germinación (Figura 6A); además en los otros días evaluados se obtuvo un porcentaje de germinación mayor para la línea transgénica 4 con valores

de 96.6% a los 10 días y 100% a los 15 días, mientras que en las otras líneas se reportó en el día 10 para la línea silvestre 83.3%, para la línea 1, 63.3% y para la línea 5, 86.66%; mientras que el día 15 se obtuvieron para la línea silvestre 86.6%, para la línea 1, 86.6% y para la línea 5, 93.3%.

En condiciones de estrés salino (NaCl) se observó una disminución en la germinación tanto en las líneas transgénicas como para la línea silvestre para ambas concentraciones evaluadas (Figura 6A), se observó que para el día 5 ninguna línea presenta diferencias significativas porque el estrés aplicado retrasó la germinación y aun el día 5 todas las líneas mostraron 0% de germinación. El día 10 a 35 mM de NaCl (Figura 6A) la línea silvestre y la transgénica 5 no presentaron diferencias significativas (36.66% para respectivamente), mientras que la línea transgénica 1 y la 4 presentaron un porcentaje de germinación estadísticamente diferente, el caso de la línea 1 se observó el menor porcentaje en estas condiciones con 13.3%, mientras que la línea transgénica 4 presentó el mayor porcentaje de germinación con 70%. El día 15 de estas mismas condiciones se obtuvo un mayor porcentaje de germinación en la línea 4 con 83.33% valor significativamente diferente a los obtenidos para las demás líneas que fueron de 40, 46.6 y 56.6% para la línea silvestre, y las líneas transgénicas 1 y 5 respectivamente. A una mayor concentración de NaCl (50mM) (Figura 6A) los porcentajes de germinación para todas las líneas presentaron una disminución, excepto para la línea transgénica 4 que mostró valores similares a los obtenidos para 35mM de NaCl. En estas condiciones tanto en el día 10 como en el día 15 la línea transgénica 4 presentó el mayor porcentaje de germinación estadísticamente diferente a los resultados del resto de las líneas; en el día 10 se obtuvieron valores de 16.6, 23.3, 73.3 y 23.3% de germinación para la línea silvestre y las líneas transgénicas 1, 4 y 5 respectivamente; mientras que el día 15 se obtuvieron valores de 16.6, 26.6, 80 y 30% de germinación para la línea silvestre y las líneas transgénicas 1, 4 y 5 respectivamente.

En el estrés osmótico causado por sorbitol (Figura 6B) se observó que para el día 5 ninguna línea presenta diferencias significativas porque el estrés aplicado retrasó la germinación y aun el día 5 todas las líneas mostraron 0% de germinación. En las condiciones de estrés con 70mM de sorbitol (Figura 6B) la línea transgénica 4 presentó mayores porcentajes de germinación y estadísticamente diferente, que el resto de las líneas en todas las condiciones ensayadas. Para el día 10 se obtuvieron valores de 13.3, 6.6, 26.6 y 10% de germinación para la línea silvestre y las líneas transgénicas 1, 4 y 5 respectivamente; mientras que el día 15 se obtuvieron valores de 23.3, 20, 60 y 20% de germinación para la línea silvestre y las líneas transgénicas 1, 4 y 5 respectivamente. A una mayor concentración de sorbitol (100mM) (Figura 6B) los porcentajes de

germinación para todas las líneas presentaron una disminución. En estas condiciones tanto en el día 10 como en el día 15 la línea transgénica 4 presentó el mayor porcentaje de germinación, estadísticamente diferente (solo el día 15) a los resultados del resto de las líneas; en el día 10 se obtuvieron valores de 10, 3.3, 20 y 10% de germinación para la línea silvestre y las líneas transgénicas 1, 4 y 5 respectivamente; mientras que el día 15 se obtuvieron valores de 13.3, 3.3, 40 y 13.3% de germinación para la línea silvestre y las líneas transgénicas 1, 4 y 5 respectivamente.

En las condiciones experimentales donde se añadió al medio azúcares, para determinar el efecto de estos azúcares exógenos sobre la germinación podemos observar que los tiempos de germinación fueron menores de manera general en todas las líneas (Figura 6C), teniendo emergencia de radícula desde el día 3 en las condiciones que se administró trehalosa exógena. En la figura 6C se puede observar que la germinación en el medio con sacarosa añadida se retrasó en las líneas transgénicas 1 y 5 en comparación con las líneas 4 y silvestre; alcanzando al final del experimento valores similares, donde la línea 4 presenta los mayores porcentajes de germinación en todos los tiempos analizados 35% desde el día 4 y un 100% al final del experimento en el día 10. En las condiciones con 10mM de trehalosa se puede observar que se reportan emergencia de la radícula desde el día 3 para la línea silvestre y la línea transgénica 4 con 5 y 10% de las semillas germinadas. En esta condición también se puede observar que la germinación en las líneas 1 y 5 se retrasó, pero luego se observa un aumento en el porcentaje considerable alcanzando valores similares e incluso mayores que la línea silvestre que comenzó a germinar antes. En estas condiciones la línea 4 presenta los mayores porcentajes de germinación en todos los tiempos analizados 20% desde el día 4 y un 100% al final del experimento en el día 10. Para las condiciones ensayadas con 20mM de trehalosa el comportamiento de las diferentes líneas es similar a lo descrito para las otras condiciones en presencia de azúcar en el medio, reportando para este ensayo que los porcentajes de germinación de las líneas transgénicas son mayores al de la línea silvestre para el día 10, siendo la línea 4 la que mayores porcentajes presenta.

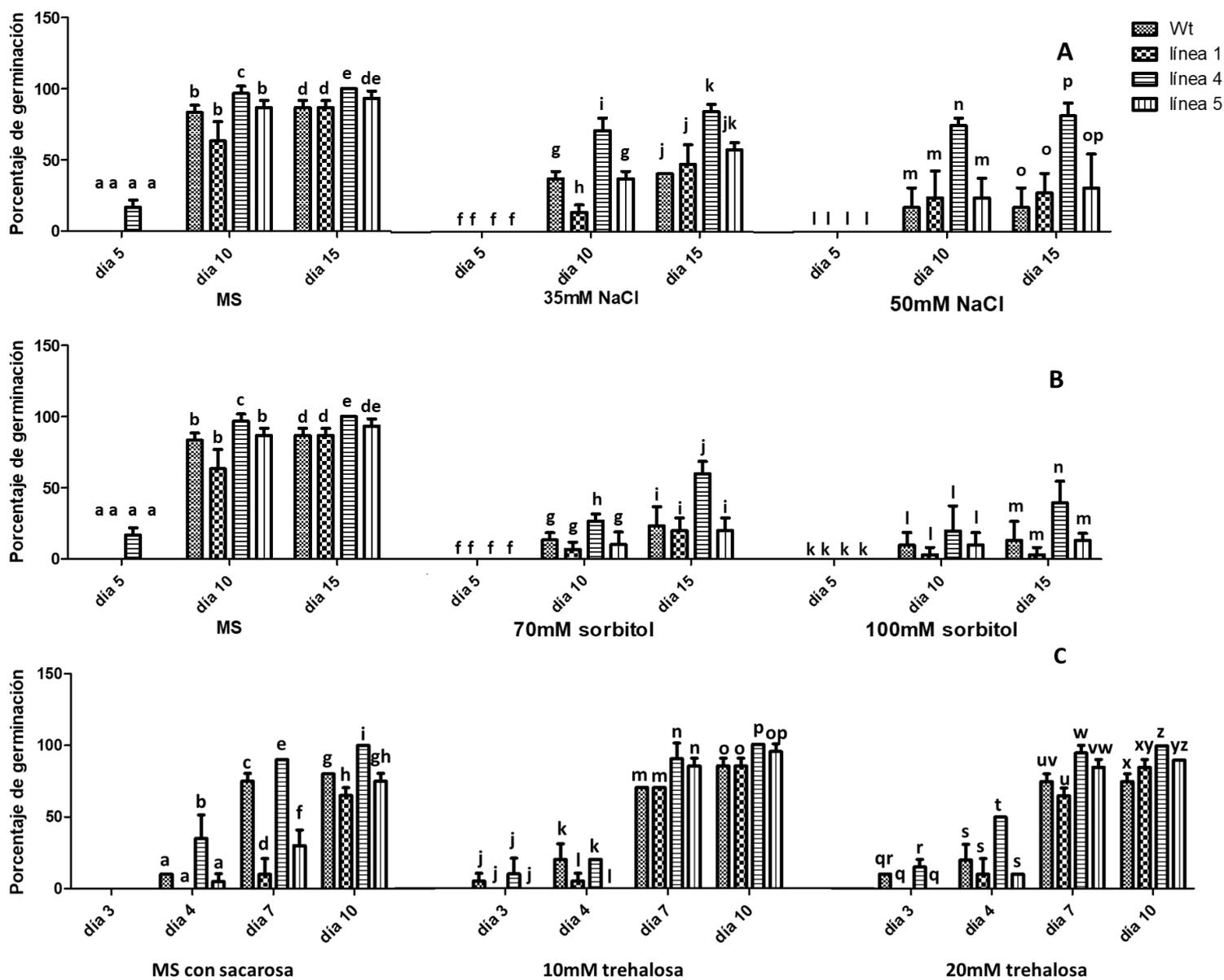


Figura 6. Efecto del estrés en la geminación de las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A.** Porcentaje de germinación sin estrés o control y en condiciones de estrés salino por cloruro de sodio (35 y 50 mM de NaCl). **B.** Porcentaje de germinación sin estrés o control y en condiciones de estrés osmótico por sorbitol (70 y 100 mM de sorbitol). **C.** Porcentaje de germinación con azúcares exógenos: sacarosa y trehalosa (10 y 20 mM). Los valores representan la media de 30 semillas, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía realizado en cada día para todos los tratamientos, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), donde las medias con misma letra no son significativamente diferentes, y las barras de error indican la desviación estándar de 3 réplicas con 10 semillas

7.3.2. Evaluación de la tolerancia al herbicida Paraquat

Se evaluó la tolerancia al herbicida Paraquat en las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5. En las imágenes se observan las plantas control antes de inocular el herbicida, (Figura 7A), se monitoreó fotográficamente a los 5, 8, 12 y 14 días (Figura 7B-E) donde se muestra el daño fisiológico que ocasiona, afectando principalmente la línea transgénica 4. Ocho días después (Figura 7C) se observó que las líneas transgénicas presentan una mayor tolerancia al herbicida, mientras que la línea silvestre presenta un mayor deterioro, resultado que para los 14 días después de la aspersion (Figura 7E) es más evidente excepto en la línea 4. Las líneas transgénicas presentaron mayor tolerancia al estrés oxidativo, por lo que se puede observar que se recuperan mejor.

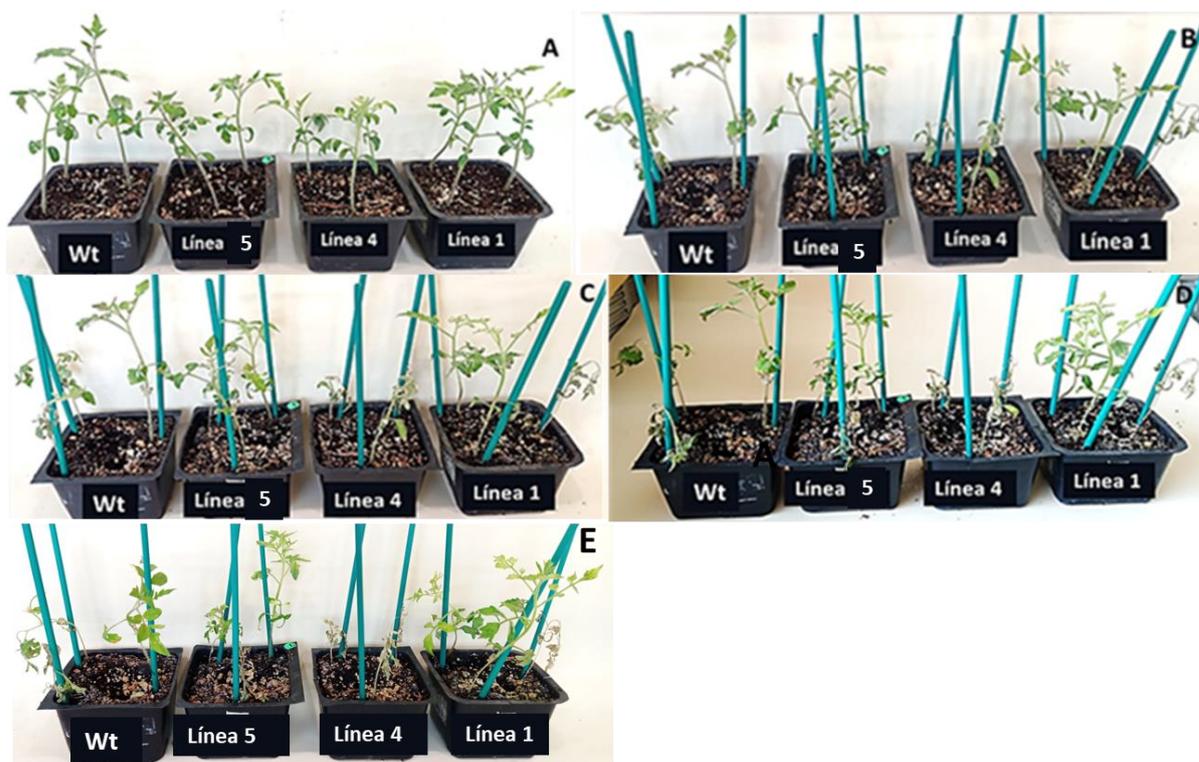


Figura 7. Prueba de tolerancia al herbicida Paraquat en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A.** Plantas control antes de aplicar el herbicida. **B.** Efecto del Paraquat en plantas después de 5 días de su aspersion. **C.** Efecto del Paraquat en plantas después de 8 días de su aspersion. **D.** Efecto del Paraquat en plantas después de 12 días de su aspersion. **E.** Efecto del Paraquat en plantas después de 14 días de su aspersion.

7.3.3. Evaluación de la tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno (MV)

Se evaluó la tolerancia al estrés oxidativo por metil-viológeno (MV) en las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5. Empleando discos de hojas de cada una de estas líneas se obtuvieron los resultados que se observan en la figura 8. En las imágenes se observan los discos de hojas usados como muestras en el día 0 del experimento, donde se puede que la coloración en todas las muestras es semejante (Figura 8), se monitoreó fotográficamente a las 24, 48, 72 y 96 horas y luego a los 7 días (Figura 8) donde se muestra el daño fisiológico que ocasiona, obteniendo la mayor capacidad de tolerar el estrés oxidativo por MV en la línea transgénica 4, en la que se puede observar los discos de color verde aún al final del experimento. En el día 4 (Figura 8) se puede observar las diferencias de las líneas transgénicas con respecto al control, pero son más evidente al día 7 donde se observa decoloración de los discos de hojas de las plantas silvestres e incluso de las líneas transgénicas 1 y 5 (Figura 8), resultado que evidencia que es la línea con mayor tolerancia a estrés oxidativo por MV.

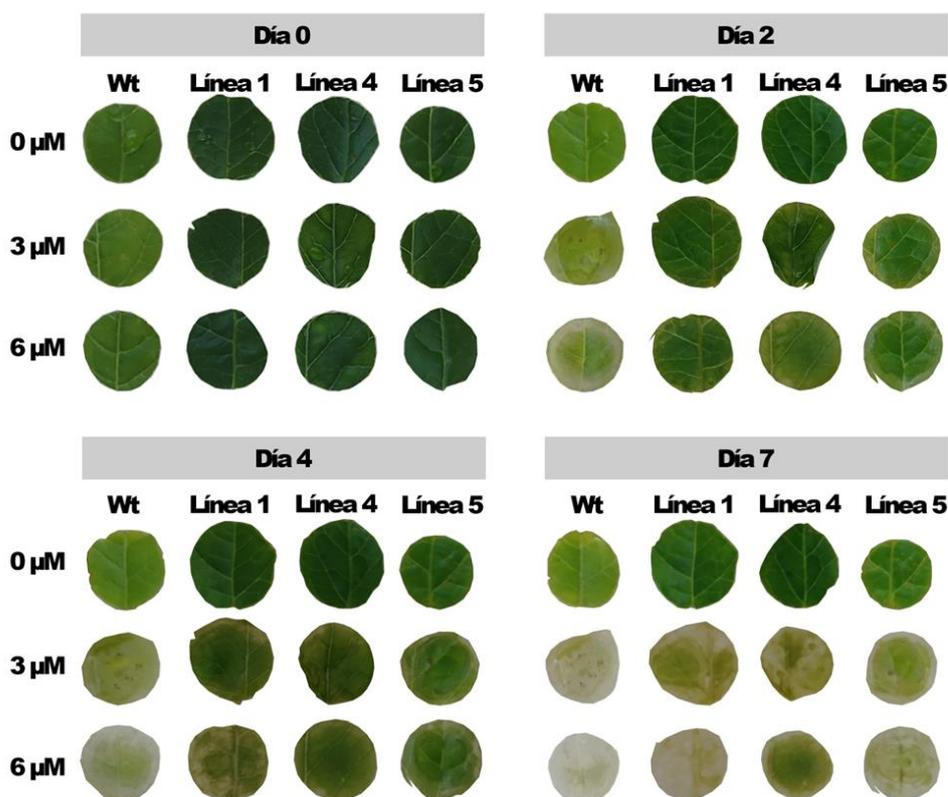


Figura 8. Prueba de tolerancia a estrés oxidativo por metil-viológeno en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa (Líneas 1, 4 y 5) en comparación con la línea silvestre (Wt).

7.3.4. Evaluación de la tolerancia a estrés por salinidad

Las plantas de tomate de cinco semanas de edad, tanto silvestres y transgénicas se crecieron en condiciones de invernadero. Las plantas se sometieron a tratamiento de salinidad con cloruro de sodio, NaCl 250mM, el riego se mantuvo durante 2 semanas, con riegos cada tercer día; se tomaron muestras cada semana para la determinación de parámetros indicadores de estrés. Fenotípicamente se observó daño en las plantas de todas las líneas comparado con las plantas que no fueron sometidas a estrés, pero el daño observado en las plantas de la línea silvestre fue mayor (figura 9 E y F).

7.3.4.1. Determinación del contenido de malondialdehído (MDA) y contenido de clorofilas

En condiciones de crecimiento sin estrés no se observaron diferencias significativas en el contenido de MDA entre las líneas transgénicas y la línea silvestre (Figura 9 D), obteniendo valores de 30.53 nmoles MDA/mgPf; 29.54 nmoles MDA/mgPf; 33.53 nmoles MDA/mgPf; 28.68 nmoles MDA/mgPf en las líneas Wt, 1, 4 y 5 respectivamente. En los experimentos realizados obtuvimos como resultado que las líneas transgénicas tienen un menor contenido de MDA estadísticamente significativo cuando las comparamos con la silvestre en condiciones de estrés salino, este resultado nos indica que existe un aumento en la protección de las membranas celulares inducido por la acumulación de trehalosa (Fig. 9 D). Se observó que la línea 4 presentó menor contenido de MDA (75.2 nmoles MDA/mgPf), seguido por la línea 5 con 88.46 nmoles MDA/mgPf y la línea 1 con 90.11 nmoles MDA/mgPf; siendo la línea silvestre la más afectada significativamente por el estrés oxidativo (126.85 nmoles MDA/mgPf) con respecto a las líneas transgénicas (Figura 9 D).

La disminución de los contenidos de clorofila indica un daño en el aparato fotosintético, causado por el estrés al que es sometida la planta. En este estudio se evaluó el contenido de clorofila en hojas de plantas sin estrés y en plantas sometidas a estrés por salinidad; se observó una disminución en los contenidos de clorofila en las plantas silvestres regadas con 250 mM de NaCl al igual que en plantas de la línea transgénica 1, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 no hubo una baja en la cuantificación de clorofila, lo que nos indicaría un menor daño en el aparato fotosintético causado por el estrés (Fig. 9 A,B y C), pero los datos obtenidos al comparar el comportamiento de todas las líneas no son estadísticamente significativos, solo en algunos casos como se

indica en los gráficos por lo que no podemos reportar los resultados con este indicador como relevante para establecer una comparación entre líneas.

En condiciones de salinidad con riegos de NaCl se observó que las líneas Wt y 1 presentaron una menor concentración de clorofila a (9.43mg/L y 8.93 mg/L) con respecto a las condiciones sin estrés que fueron de 10.73 mg/L y 11.75 mg/L respectivamente, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 los valores de contenido de clorofila a son similares, los obtenidos en las condiciones de estrés fueron de 9.64 y 9.95 mg/L respectivamente; mientras que en condiciones normales fueron de 9.65 y 10.17 mg/L respectivamente (Figura 9 A). El contenido de clorofila b en las líneas Wt y 1 fue menor concentración en condiciones de estrés salino (12.66 mg/L y 12.51 mg/L) con respecto a las condiciones sin estrés que fueron de 13.82 mg/L y 13.63 mg/L respectivamente, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 los valores son mayores, los obtenidos en las condiciones de estrés fueron de 13.21 y 13.95 mg/L respectivamente; mientras que en condiciones normales fueron de 11.75 y 13.45 mg/L respectivamente (Figura 9 B).

El contenido de clorofilas totales en las líneas Wt y 1 fue menor concentración en condiciones de estrés salino (16.48 mg/L y 16.06 mg/L) con respecto a las condiciones sin estrés que fueron de 18.23 mg/L y 18.65 mg/L respectivamente, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 los valores son mayores, los obtenidos en las condiciones de estrés fueron de 17.08 y 17.91 mg/L respectivamente; mientras que en condiciones normales fueron de 15.81 y 17.59 mg/L respectivamente (Figura 9 C).

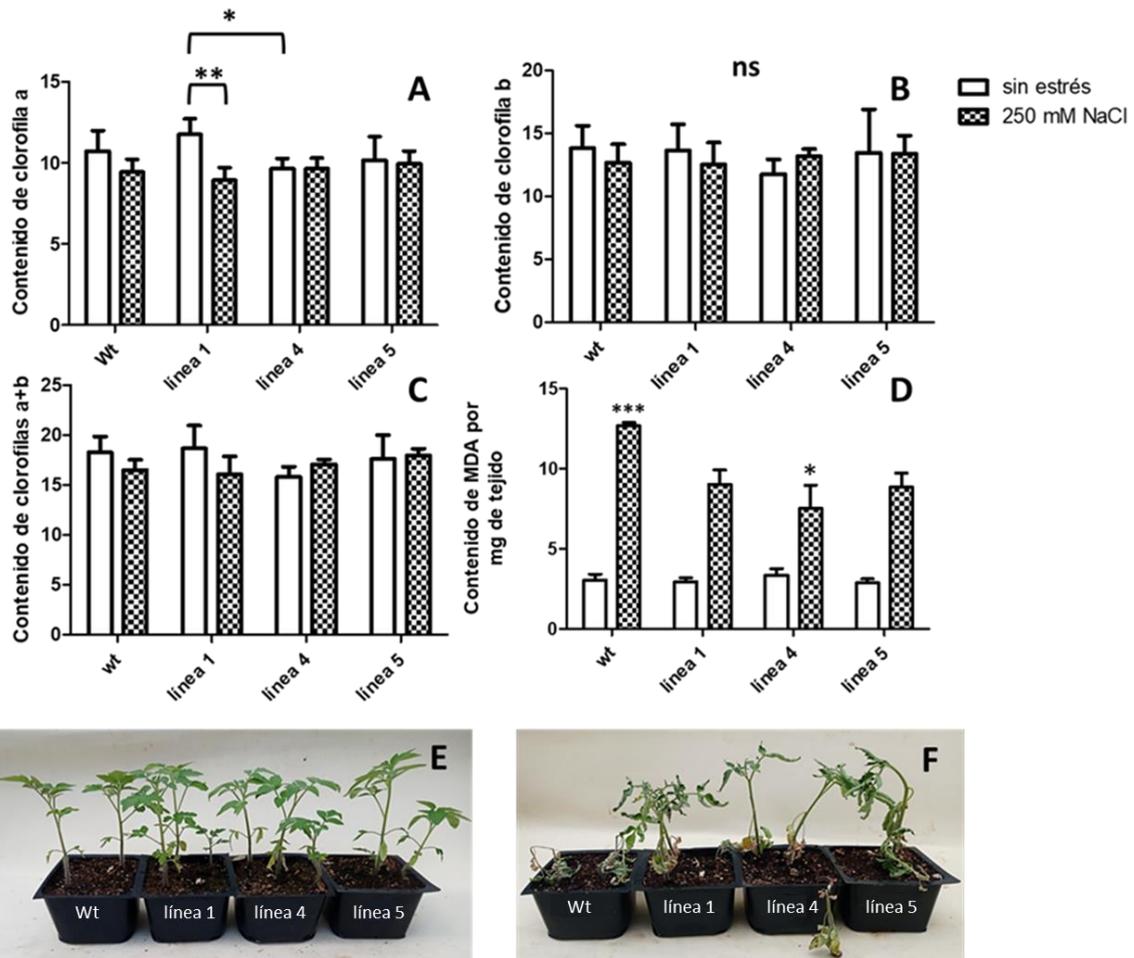


Figura 9. Efecto del estrés salino en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A.** Contenido de clorofila a de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés salino y sin estrés. **B.** Contenido de clorofila b de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés salino y sin estrés. **C.** Contenido de clorofilas totales de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés salino y sin estrés. **D.** Contenido de MDA, de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés salino y sin estrés. **E.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre en condiciones normales. **F.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre en condiciones de estrés salino. Los valores representan la media de 5 plantas, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 5 repeticiones.

7.3.5. Evaluación de la tolerancia a estrés por sequía

Las plantas de tomate de cinco semanas de edad, tanto silvestres y transgénicas se crecieron en condiciones de invernadero. A las plantas se les suspendió el riego hasta

que la humedad del suelo estuvo por debajo del 15% (aproximadamente 2 semanas); se tomaron muestras cada semana para la determinación de parámetros indicadores de estrés. Fenotípicamente se observó daño en las plantas de todas las líneas comparado con las plantas que no fueron sometidas a estrés, pero el daño observado en las plantas de la línea silvestre fue mayor y la recuperación tras el restablecimiento del riego también fue mejor en las líneas transgénicas (figura 10 E, F y G).

7.3.5.1. Determinación del contenido de malondialdehído (MDA) y contenido de clorofilas

En condiciones de crecimiento sin estrés no se observaron diferencias significativas en el contenido de MDA entre las líneas transgénicas y la línea silvestre (Figura 10 D), obteniendo valores de 4.48 nmoles MDA/mgPf; 2.73 nmoles MDA/mgPf; 4.26 nmoles MDA/mgPf; 4.02 nmoles MDA/mgPf en las líneas Wt, 1, 4 y 5 respectivamente. En los experimentos realizados obtuvimos como resultado que las líneas transgénicas tienen un menor contenido de MDA estadísticamente significativo cuando las comparamos con la silvestre en condiciones de estrés por sequía, este resultado nos indica que existe un aumento en la protección de las membranas celulares inducido por la acumulación de trehalosa (Fig. 10 D). Se observó que la línea 5 presentó menor contenido de MDA (12.92 nmoles MDA/mgPf), seguido por la línea 4 con 13.12 nmoles MDA/mgPf y la línea 1 con 17.02 nmoles MDA/mgPf; siendo la línea silvestre la más afectada significativamente por el estrés oxidativo (52.45 nmoles MDA/mgPf) con respecto a las líneas transgénicas (Figura 10 D).

La disminución de los contenidos de clorofila indica un daño en el aparato fotosintético, causado por el estrés al que es sometida la planta. En este estudio se evaluó el contenido de clorofila en hojas de plantas sin estrés y en plantas sometidas a estrés por sequía; se observó una disminución en los contenidos de clorofila en las plantas silvestres estresadas al igual que en plantas de la línea transgénica 1, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 no hubo una baja en la cuantificación de clorofila, incluso en algunas se reporta un incremento, lo que nos indicaría un menor daño en el aparato fotosintético causado por el estrés (Fig. 10 A,B y C).

En condiciones de estrés por sequía se observó que la línea Wt presentó una menor concentración de clorofila a (14.7 mg/L) con respecto a las condiciones sin estrés que fue de 18.05 mg/L, mientras que en las líneas transgénicas 1, 4 y 5 los valores de contenido de clorofila a son similares, los obtenidos en las condiciones de estrés fueron

de 18.31, 18.27 y 17.59 mg/L respectivamente; mientras que en condiciones normales fueron de 18.66, 18.57 y 18.54 mg/L respectivamente (Figura 10 A). El contenido de clorofila b en las líneas Wt y 1 fue menor concentración en condiciones de estrés por sequía (28.29 mg/L y 29.38 mg/L) con respecto a las condiciones sin estrés que fueron de 32.80 mg/L y 32.79 mg/L respectivamente, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 los valores son significativamente mayores, los obtenidos en las condiciones de estrés fueron de 34.69 y 33.87 mg/L respectivamente; mientras que en condiciones normales fueron de 32.92 y 33.07 mg/L respectivamente (Figura 10 B).

El contenido de clorofilas totales en las líneas Wt y 1 fue menor concentración en condiciones de estrés por sequía (33.21 mg/L y 36.21 mg/L) con respecto a las condiciones sin estrés que fueron de 39.07 mg/L y 39.41 mg/L respectivamente, mientras que en las líneas transgénicas 4 y 5 los valores son significativamente mayores, los obtenidos en las condiciones de estrés fueron de 40.85 y 39.75 mg/L respectivamente; mientras que en condiciones normales fueron de 39.47 y 39.58 mg/L respectivamente (Figura 10 C).

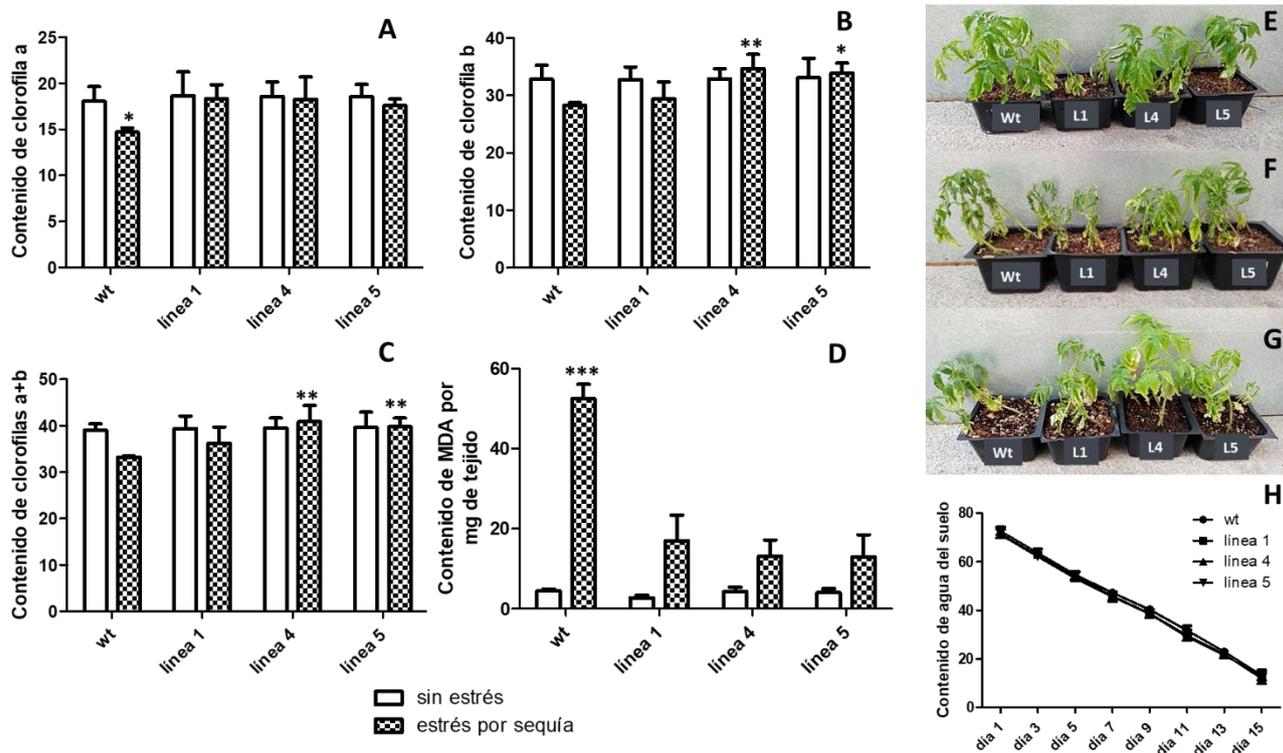


Figura 10. Efecto del estrés por sequía en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A**. Contenido de clorofila a de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés por sequía y sin estrés. **B**. Contenido de clorofila b de las líneas transgénicas sobreproductoras

de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés por sequía y sin estrés. **C.** Contenido de clorofilas totales de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés por sequía y sin estrés. **D.** Contenido de MDA, de las líneas transgénicas sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5, y la línea silvestre en condiciones de estrés por sequía y sin estrés. **E.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre en condiciones normales. **F.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre en condiciones de estrés por sequía. **G.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre tras el restablecimiento del riego. **H.** Contenido de agua en el suelo medido en todo el experimento. Los valores representan la media de 5 plantas, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 5 repeticiones.

7.3.6. Evaluación de la tolerancia ante el estrés biótico

Para determinar como la sobreexpresión de trehalosa en las plantas transgénicas de tomate brindó a las plantas tolerancia ante los patógenos fungales y bacterianos ensayados, se evaluó la infección con *B. cinerea*, *P. syringae* y *C. michiganensis m.*

7.3.6.1. Análisis de infección con micelio del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Se evaluó la tolerancia al patógeno *Botrytis cinerea* en las líneas Wt, 1, 4 y 5. La infección se evaluó durante 5 días. De los datos obtenidos se determinó el porcentaje de infección empleando el software procesador de imágenes IMAGEJ.

En los resultados obtenidos en el experimento de infección por el hongo *Botrytis cinerea* en hojas de tomate podemos observar que para todas las líneas empleadas las hojas que no fueron retadas con el patógeno no presentan daños (Figura 11), lo que nos permite asegurar que el daño que se determina en las muestras retadas corresponde a la acción del patógeno. En la figura 11 se puede observar que el área total de las hojas de la línea Wt se infectó por el patógeno (99.79%), así como en distinta magnitud las líneas transgénicas 1, 4 y 5, obteniéndose 78.19, 50.97, 51.51% de infección respectivamente. La tolerancia más baja al patógeno *Botrytis cinerea* se presentó en la línea 1 mientras que la línea transgénica que mejor contiene el estrés biótico causado por el patógeno es la 4.

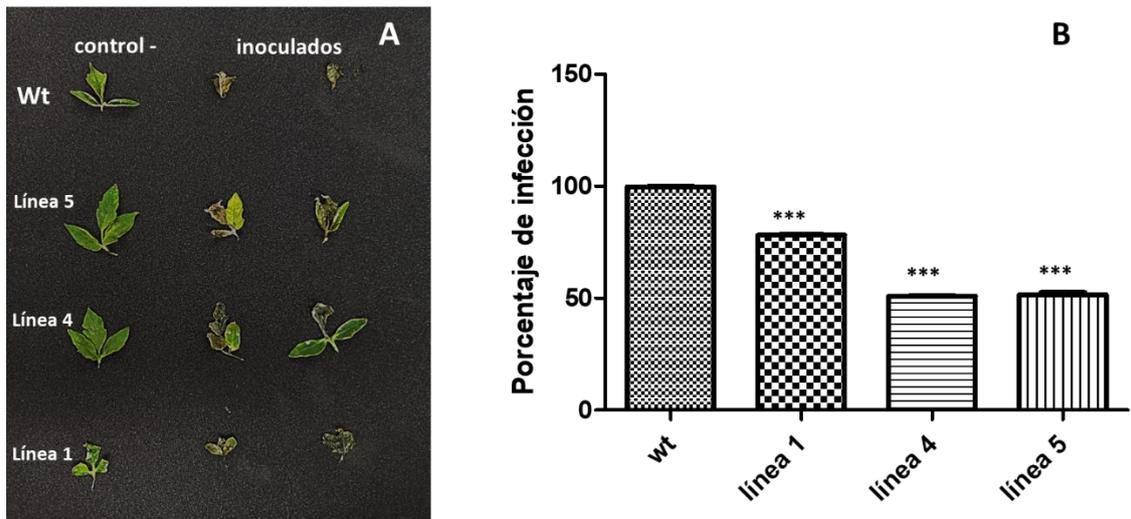


Figura 11. Prueba de tolerancia ante la infección del patógeno *Botrytis cinerea* en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A.** Fenotipo de hojas de plantas transgénicas y silvestre inoculadas con *Botrytis cinerea*. **B.** Porcentaje de infección en hojas de plantas transgénicas y silvestre inoculadas con *Botrytis cinerea*. Los valores representan la media de 3 muestras, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

7.3.6.2. Análisis de infección con *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Psto)

Se evaluó la resistencia al patógeno *Pseudomonas syringae* en las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5. La infección se evaluó durante 13 días. Luego de transcurrido el tiempo de infección se aisló de tejido vegetal de cada una de las líneas infectadas y se sembró en LB con rifampicina, para determinar mediante la siembra de diluciones las unidades formadoras de colonia, para así evaluar la resistencia de cada línea ensayada al patógeno.

Las plantas de las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5 usadas en el experimento presentaron las lesiones características de la infección por Psto (Figura 12C-F). Al realizar el aislamiento no se obtuvo crecimiento en ninguna de las muestras analizadas de las líneas transgénicas, pero no así en las plantas de la línea Wt donde sí se detectaron (Figura 12G), pudiendo cuantificar 27 UFC en la dilución de 10^{-1} (Figura 12H). Demostrando de esta manera que las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5 son resistentes al patógeno *Pseudomonas syringae*.

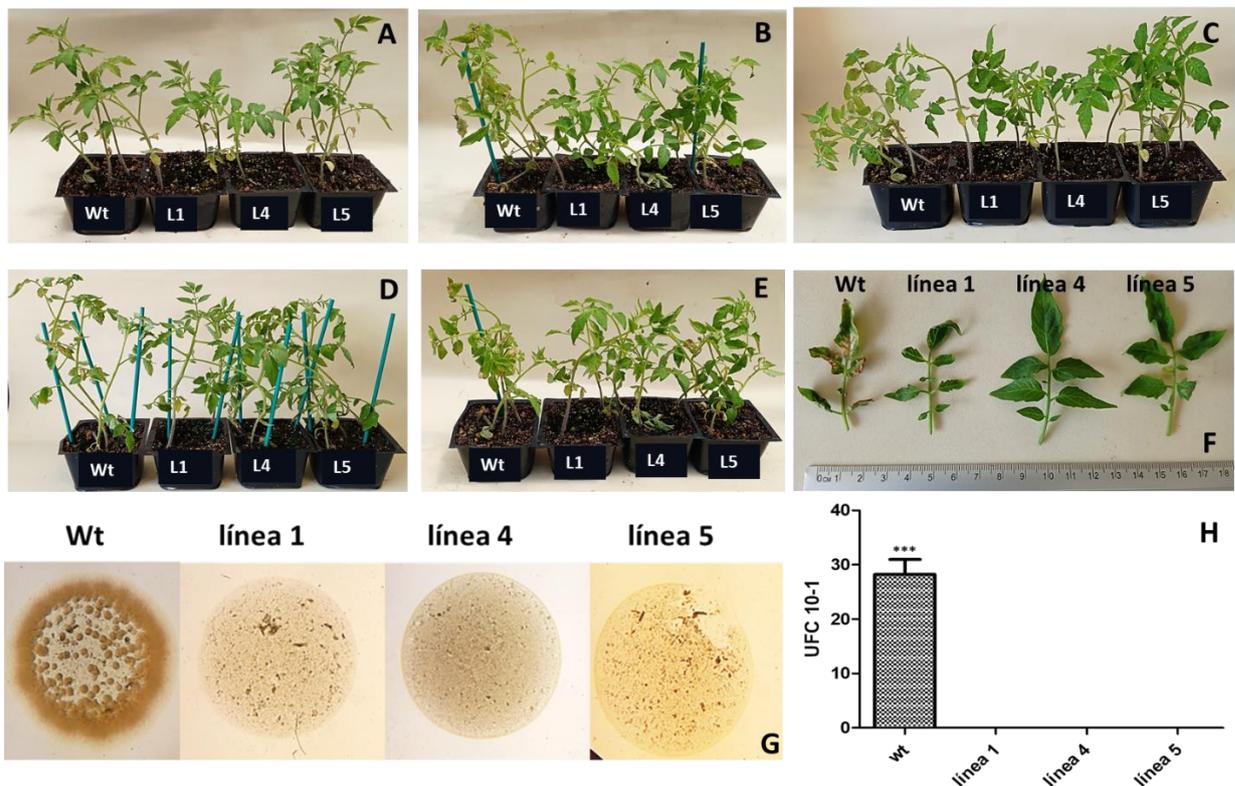


Figura 12. Prueba de tolerancia ante la infección del patógeno *Pseudomonas syringae* en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa en comparación con la línea silvestre. **A.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre sin inocular con *Pseudomonas syringae* **B.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 2 días de inoculadas con *Pseudomonas syringae* **C.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 5 días de inoculadas con *Pseudomonas syringae* **D.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 7 días de inoculadas con *Pseudomonas syringae* **E.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 13 días de inoculadas con *Pseudomonas syringae* **F.** Fenotipo de las hojas de plantas transgénicas y silvestre con 13 días de inoculadas con *Pseudomonas syringae* **G.** Crecimiento en LB con rifampicina de los reaislamientos puros a partir de hoja. **H.** UFC en la dilución de 10⁻¹ de las líneas transgénicas y silvestre. Los valores representan la media de 3 muestras, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

7.3.6.2. Análisis de infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Se evaluó la resistencia al patógeno *Clavibacter michiganensis michiganensis* en las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5. La infección se evaluó durante 13 días. Luego de transcurrido el tiempo de infección se reisoló de tejido vegetal de cada una de las líneas

infectadas y se sembró en LB con ácido nalidíxico, para determinar mediante la siembra de diluciones las unidades formadoras de colonia, para así evaluar la resistencia de cada línea ensayada al patógeno.

Las plantas de las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5 usadas en el experimento presentaron las lesiones características de la infección por *C. michiganensis m.* (Figura 13 C-F). Al realizar el aislamiento se obtuvo menor crecimiento en las muestras analizadas de las líneas transgénicas que en las plantas de la línea Wt (Figura 13 G), pudiendo cuantificar 146, 22, 0 y 11 UFC en la dilución de 10^{-1} para las líneas Wt, 1, 4 y 5 respectivamente (Figura 13 H). Demostrando de esta manera que las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa 1, 4 y 5 son resistentes al patógeno *C. michiganensis m.*

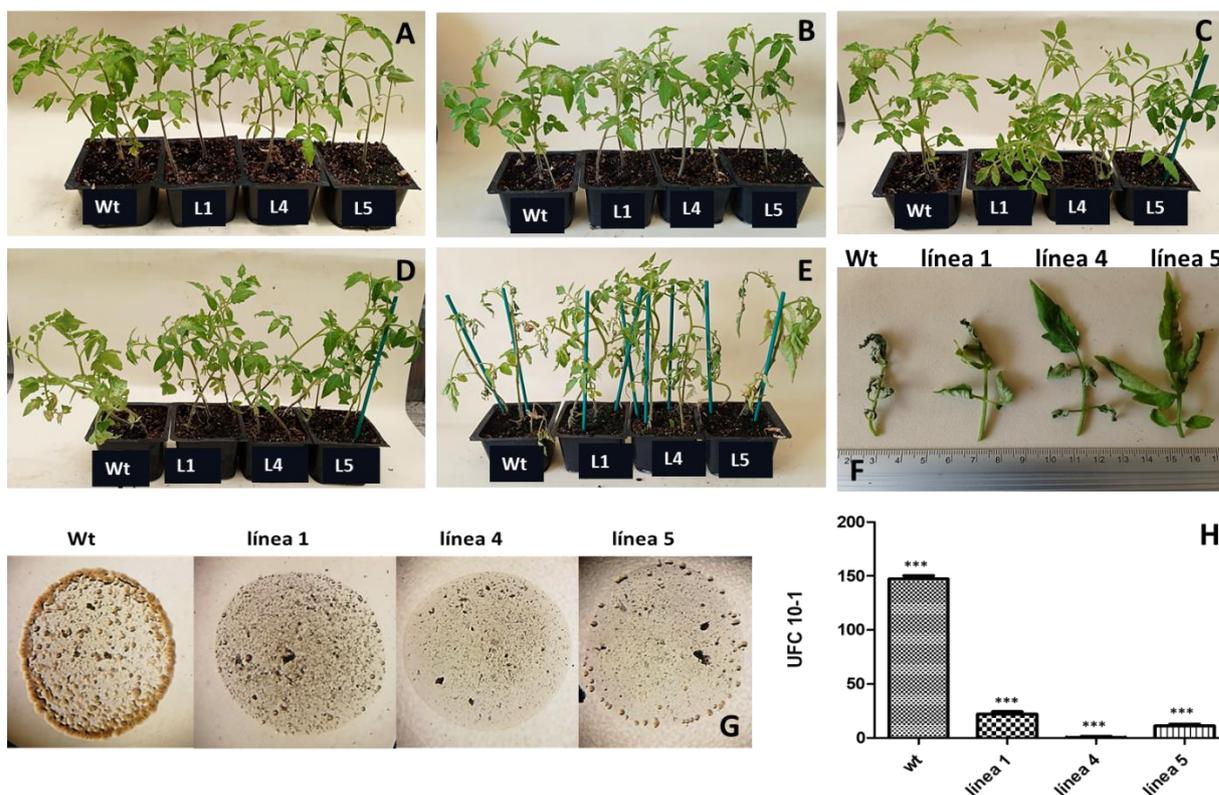


Figura 13. Prueba de tolerancia ante la infección del patógeno *Clavibacter michiganensis m.* en líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa (1, 4 y 5) en comparación con la línea silvestre (Wt). **A.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre sin inocular con *Clavibacter michiganensis m.*. **B.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 2 días de inoculadas con *Clavibacter michiganensis m.*. **C.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 5 días de inoculadas con *Clavibacter michiganensis m.*. **D.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 7 días de inoculadas con *Clavibacter michiganensis m.*. **E.** Fenotipo de plantas transgénicas y silvestre con 13 días de inoculadas con *Clavibacter michiganensis m.*. **F.** Fenotipo de las hojas de plantas transgénicas y silvestre con 13 días de inoculadas con ácido nalidíxico. **G.** Crecimiento

en LB con ácido nalidíxico de los reaslamientos puros a partir de hoja. **H.** UFC en la dilución de 10^{-1} de las líneas transgénicas y silvestre. Los valores representan la media de 3 muestras, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

7.4. Análisis de expresión del transgén TPS-TPP en condiciones de estrés

Para inducir la expresión del transgén RD29A::TPS-TPP en las líneas transgénicas estas se sometieron a varias condiciones de estrés junto a la línea silvestre como control (estrés por salinidad, sequía, infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Clavibacter michiganensis* m.). Luego de transcurridos los tiempos de cada estrés se realizó la extracción de ARN de cada una de las muestras en cada condición de estrés y sin estrés como control, seguido de la síntesis de cADN. Se obtuvo expresión del transgén tanto en salinidad como en sequía para las líneas 1 y 5, pero no se muestra expresión en la línea 4 ni en la línea silvestre como se esperaba (Figura 14 A y C) para todos los tiempos de estrés ensayados (2 semanas, 2 horas y 30 min); de manera paralela se analizaron los transcritos que codifican para EF1 α , los resultados se observan en la Fig 14 B y D. El análisis para el transgén se realizó a un nivel de saturación en la amplificación por 30 ciclos, debido a que en un menor ciclaje (25 ciclos) no se observó amplificación de la línea 5. Debido a que no se observó expresión de la línea 4 en ninguna de las condiciones ni los tiempos con estrés abiótico, se decidió comprobar la expresión a partir de cADN del gen de resistencia a Kanamicina NPTII ubicado antes que el transgén RD29A::TPS-TPP en la construcción presente en las plantas; no se obtuvo expresión de este tampoco en la línea 4 (Figura 15), lo que puede estar determinador por un alto grado de metilación en esta línea.

En el caso del estrés biótico por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Clavibacter michiganensis* m. se obtuvo expresión del transgén para todas las líneas transgénicas, pero no se muestra expresión en la línea silvestre como se esperaba (Figura 14 E). La mayor expresión en cada línea transgénica se obtuvo en diferentes condiciones, en la línea 1 se obtuvo a las 24h de infección con *P. syringae*, en la línea 4 a las 24h de infección con *C. michiganensis* m. y en la línea 5 a las 48h de infección con *P. syringae*. De manera paralela se analizaron los transcritos que codifican para EF1 α , los resultados se observan en la Fig 14 F. El análisis para el transgén se realizó a un nivel de saturación en la amplificación por 30 ciclos, debido a que en un menor ciclaje (25 ciclos) no se observó amplificación de la línea 5.

Se puede observar que lo obtenido para el análisis de qRT-PCR (Figura 16) concuerda con los resultados de los PCR semicuantitativos. Este análisis en el caso de los estreses abióticos se realizó solo con muestras de planta sometidas a estrés por dos semanas.

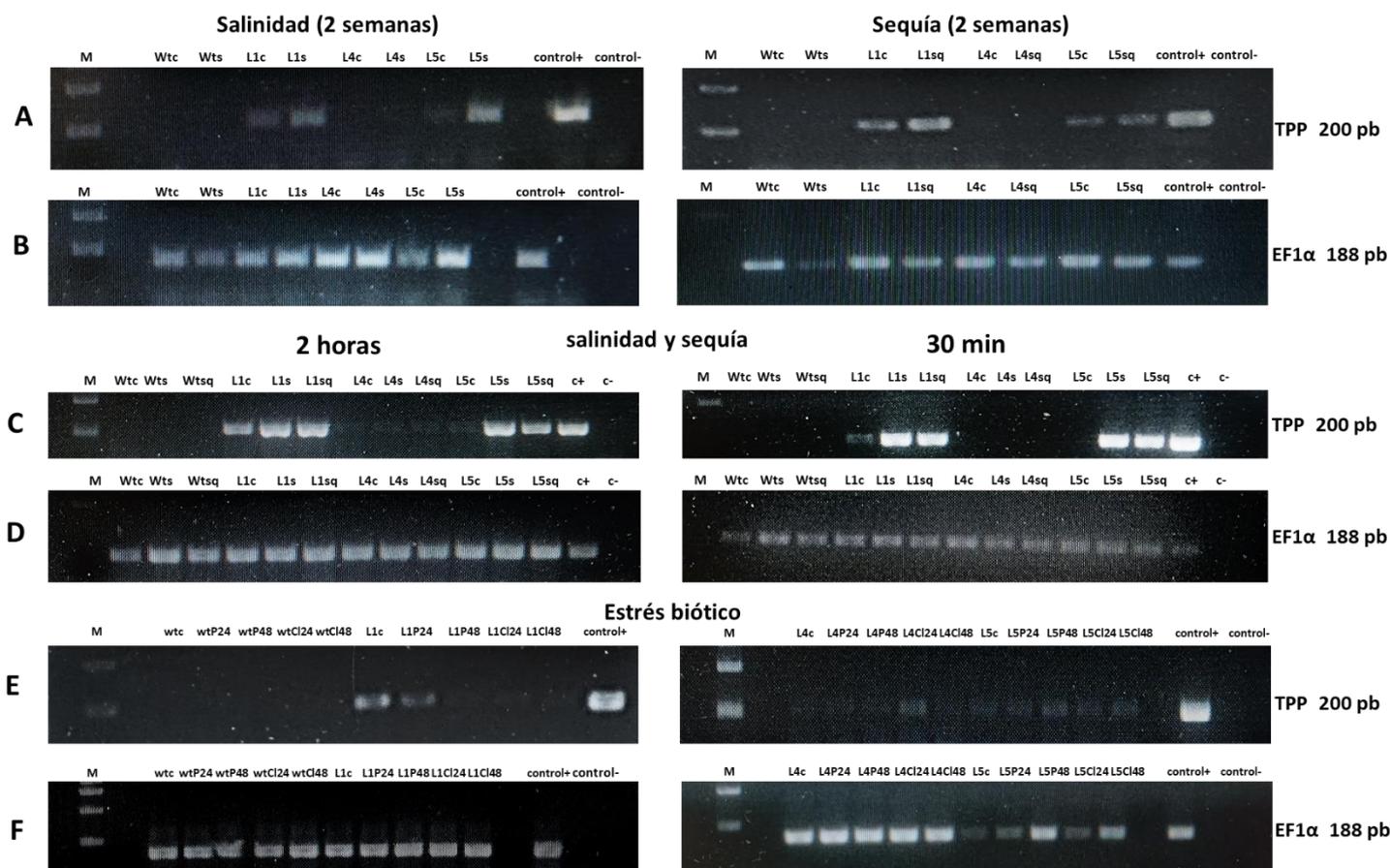


Figura 14. Análisis de expresión mediante RT-PCR de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre. **A.** Amplificación por 30 ciclos del fragmento del transgén TPS-TPP en condiciones de salinidad y sequía por 2 semanas. **B.** Amplificación por 25 ciclos del factor de elongación (EF1α) empleado como control de expresión en condiciones de salinidad y sequía por 2 semanas. **C.** Amplificación por 30 ciclos del fragmento del transgén TPS-TPP en condiciones de salinidad y sequía (2h y 30min). **D.** Amplificación por 25 ciclos del factor de elongación (EF1α) empleado como control de expresión en condiciones de salinidad y sequía (2h y 30min). **E.** Amplificación por 30 ciclos del fragmento del transgén TPS-TPP en condiciones de estrés biótico por *P. syringae pv. tomato* (P) y *C. michiganensis m. (CI)* a las 24 y 48h. **F.** Amplificación por 25 ciclos del factor de elongación (EF1α) empleado como control de expresión en condiciones de estrés biótico por *P. syringae pv. tomato* (P) y *C. michiganensis m. (CI)* a las 24 y 48h.

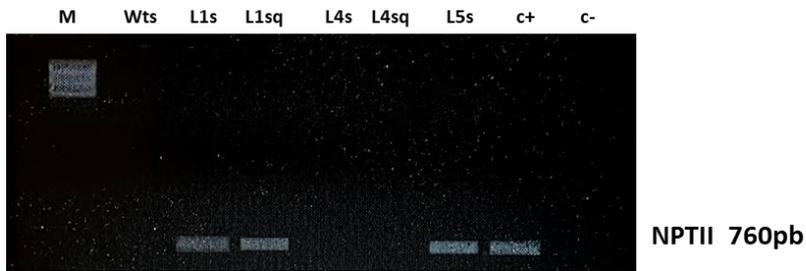


Figura 15. Análisis de expresión de NPTII mediante RT-PCR de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre. Amplificación por 25 ciclos en condiciones de salinidad y sequía (30min).

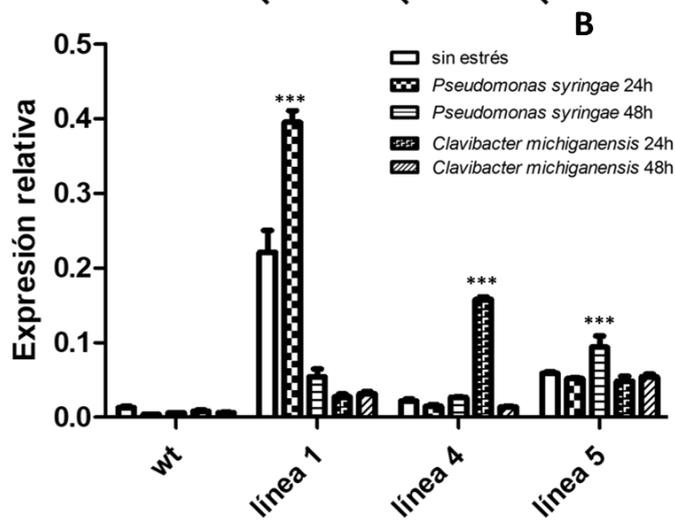
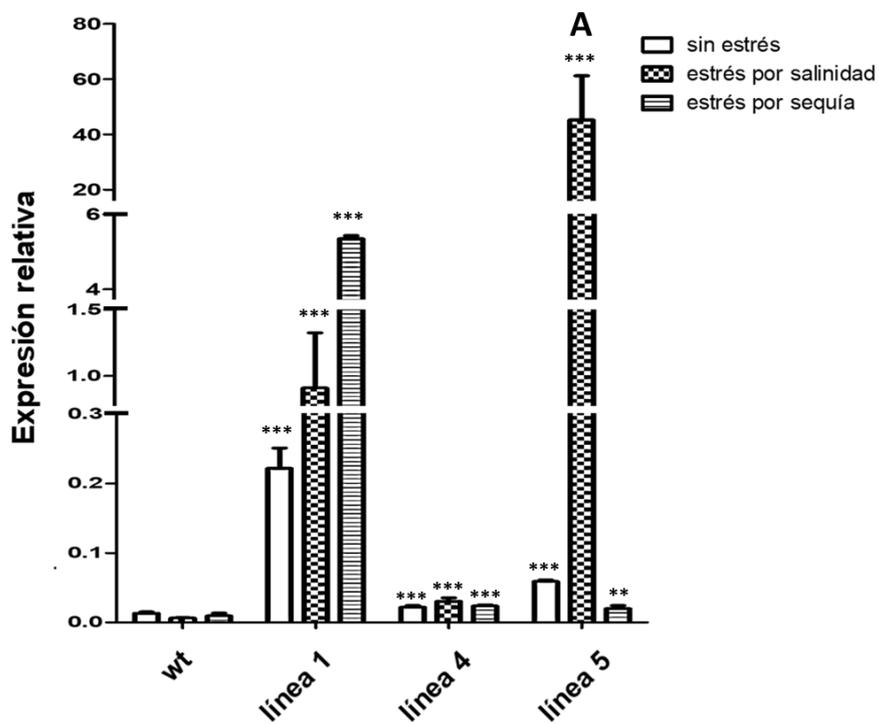


Figura 16. Análisis de expresión mediante qRT-PCR de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre. **A.** Niveles de expresión del transgén TPS-TPP en condiciones de salinidad y sequía (2 semanas). **B.** Niveles de expresión del transgén TPS-TPP en condiciones de estrés biótico por *P. syringae* pv. *tomato* (P) y *C. michiganensis* m. (CI) a las 24 y 48h. La expresión del transgén TPS-TPP fue normalizada con EF1 α . Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

7.5. Cuantificación de trehalosa

La cuantificación de trehalosa se realizó empleando HPLC y el tiempo de retención de esta se muestran en la Figura 17; a partir de este se identificaron los que estaban presentes en las muestras.

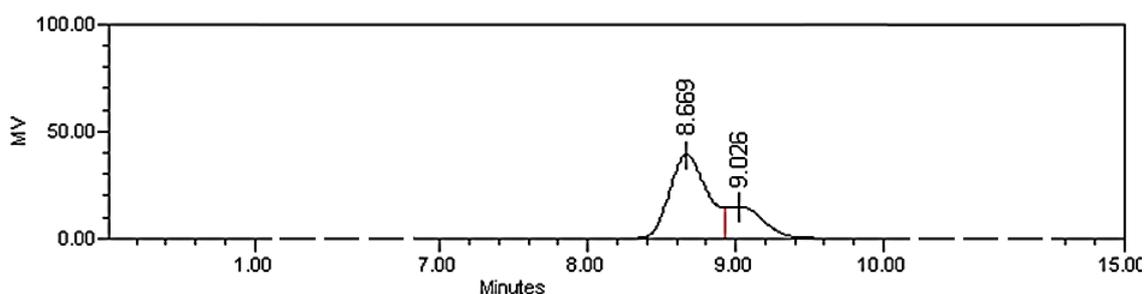


Figura 17. Perfil cromatográfico del estándar de trehalosa empleado para la cuantificación por HPLC

El análisis de los datos nos mostró que en las condiciones de estrés abiótico la cantidad de trehalosa es mayor en estrés por sequía, donde se obtuvo como mayor contenido de trehalosa 7.6 μg trehalosa/mg tejido en la línea 1. Ante los estreses bióticos los niveles fueron menores, incluso con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* los valores son menores que los encontrados para los controles en condiciones normales sin estrés. Ante la infección con *Clavibacter michiganensis* m. se pudieron detectar como mayores valores 0.32 μg y 0.24 μg trehalosa/mg tejido en las líneas transgénicas 4 y 5 respectivamente.

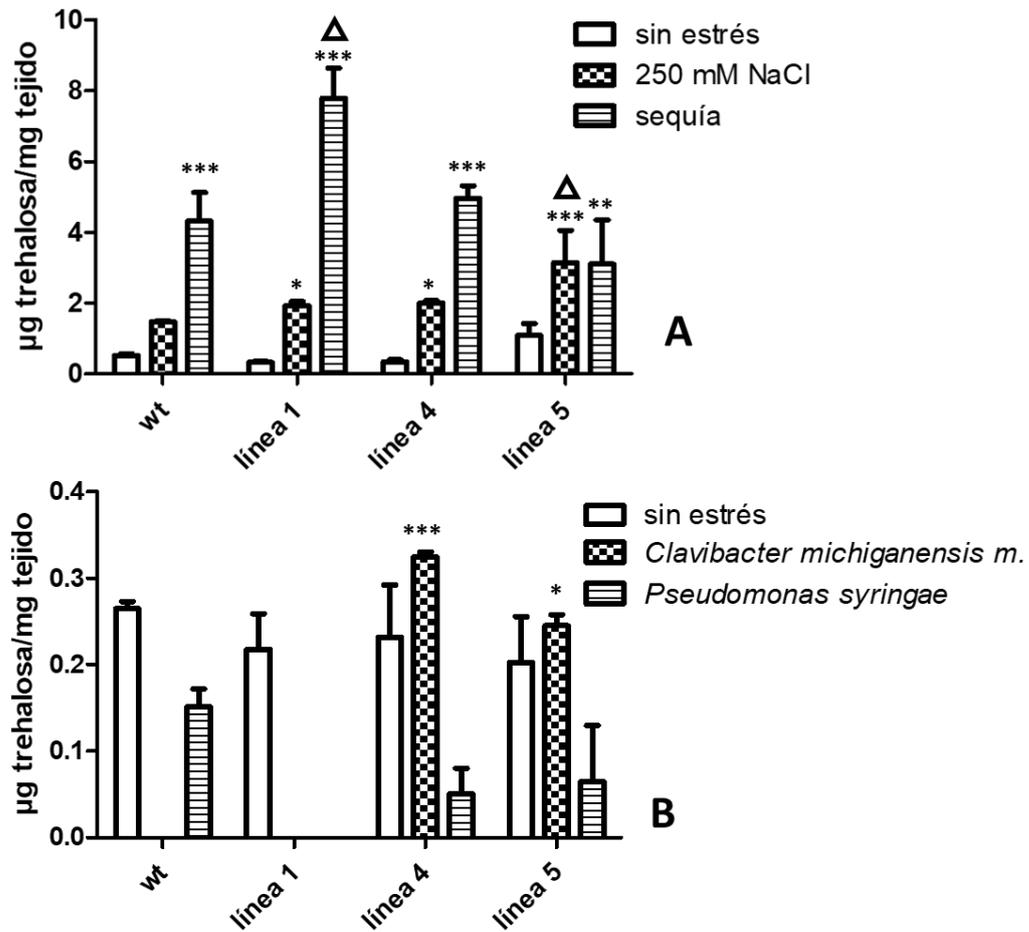


Figura 18. Determinación de la concentración de trehalosa ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco) en plantas transgénicas de tomate y plantas silvestres. **A.** Estrés abiótico (salinidad y sequía). **B.** Estrés biótico (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Clavibacter michiganensis* m.). Los valores representan la media de 4 muestras, las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), donde los asteriscos representan las diferencias significativas, y las barras de error indican la desviación estándar de 4 repeticiones.

8 Discusión

La síntesis de trehalosa en el interior de la célula se ha relacionado en diversos estudios con la protección celular en situaciones de estrés, tales como alta osmolaridad, deshidratación, congelamiento y altas temperaturas (Attfield *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1995; Nakata *et al.*, 1995). Como habíamos mencionado anteriormente en presencia de trehalosa las proteínas preservan mejor su actividad bajo estrés abiótico, pues este osmoprotector reemplaza a el agua para formar una especie de cápsula protectora alrededor de la proteína deshidratada, de esta manera contribuye a preservar su estructura terciaria y actividad. La trehalosa extracelular puede actuar como un inductor de las respuestas de defensa de las plantas. Además, se ha descrito que está implicada como factor de virulencia o molécula señal en las interacciones entre plantas y una diversa gama de otros organismos, y estas interacciones también puede tener un efecto significativo en el metabolismo de trehalosa propio de la planta (Lunn *et al.*, 2014).

En este estudio se evaluó el efecto de la sobreproducción de trehalosa sobre la tolerancia en condiciones de estrés biótico y abiótico, para esto se emplearon como objeto de investigación plantas de tomate de las líneas homocigas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) sobreproductoras de trehalosa, así como la línea silvestre.

8.1 Producción de semillas y peso de los frutos

La trehalosa 6-fosfato (T6P), el intermediario de la biosíntesis de trehalosa, es un metabolito de señalización crítico que es importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas las etapas del ciclo de vida de la planta (Figueroa y Lunn, 2016). Se propone que la T6P es la causante de estos efectos debido a que actúa como una molécula de señalización que regula el flujo de carbono en el desarrollo de la planta y floración (Paul *et al.*, 2008). La fusión génica TPS-TPP cataliza de forma secuencial la síntesis de trehalosa sin liberar el intermediario al medio celular (Miranda *et al.*, 2007) para evitar la acumulación de T6P que en altas concentraciones tiene efectos negativos en el desarrollo de las plantas. Debido a esto es que en esta investigación obtuvimos que el peso de los frutos y el número de semilla por frutos no presentaron diferencias entre las líneas transgénicas sobreacumuladoras de trehalosa y la línea silvestre.

8.2 Porcentaje de germinación bajo estrés por sequía, salinidad y azúcares exógenos

La germinación es una de las fases del crecimiento más sensibles a cualquier situación de estrés, principalmente las que tienen que ver con una disminución en la disponibilidad

de agua en el suelo (Ashraf y Foolad, 2005). En condiciones de estrés salino la disponibilidad de agua disminuye debido a que el potencial hídrico del suelo se encuentra disminuido; a consecuencia de esto los porcentajes y las tasas de germinación se afectan drásticamente (Gorai y Neffati, 2007). El agua es clave para iniciar los cambios fisiológicos que llevan a la germinación, indispensable para activar el metabolismo y además el crecimiento de las células vivas de los tejidos de las semillas (Bradford, 1995).

En esta investigación obtuvimos que la línea transgénica 4 germina en menos tiempo que las demás líneas, además presenta mayor porcentaje de germinación, esto puede deberse a que esta línea presenta doble inserción de la fusión génica TPS-TPP (datos no publicados) y según lo reportado en la literatura la trehalosa juega un papel esencial en diversas etapas del desarrollo de la planta como es el caso de la formación del embrión (Suárez *et al.*, 2015). En un estudio de Jang y colaboradores (2003) con plantas de arroz transformadas con una fusión de TPS y TPP de *E. coli*, se encontró un retraso de tres días en la germinación en contraste con nuestros resultados. En esta investigación la germinación de las semillas transgénicas no se vio retrasada, lo que coincide con lo reportado por Suarez y colaboradores (2009) en alfalfa y con Miranda y colaboradores (2007) en *Arabidopsis*.

Las líneas transgénicas de tomate sobreacumuladoras de trehalosa en condiciones de estrés presentaron mayor porcentaje de germinación en comparación con la línea silvestre, sobre todo la línea transgénica 4. En el tomate el efecto de la salinidad es adverso, el porcentaje de germinación disminuye y el tiempo en el cual las semillas llevan a cabo este proceso aumenta (Goykovic y Saavedra, 2007). Los gradientes de potenciales hídricos entre la semilla y el medio determinan si ocurre o no la germinación, así como la velocidad a la que ésta se produce (Bewley y Black, 1994). En este caso se evidencia el importante papel de la trehalosa para mantener el potencial hídrico de las células.

La salinidad puede inducir la dormancia de las semillas: si la cantidad de sal en el entorno es muy elevada, el ingreso de agua a la semilla es restringido y la restricción impuesta por las cubiertas seminales no es superada por el embrión debido a que no alcanza la turgencia necesaria y la germinación no ocurre (Bewley y Black, 1994). Las soluciones de NaCl ejercen un efecto combinado, se produce el efecto osmótico debido a la disminución del potencial hídrico del medio, que crea estrés en la semilla o plántula (Bradford, 1995) y se crea un efecto iónico por la entrada y/o acumulación de iones en la semilla que causa toxicidad (Dodd y Donovan, 1999).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Almeida y colaboradores en 2005 quienes obtuvieron líneas transgénicas de plantas de tabaco que expresan el gen TPS1 de *Arabidopsis*, los autores obtuvieron tasas de germinación más altas en situaciones de estrés osmótico.

Varios autores han demostrado que el aumento de los niveles de trehalosa puede tener fuertes efectos sobre el desarrollo de las plantas (Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997). Aeschbacher y colaboradores en el 2000 reportaron que la trehalosa aplicada exógenamente inhibe el desarrollo de las raíces y las hojas en plántulas de *Arabidopsis*. Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación donde las líneas transgénicas 1 y 5 que sobreacumulan trehalosa presentan un retardo en la germinación cuando hay presencia de azúcares en el medio y al parecer se comporta como un efecto sumatorio; mientras que no se describe este fenómeno en la línea silvestre en las mismas condiciones y la línea transgénica 4 que a pesar de poseer doble inserción de transgén obtuvimos que posee muy baja expresión. En este experimento en presencia de azúcares en el medio obtuvimos los mayores porcentajes de germinación en la línea transgénica 4 para todos los tiempos y condiciones ensayados, esto puede deberse a que en plantas que sobreacumulan trehalosa, pero en niveles bajos esta puede contribuir a inducir la biosíntesis de almidón (Wingler *et al.*, 2000) contribuyendo de este modo en la germinación.

8.3 Evaluación de la tolerancia a estrés oxidativo por Paraquat y metil-viológeno (MV)

Al evaluar la tolerancia al estrés oxidativo en las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5 en la inoculación con el herbicida Paraquat se muestra que las plantas más afectadas son las de la línea transgénica 4, esto puede deberse a que las plantas usadas en esta línea tenían menor tamaño en comparación con las de las otras líneas empleadas, por tanto, la cantidad de herbicida usado representa una dosis superior a la tolerable por la planta en esta línea. Las líneas transgénicas presentaron mayor tolerancia al estrés oxidativo por Paraquat, por lo que se puede observar que se recuperan mejor.

En el caso del MV, compuesto activo del Paraquat, se obtuvieron resultados contrastantes, presentando la mayor capacidad de tolerar el estrés oxidativo por MV en la línea transgénica 4, este resultado apoya la explicación de que fue precisamente el tamaño de las plantas lo que determinó que en el experimento con Paraquat fuera la línea más susceptible. Los resultados obtenidos demuestran que las líneas transgénicas

de tomate sobreproductoras de trehalosa son capaces de tolerar mejor el estrés oxidativo que la línea silvestre.

La trehalosa actúa como un potente antioxidante en las plantas, ayuda a neutralizar los radicales libres y reducir el daño oxidativo causado por el estrés ambiental. La trehalosa ayuda a mantener un equilibrio redox saludable en las células de la planta (Slama *et al.*, 2015). El estrés oxidativo puede dañar las membranas celulares de las plantas y este osmoprotector ayuda a estabilizar y proteger las membranas celulares, al proteger los lípidos de las membranas de la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres, evitando la pérdida de integridad y reduciendo la filtración de moléculas importantes (Patist y Zoerb, 2005). Además, esta tiene la capacidad de regular positivamente la actividad de enzimas antioxidantes clave en las plantas, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la peroxidasa (POX), que desempeñan un papel clave en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y en la protección contra el estrés oxidativo (Gechev *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2012).

En estudios anteriores se demostró que la trehalosa es capaz de proteger contra el daño de ROS como los radicales hidroxilos (Luo *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Borgohain *et al.*, 2020 que reportan que la administración de trehalosa exógena en plántulas de tomate mejora el estrés oxidativo inducido por MV a través de la regulación de la apertura de los poros estomáticos y el metabolismo del glutatión. Otra investigación demostró que la expresión de *ScTPS1* también en tomate, empleando el promotor CaMV35S, mejoró la tolerancia a estrés oxidativo (Cortina y Culiañez-Macia, 2005).

8.4 Evaluación de la tolerancia a salinidad y sequía

El estrés por salinidad al igual que el estrés por sequía provocan en las plantas reducción del área foliar, del contenido de clorofila, la conductancia estomática, y en menor extensión, una disminución de la eficiencia del fotosistema II, causando de esta manera disminución en la fotosíntesis en las plantas estresadas (Chaves, 2009). El contenido de clorofila es importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Jahan *et al.*, 2014) y se provocan alteraciones en el proceso de fotosíntesis por la disminución en su contenido (Khairi *et al.*, 2015). En cuanto a esto Torres *et al.* (2005) refieren que la disminución de la concentración de pigmentos en las hojas está causada por la disminución de la intensidad de la fotosíntesis en estrés salino.

En el caso específico del estrés salino el mecanismo específico de la sal o la acumulación de iones como Na⁺ y Cl⁻ en el citoplasma modifica la estructura y el

funcionamiento de los cloroplastos, llevando a la inactivación de enzimas expuesta inhibiendo parcialmente el ciclo de Calvin (Parida *et al.*, 2003). Los cambios que ocurren a nivel celular en presencia de estrés por alto contenido de sal pueden afectar las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis, por la ineficiencia en el proceso carboxilativo, los cambios en la síntesis de los pigmentos fotosintéticos (fundamentalmente la clorofila “a”) y por la degradación de polipéptidos que están adheridos a los tilacoides (Hernández *et al.*, 1995; Parida *et al.*, 2003). La clorofila a y clorofila b son de los pigmentos más importantes, precisamente la clorofila a es el principal receptor de luz, esta se considera como un indicador de estrés cuando hay cambios en su concentración y fluorescencia (Chen y Murata, 2002; Saibo *et al.*, 2009; Gollack *et al.*, 2014).

En los resultados de esta investigación se puede observar que en condiciones de estrés salino las plantas de la línea silvestre y la línea transgénica 1 se observó una disminución en los contenidos de clorofila, sin embargo, en las líneas transgénicas 4 y 5 no hubo una baja en la cuantificación de clorofila, por lo que pudieran considerarse líneas con mayor tolerancia al estrés por NaCl. En el caso del estrés por sequía las plantas de la línea silvestre y la línea transgénica 1 se observó una disminución en los contenidos de clorofila, sin embargo, en las líneas transgénicas 4 y 5 hubo un aumento en la cuantificación de clorofila, significativamente diferente al ser comparadas con los valores del control. Estos resultados pueden deberse a las propiedades osmoprotectoras de la trehalosa que aíslan del daño al aparato fotosintético, a otras enzimas clave y a las membranas, ya que el balance hídrico no se ve más alterado por el contenido mayor de trehalosa (Garg *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 1997).

La sobreacumulación de trehalosa puede provocar una regulación diferencial de genes clave que están implicados en la tolerancia a la sequía y mejorar la adaptación de las plantas a condiciones de escasez de agua.

A nivel fisiológico, ambas condiciones de estrés provocan un estrés osmótico en la planta que afecta a su capacidad para absorber agua y nutrientes y, además el estrés salino posterior a esto, cuando el estrés es más severo, los niveles de Na⁺ y Cl⁻ pueden alcanzar niveles tóxicos que provocan graves daños celulares. En este sentido, se ha demostrado que ambas condiciones de estrés generan un desequilibrio metabólico que conduce a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el oxígeno singlete (¹O₂), el ion superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los radicales hidroxilos (•OH) manifestándose como estrés oxidativo (Acosta-Motos *et al.*, 2017). El aumento de la producción de ROS puede alterar la homeostasis celular y el metabolismo

normal a través del daño oxidativo de las macromoléculas esenciales (Abdelgawad *et al.*, 2016).

En los experimentos realizados obtuvimos que las líneas transgénicas tienen un menor contenido de MDA cuando las comparamos con la silvestre en condiciones de estrés salino y por sequía, estos resultados nos indican que existe un aumento en la protección de las membranas celulares inducido por la acumulación de trehalosa que, en condiciones de estrés salino, así la trehalosa ayuda a mantener la integridad de las membranas ante diferentes tipos de estrés (Patist y Zoerb, 2005). La protección de las membranas celulares por este osmoprotector ocurre a través de la interacción de los grupos OH de las proteínas y de las cabezas polares de los lípidos que forman las membranas, de acuerdo con la teoría del remplazamiento de agua por trehalosa (Adams *et al.*, 1990; Crowe *et al.*, 1998). Esta molécula retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trehalosa, por lo que mantiene a las membranas en forma de cristal líquido (Crowe *et al.*, 2001); se ubica entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que tiene interacción mediante sus hidroxilos.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura por varios autores. Según lo reportado por Li y colaboradores en 2011, la sobreexpresión de *OsTPS1* mejoró la tolerancia a la salinidad de plántulas de arroz, incrementando la cantidad de trehalosa y prolina, regulando así la expresión de genes relacionados con el estrés. Al igual concuerda con los resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana*, donde se reportaron que líneas transgénicas con una fusión TPS-TPP de levadura mostraron un aumento significativo en la tolerancia a salinidad y sequía (Miranda *et al.*, 2007). Al igual que los resultados obtenidos en plantas de alfalfa con la expresión de enzima bifuncional TPS-TPP mostró un incremento en la tolerancia a salinidad y sequía (Suárez *et al.*, 2009). Otros estudios realizados en tomate demuestran la importancia de la trehalosa para contener el estrés por salinidad y sequía; estando en correspondencia con los resultados obtenidos en nuestra investigación; Cortina y Culiañez-Macia en 2005 demostraron que la expresión de *ScTPS1* en jitomate mejorara la tolerancia a salinidad; así como en un estudio de Lyu y colaboradores (2013), se generaron plantas transgénicas de tomate mediante la introducción de un gen codificante para la fusión bifuncional de trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa de *E. coli*. Las plantas transgénicas mostraron un incremento en la tolerancia a salinidad, a la sequía y un incremento en la fotosíntesis en comparación de las plantas silvestres bajo condiciones de estrés salino.

8.5. Resistencia a patógenos fungales y bacterianos

La producción de tomate en México se ve afectada entre otros factores por la incidencia de plagas y enfermedades. Se ha descrito por varios autores que la presencia de trehalosa ayuda a las plantas en los mecanismos de resistencia a patógenos; de ahí la importancia de determinar si la expresión de trehalosa bajo promotor inducible por estrés RD29A respondía a estreses bióticos.

Las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa poseen mayor resistencia a los patógenos *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* y *Clavibacter michiganensis michiganensis* en comparación con la línea silvestre. Al evaluar la tolerancia al patógeno *Botrytis cinerea* en las líneas Wt, línea 1, línea 4 y línea 5 se obtuvo que la totalidad del área foliar de la línea Wt se infectó por el patógeno, así como en distinta magnitud las líneas transgénicas 1, 4 y 5, obteniéndose 78.26, 51.18, 51.77% de infección respectivamente. La resistencia más baja al patógeno se presentó en la línea L1, esto puede deberse a que las hojas usadas en esta línea tenían menor tamaño en comparación con las de las otras líneas empleadas, por tanto, la cantidad de micelio usado como inóculo en esta línea representó un reto mayor. Mientras que la línea transgénica que mejor contiene el estrés biótico causado por el patógeno *Botrytis cinerea* es la 4. Lo obtenido en los experimentos de infección con *C. michiganensis m.* nos indican también que las plantas transgénicas son capaces de resistir el ataque de este patógeno mejor que las silvestres, mostrándose también la línea 4 como la que mayor resistencia posee. Al evaluar la resistencia a *Pseudomonas syringae pv. tomato* se pudo observar un nivel de resistencia basal en esta variedad de tomate, lo que concuerda con lo reportado por Camañes *et al.*, 2015, por lo que la infección se vio retardada y solo se pudo detectar en las plantas silvestres. La mayor resistencia encontrada en las plantas transgénicas puede deberse al papel de la trehalosa como inductor de respuestas de defensa de las plantas (Lunn *et al.*, 2014).

Varios estudios han demostrado que la mayoría de las interacciones de plantas con patógenos se caracterizan por el despliegue de una red compleja de señales químicas y por una reprogramación altamente coordinada de metabolitos (Allwood *et al.*, 2008). La trehalosa puede desencadenar la activación de respuestas de defensa en las plantas de tomate. Actúa como una molécula señalizadora que puede iniciar cascadas de señalización que conducen a la expresión de genes involucrados en la defensa contra patógenos. Esto incluye la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos, la

síntesis de proteínas de defensa y la activación de rutas de señalización específicas (Aghdasi *et al.*, 2008).

La trehalosa puede estimular el sistema inmune de las plantas promoviendo la producción de enzimas de defensa, como las quitinasas y las glucanasas (Zhao *et al.*, 2012), que pueden degradar componentes de las paredes celulares de los patógenos. Además, tiene propiedades antioxidantes y puede ayudar a las plantas a combatir el estrés oxidativo inducido por patógenos. Este metabolito también puede neutralizar los ROS y proteger las células vegetales del daño oxidativo generado por los patógenos, que dañan las células vegetales (Apaliya *et al.*, 2017).

Este importante osmoprotector puede influir en la regulación hormonal en las plantas de tomate. Puede modular la producción y el equilibrio de hormonas vegetales, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno. Estas hormonas desempeñan un papel crucial en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos y pueden regular la expresión de genes involucrados en la resistencia (MacIntyre *et al.*, 2022).

Los resultados de estos experimentos concuerdan con Aghdasi *et al.*, 2008 que obtuvieron mediante la administración de trehalosa exógena la inducción de genes relacionados con la defensa de patógenos en plántulas de *A. thaliana*. Además, también se corresponde con los datos obtenidos por Zhang *et al.*, 2016 que demuestran un papel importante para la trehalosa y sus genes metabólicos en la resistencia contra diferentes patógenos.

8.6. Análisis de expresión del transgén TPS-TPP en condiciones de estrés

La expresión genética en las plantas está regulada por varios factores que actúan de manera conjunta en diferentes condiciones, por lo que se ve sometida a cambios determinados tanto por factores externos como por condiciones internas celulares. En esta investigación obtuvimos un patrón de expresión diferente para cada una de las líneas transgénicas de tomate analizadas, patrón que en cada una de ellas se mantuvo constante para cada una de las condiciones y tiempos ensayados. En la línea 1 se obtuvo una expresión basal incluso en plantas no sometidas a estrés y la expresión inducible por estrés fue alta y detectable; así la línea 5 presentó expresión inducible que se pudo detectar en todas las condiciones, en cambio sin estrés no presenta expresión en concordancia con lo esperado. En este estudio encontramos un comportamiento no esperado en la expresión de transgén en la línea 4, ya que se observó expresión muy

baja e incluso no se observó en algunas condiciones en contraste a lo que esperábamos obtener debido a que esta línea presenta doble inserción del transgén. Existen varias hipótesis que pueden respaldar este patrón de expresión en la línea 4, que para ser comprobadas se requiere profundizar en el análisis de la expresión de esta línea. Este fenómeno puede deberse primeramente a que la expresión sea baja por debajo de los niveles detectables con las técnicas utilizadas, apoyamos esta hipótesis debido a que en las plantas de esta línea si se observa una mejor respuesta ante los diferentes tipos de estrés analizados, mejor incluso que las otras líneas donde se obtuvo expresión y además que se puede detectar trehalosa por encima de los valores de las plantas silvestres. Lo que lleva a analizar otra posible razón de este comportamiento, como mencionamos anteriormente se ha demostrado que niveles más altos de trehalosa no siempre es beneficioso para el desarrollo vegetal (Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997; Cortina y Culiañez-Macia, 2005), por lo que puede ser ventajoso para las plantas que se encuentre débilmente expresado para evitar los efectos negativos que puede tener niveles más altos del azúcar.

La diversidad de expresión detectada puede estar determinada teóricamente para varios factores, como por ejemplo la variedad en el sitio de inserción del transgén dentro del genoma, lo que resulta en diferentes niveles de expresión. Puede deberse a la interferencia de elementos reguladores u otros genes, es decir que la inserción del transgén esté afectando estos otros genes. Los patrones de metilación, así como otras modificaciones epigenéticas pueden estar influyendo en la expresión de transgén (Zhang *et al.*, 2006). Tampoco se puede descartar la interferencia entre las copias del transgén provocando una interferencia y así cambios en la regulación.

9 Conclusiones

Los parámetros morfológicos vegetativos, así como las características de los frutos son similares en las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre; a excepción de la línea 5 que tiene frutos de mayor tamaño.

Las líneas transgénicas de tomate sobreproductoras de trehalosa son capaces de tolerar mejor el estrés salino (250mM de NaCl) y el estrés por sequía, presentan mayor porcentaje de germinación en condiciones de estrés salino y estrés osmótico; además, de resistir mejor el ataque de patógenos (*B. cinerea*, *P. syringae* pv. *tomato* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*).

10 Perspectivas

Realizar análisis transcriptómicos y metabolómicos de las líneas transgénicas de tomate y la línea silvestre tanto en condiciones normales como en presencia de estrés biótico y abiótico; con la finalidad de explicar experimentalmente las diferencias de expresión encontradas, así como los niveles de trehalosa.

Realizar cruza con variedades comerciales de tomate, para lograr la introgresión del transgén. Así poder obtener plantas de tomate de interés comercial genéticamente modificadas con mayor rapidez.

11 Referencias bibliográficas

- Abdelgawad H, Zinta G, Hegab MM, Pandey R, Asard H, Abuelsoud W. (2016). High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs. *Frontiers in plant science*; 7:276.
- Accotto, G., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., Louro, D. 2000. Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *Europ. J. of Plant Path.* 106:179-186.
- Acosta-Motos JR, Ortuño MF, Bernal-Vicente A, Diaz-Vivancos P, Sánchez-Blanco MJ y Hernández JA. (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*;7(1):18
- Adams R P, Kendall E y Kartha K K (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Bioch. Syst. Eco.* 18:107-110.
- Aeschbacher R.A., Wingler A., Fritzius T., Brodmann D., Boller T. y Wiemken A. (2000). Trehalose metabolism affects development of *Arabidopsis* by regulating the sugar sensing mechanism. 9th Swiss Plant Cell and Molecular Biology Conference March 8–10, 2000, Villar sur Ollon, Switzerland, pp 51–53.
- Aghdasi, M., Smeekens, S. y Schlupepmann, H. (2008). Microarray analysis of gene expression patterns in *Arabidopsis* seedlings under trehalose, sucrose and sorbitol treatment. *Int. J. Plant Prod.* 2, 309–320.
- Agrios G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th edition. Academic Press. San Diego, California, USA. 952 p.
- Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasnyanski S., Kumar S. y Thompson W.F. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant issues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, 1, 2320-2325.
- Allwood, J. W., Ellis, D. I., y Goodacre, R. (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia plantarum*, 132(2), 117-135.
- Almeida, A. M., Villalobos, E., Araújo, S. S., Leyman, B., Van Dijck, P., Alfaro-Cardoso, L. y Santos, D. M. (2005). Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphytica*, 146(1), 165-176.
- Alyokhin, A., Baker, M., Mota-Sanchez, D., Dively, G., y Grafius, E. (2008). Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research*, 85(6), 395–413.
- Anjum, S. A., Xiao-Yu, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C., y Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026–2032.
- Apaliya, M. T., Zhang, H., Yang, Q., Zheng, X., Zhao, L., Kwaw, E. y Mahunu, G. K. (2017). *Hanseniaspora uvarum* enhanced with trehalose induced defense-related enzyme activities and relative genes expression levels against *Aspergillus tubingensis* in table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 132, 162-170.
- Attfield, P. V., Raman, A y Northcott, C. J. (1992). Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and

- their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* 94: 271-276.
- Attipalli, R. R.; Kolluru, V. C. y Munusamy, V. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161:1189-1202.
- Avonce N; Leyman B; Mascorro-Gallardo JO; Van Dijck P; Thevelein JM y Iturriaga G (2004). The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- Avonce N; Mendoza-Vargas A; Morett E y Iturriaga G (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6: 9.
- Bardaji, L., Echeverría, M., Rodríguez-Palenzuela, P., Martínez-García, P.M., y Murillo, J. (2017). Four genes essential for recombination define GIInts, a new type of mobile genomic island widespread in bacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 46254.
- Bautista J, García R, Montes R, Zavaleta E, Pérez J, Ferrera R, García R y Huerta M (2010). Disminución de la marchitez del chile por introducción de antagonistas en cultivos de rotación. *Interciencia.* 35(9): 673-679.
- Blázquez MA; Santos E; Lisset-Flores C; Martínez-Zapater JM; Salinas J y Gancedo C (1998). Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13: 685-689.
- Borgohain, P., Chowardhara, B., Saha, B., Awasthi, J. P., Regon, P., Sahoo, S., y Panda, S. K. (2020). Exogenous trehalose ameliorates methyl viologen induced oxidative stress through regulation of stomatal pore opening and glutathione metabolism in tomato seedlings. *Vegetos*, 33(4), 665-681.
- Bravo M.E. (2002). Uso reducido de insecticidas y control biológico de plagas del jitomate en Oaxaca. *Agric. Téc. Méx.* 28, 137-149.
- Buege J.A. y Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology journal*, 2, 302-310.
- Camañes, G., Scalschi, L., Vicedo, B., González-Bosch, C. y García-Agustín, P. (2015). An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, 84(1), 125-139.
- Chaves, M.; J. Flexas y C. Pinheiro. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany.* 103 (4): 551-560.
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y. y Jin, Q. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 33: D325-328.
- Chen, T. H., y Murata, N. (2002). Mejora de la tolerancia al estrés abiótico mediante ingeniería metabólica de betaínas y otros solutos compatibles. *Opinión actual en biología vegetal*, 5(3), 250-257.
- Choudhury, F.K.; Rivero, R.M.; Blumwald, E. y Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* 90: 856-867.
- Cortina, C. y Culiañez-Macia, F. A. (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, 169, 75–82.
- Crowe J H, Carpenter J F y Crowe L M (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 60:73-103.

- Crowe JH; Crowe LM y Chapman D (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science* 223: 209-217.
- Crowe JH; Crowe LM; Oliver AE; Tsvetkova N; Wolkers W y Tablin F (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43: 89-105.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., y Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*. 13(4), 414-430.
- Delorge, I., Figueroa, C., Feil, R., Lunn, J. y Van Dijck, P. (2015). Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.*, 466, 283–290.
- Drenan P M, Smith M T, Goldsworthy D y Staden van J (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation tolerant angiosperm *Myrothamnus flavelifolius* Welw. *J. Plant Physiol.* 142:493-496.
- Elbein AD; Pan YT; Pastuszak I y Carroll D (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- FAO 1997. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55) M-56 ISBN 92-5-303875-6. <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s00.htm#Contents>.
- FAOSTAT, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División Estadística (2015) Datos sobre alimentación y agricultura. Cultivos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.
- Fernández-Pavía, S.P., Rodríguez-Alvarado, G. y Fernández- Pavía, Y.L. 2008. Enfermedades forestales de cultivos agrícolas en el estado de Michoacán. *Biológicas* 10:28-38.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). (2016). Panorama Agroalimentario del tomate rojo 2016. México: FIRA. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroalimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf
- Figueroa, C. M., y Lunn, J. E. (2016). A tale of two sugars: Trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology*, 172, 7–27
- Flowers, T. J. (1999). Salinisation and horticultural production. *Scientia Horticulturae*, 78, 1-4.
- Freshplaza. 2016. Datos de la I Conferencia Internacional de Tomate. www.freshplaza.es/.../La-producción-mundial-de-tomates-alcanza-los130-millones-de-tonelada.
- Garg, A., Kim, J., Owens, T., Ranwala, A., Choi, Y., Kochian, L. y Wu, R. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 15898–15903.
- Gechev, T. S., van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., y Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28(11), 1091–1101.
- Giorno F., Wolters-Arts M., Grillo S., Scharf K.D., Vriezen W.H. y Mariani C. (2010) Developmental and heat stress-regulate expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, 61, 453-462.

- Goddijn O y Smeekens S (1998) Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14:143-146.
- Goddijn O.J.M., Verwoerd T.C., Voogd E., Krutwagen R.W.H.H., de Graaf P.T.H.M., Poels J., van Dun K., Ponstein A.S., Damm B. y Pen J. (1997). La inhibición de la actividad de trehalasa mejora la acumulación de trehalosa en plantas transgénicas. *Plant Physiol* 113: 181–190
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., y Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in plant science*, 5, 151.
- He, M., He, C. Q., y Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9(1), 1–18.
- He, M., He, C. Q., y Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9(1), 1–18.
- Hernández-Herrera, R. M.; Santacruz-Ruvalcaba F.; Ruiz-López M. A.; Norrie J. y Hernández-Carmona G. (2014). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of applied phycology*. 26(1): 619-628.
- Hernández-Romano J., L. A. Mastache-Estrada, D. A. Molina-Sánchez, R. Serrano-Plancarte, C. Peña-Barrera, M. I. Chávez-Bejar, N. Romero-Martínez y A. N. Lecona-Valera (2019). Estabilidad y capacidad inhibitoria del bacteriófago ϕ RSP, agente potencial para el biocontrol de *Ralstonia solanacearum*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:13-19.
- Hodge, S., Ward, J.L., Beale, M.H., Bennett, M., Mansfield, J.W. y Powell, G. (2013). Aphid-induced accumulation of trehalose in *Arabidopsis thaliana* is systemic and dependent upon aphid density. *Planta*, 237, 1057–1064.
- Holmström KO; Mäntylä E; Welin B; Mandal B; Palva E; Tunnela O y Londesborough J (1996). Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683-684.
- Huerta Lara, M., Cárdenas Soriano, E., Rojas Martínez, R. I., López Olguín, J. F., Reyes López, D., Bautista Calles, J. y Romero Arenas, O. (2009). Oclusión de haces vasculares para evaluar resistencia de caña de azúcar a *Xanthomonas albilineans*. *Interciencia*, 34(4), 247-251.
- Iturriaga G; Gaff DF y Zentella R (2000). New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Austral. J. Bot.* 48: 153-158.
- Jahan, M.S.; M. Nozulaidi; M. Moneruzzaman; A. Ainun y N. Husna. (2014). Control of plant growth and water loss by a lack of light-harvesting complexes in photosystem-II in *Arabidopsis thaliana* ch1-1 mutant. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:1627-1635.
- Jiang, W., Fu, F. L., Zhang, S. Z., Wu, L. y Li, W. C. (2010). Cloning and characterization of functional trehalose-6-phosphate synthase gene in maize. *J Plant Biol.*, 53(2), 134–141.
- Jiménez, D. F. (2003). Enfermedades del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Ed. *Limusa. México, D.F.* 102 p.

- Kataya, A. R., Elshobaky, A., Heidari, B., Dugassa, N. F. y Thelen, J. L. (2020). Multi-targeted trehalose-6-phosphate phosphatase I harbors a novel peroxisomal targeting signal 1 and is essential for flowering and development. *Planta*, 251(98).
- Khairi, M.; M. Nozulaidi y M. Sarwar (2015). Effects of different water levels on physiology and yield of salinity rice variety. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 9(2): 339-345.
- Kosmas, S. A., Argyrokastritis, A., Loukas, M. G., Eliopoulos, E., Tsakas, S. y Kaltsikes, P. J. (2006). Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphatesynthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta*, 223(2), 329–339.
- Krasensky, J., Broyart, C., Rabanal, F. A. y Jonak, C. (2014). The Redox-Sensitive Chloroplast Trehalose-6-Phosphate Phosphatase AtTPPD Regulates Salt Stress Tolerance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9), 1289-1304.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92(5), 2177–2186.
- Lewis, J. G., Learmonth, R. P. y Watson, K. (1995). Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 141: 687-394.
- Li, H.W., Zang, B. S. y Deng, X.W. (2011). Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*, 234, 1007–1018.
- Lichtenthaler H.K. y Wellburn A.A. (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, ac. 603, 591-592.
- Lin, Q., Wang, S., Dao, Y., Wang, J. y Wang, K. (2020). *Arabidopsis thaliana* trehalose-6-phosphate phosphatase gene TPPI enhances drought tolerance by regulating stomatal apertures. *Journal of Experimental Botany*, 71(14), 4285–4297.
- Lin, Q., Yang, J., Wang, Q., Zhu, H., Chen, Z. D. y Wang, K. (2019). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase family gene AtTPPF improves the drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 19, 381.
- Ling K.S. y Scott J.W. (2007). Sources of Resistance to Pepino mosaic virus in tomato accessions. *Plant Dis.* 91, 749-53.
- Lins R.D., Pereira C.S. y Hunenberger P.H. (2004). Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55: 177-186.
- Liu, X., Fu, L., Qin, P., Sun, Y., Liu, J. y Wang, X. (2019). Overexpression of the wheat trehalose 6-phosphate synthase 11 gene enhances cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 710, 210-217.
- Los, D. A., y Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666(1), 142–157.
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., y Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 544-567.
- Luo, Y., Li, W. M., y Wang, W. (2008). Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 378-384.

- Lyu, J., Min, S., Lee, J., Lim, Y., Kim, J., Bae, C. y Liu, J. (2013). Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 112, 257-262.
- Maas, E. V. y Hoffman, G. J. (1977). Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, 103, 115-134.
- MacIntyre, A. M., Meline, V., Gorman, Z., Augustine, S. P., Dye, C. J., Hamilton, C. D. y Allen, C. (2022). Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease. *Plos one*, 17(4), e0266254.
- Martin, I. O. (2009). Genetic dissection of type iii secretion system regulation in *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola (Doctoral dissertation, Universidad de Málaga).
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T. y Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la Zona Árida del noroeste De México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18).
- Maruta K., Hattori K., Nakada T., Kubota M., Sugimoto T. y Kurimoto M. (1996). Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36. *BBA* 1289: 10-13.
- Miranda, J., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J., Van Dijck, P. y Iturriaga, G. (2007). A Bifunctional TPS–TPP Enzyme from Yeast Confers Tolerance to Multiple and Extreme Abiotic-Stress Conditions in Transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 1411–1421.
- Mittler, R. y Blumwald, E. (2010). Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annu Rev Plant Biol* 61:443-462.
- Mónaco, C., Nico, A., Rollán, M. y Urrutia, M. (2001). Efecto «*in vitro*» de dos fungicidas sobre la micoflora antagonista al tizón temprano del tomate. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16(3), 325-332.
- Moriones, E., y Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus research*, 71(1-2), 123-134.
- Muñoz García, B. L., Almádoz Parrado, J. y Martín Triane, E. L. (2010). Efecto *in vitro* del fungicida iprodione sobre *Alternaria* spp. y prospección para su inclusión en estrategias de manejo en papa, tomate, ajo y cebolla. *Fitosanidad*, 14(3), 171-176.
- Nakata, K., Hasegawa, J. y Okamura, K. (1995). Accumulation and role of Trehalose in *Towlaspora delbrueckii* No. 3110. *Bisoci. Biotech. Biochem.* 59: 986- 989.
- Olvido, A., Córdoba, M. C., Font, I. y Jordá, M. C. (2013). Virosis relevantes en el cultivo del tomate (detección, diagnóstico y control). *Phytoma-España*, S. L.
- Paiva CLA y Panek AD (1996). Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 293-314.
- Patist, A., y Zoerb, H. (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 107-113.
- Paul, M. J., L. F. Primavesi, D. Jhurrea y Y. Zhang (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-441.

- Pelegrín, L. S.; Arias, A.P.; Fajardo, J. P. y Vega, C. T. (2004). Diferenciación de variedades de tomate frente al tizón temprano (*Alternaria solani*) en dos épocas de siembra en el Valle del Cauto. *Granma Ciencia*.8 (2): 1-3.
- Pervez, M. A., Ayub, C. M., Khan, H. A., Shahid, M. A., y Ashraf, I. (2009). Effect of drought stress on growth, yield and seed quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Science*, 46(3), 174–178.
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S., van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T.C., Krutwagen, R.W.H.H. y Goddijn, O.J.M. (1998) Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.*, 152, 525-532.
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular plant pathology*, 1(5), 263-275.
- Qu, Q., Lee, S.J. y Boss, W. (2004) TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.*, 279, 47890-47897.
- Ramanjulu, S. y Sudhakar, C. (2000). Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *J. Plant Physiol.* 157:81-85.
- Ramírez, V.J. (1998). Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- Romero C., Belle´s J.M., Vaya J.L., Serrano R., Culiañez-Macia F.A. (1997). Expresión del gen de trehalosa-6-fosfato sintasa de levadura en plantas de tabaco transgénicas: los fenotipos pleiotrópicos incluyen tolerancia a la sequía. *Planta* 201: 293–297.
- Saibo, N. J., Lourenço, T., y Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany*, 103(4), 609-623.
- Sánchez, C.M.A. (1998). Enfermedades causadas por hongos en tomate. pp. 17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.
- Sato, S., Peet, M. M., y Thomas, J. F. (2000). Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic mild heat stress. *Plant, Cell and Environment*, 23(1), 719–726.
- Schiraldi C.; Di Lernia I.; De Rosa M. (2002). Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 2: 420-425.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., y Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
- SIAP. (2016). Cierre de la producción agrícola por cultivo - Tomate. México. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Singh, V. y Shah, J. (2012) Tomato responds to green peach aphid infestation with the activation of trehalose metabolism and starch accumulation. *Plant Signal. Behav.* 7, 605–607.
- Singh, V., Louis, J., Ayre, B.G., Reese, J.C. y Shah, J. (2011) Trehalose phosphate synthase11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *Plant J.* 67, 94–104.

- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (SIAP-SAGARPA). (2018). Anuario estadístico de la producción agropecuaria. México.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., y Savouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany*, 115(3), 433–447.
- Suárez R, Calderón C y Iturriaga G. (2009). Improved tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Sci.* 49: 1791-1799.
- Suárez Rodríguez, R., Raya Pérez, J., y Iturriaga De la Fuente, G. (2015). La trehalosa: Un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. *Ciencia y Tecnol. Agrop. México*, 3(1), 1-13.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., y Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Plant Microbiology*, 183(12), 3597–3605.
- Tayeh, C., Randoux, B., Vincent, D., Bourdon, N. y Reignault, P.L. (2014). Exogenous trehalose induces defences in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology*, 104, 293–305.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J. M. y Moury, B. (2011). Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *J. Gen. Virol.* 92:961-973
- Torres, A.; Campostrini E.; Goncalves J. y Bressan-Smith R. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophylla fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae* 104:199-209.
- Van Houtte, H., Lopez-Galvis, L., Vandesteene, L., Beeckman, T. y Van Dijck, P. (2013). Redundant and non-redundant roles of the trehalose-6-phosphate phosphatases in leaf growth, root hair specification and energy-responses in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.*, e23209.
- Vázquez-Ortiz F.A y Valenzuela-Soto E.M. (2004). HPLC determination of trehalose in *Selaginella lepidophylla* Plants. *Journal of Liquid Chromatography & Related technologies*. 27(12) (1937-1946).
- Vishal, B., Krishnamurthy, P., Ramamoorthy, R. y Kumar, P. P. (2019). OsTPS8 controls yield-related traits and confers salt stress tolerance in rice by enhancing suberin deposition. *New Phytologist*, 221, 1369–1386.
- Wahb-Allah, M. A., Alsadon, A. A., y Ibrahim, A. A. (2011). Drought tolerance of several tomato genotypes under greenhouse conditions. *World Applied Sciences Journal*, 15(7), 933–940.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., y Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244–252.
- Wang, W., Vinocur, B., y Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14.
- Wang, Y. J., Hao, Y. J., Zhang, Z. G., Chen, T., Zhang, J. S. y Chen, S. Y. (2005). Isolation of Trehalose-6-Phosphate Phosphatase Gene from Tobacco and Its Functional Analysis in Yeast Cells. *J. Plant Physiol.*, 162, 215–223.

- Wannet, W.J.B.; Op den Camp, H.J.M.; Wisselink, H.W.; van der Drift, C.; van Griensven, L.J.L.D. y Vogels, G.D. (1998). Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushrooms. *Agaricus bisporus*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1425, 177-188.
- Wild, A. (2003). Soils, Land and Food: Managing the Land During the Twenty-First Century. Cambridge, *Cambridge University Press*, 2003, pág. 247.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., y Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 561–580.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., y Aeschbacher, R. A. (2000). Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 124(1), 105-114.
- Xin, X. F., Kvitko, B., y He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328.
- Xin, X. F., y He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology*, 51, 473-498.
- Yadav, R., Rathi, M., Pednekar, A., y Rewachandani, Y. (2016). A detailed review on Solanaceae family. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(1), 369–378.
- Yeo, E. T., H. B. Kwon, S. E. Han, J. T. Lee, J. C. Ryu y M. Byu (2000). Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and cells* 10(3): 263.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B. y Van Vaeck, C. (1999). A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast tps1 mutant. *Plant Physiology*, 119, 1473–1482.
- Zhang, H., Hong, Y., Huang, L., Liu, S., Tian, L., Dai, Y., y Song, F. (2016). Virus-induced gene silencing-based functional analyses revealed the involvement of several putative trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase genes in disease resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in tomato. *Frontiers in plant science*, 7, 1176.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W. L., Chen, H. y Ecker, J. R. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 126(6), 1189-1201.
- Zhao, L., Zhang, H., Li, J., Cui, J., Zhang, X., y Ren, X. (2012). Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia carribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3916-3932.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2002:53:247-73.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 27 de septiembre del 2023.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: Capacidad del tomate (*Solanum lycopersicum* cv Ailsa Craig) sobreproductor de trehalosa para contender el estrés biótico y abiótico, que presenta la **C. Dayana Martínez Basulto**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ y codirección del DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (director de tesis, CEIB/UAEM)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (codirector de tesis, CEIB/UAEM)

DR. MARIO RAMÍREZ YAÑEZ (CCG/UNAM)

DRA. VERONICA OBREGON BARBOZA (CEIB/UAEM)

DR. ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ (FCQB/UAGro)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ | Fecha:2023-09-27 20:27:21 | Firmante

M2fvvxvFB06RMcZykqxeLdxryxxDG+P+DiTM2WQNNTHOgV86pAVIEU1X76KJqSEU2UA12+8p45p6i+HF3gR9SGuK8wVN68wUYMH0h64Wkp3AwtcApSsptlZA7llkqDe0v7n
vR19FaaYcfyK3e3Wgpvvo1Von9aXSde2ffhgNdvJWv7kACOXmKMMmO+nQ7vX/8bMR3tzY2ej0lbuTY26F2dGxukGbjakyLCEHgnqwozh592DIW2m8+jzNimHpYTluX+3cCNsa5
ODTS4gRgR9G0BHZq0a1UyUQn6MPj1QjrxkN/iFa3DejYOT6ymsVgPqeAzP1YMMWLRkoqBzllg==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2023-09-27 21:14:41 | Firmante

YJaY/yYvdM3sKrwMKggDIJPDnXoCp6Gm+3LGi6Bqm8nPSPKgr1fSXsgdNuwWX7omemicz3TXuqf8TTcuqL7GjB7DozstFdZFAW//jnUBil2cu6GG15c2zYRvmV7iE3pHvCGy0
cS3Z6jPG8z04w4qEwV/9iKDXBebCx8emWHDxccc6V227zZvSnwpyibdwqjpD3GwgMlax+/sqCYobWncr1p9JGNLgt9tqoOH1C9C/BcEwZDt8DhG1gDSPAqJi19LOYsuLUIMDZZ8
1hHCYrLCKT4D61GQVhIF3R+wPwJMP+nL1Dw2gYY5F2knzT9Ay9M9Pfe9uNd3uYEoCiWk81Q==

MARIO RAMÍREZ YAÑEZ | Fecha:2023-09-28 16:46:27 | Firmante

E1HshZucyw77XqN6N7UISTQjMekimXj/PRsakkxjEoC+pmgVmCcl10F1DoWk54NvmBxOeoeXnLKwMGqj7e6021iF7lqXlo2fdmHWJ3GWPoJb1+VxmTAZOVYgCeGEude7vhMf
7M0jrOUBm+TPNHbgJTD1zcEH2S0Tq4eTDMefTYPswBHeMM0BmTE4BUxaUiO4QlcDgmKkoc7dV7sQcfqX3gw3APN06QN7eiR1x7ZnnvQw3sZO83HznEUmEZTM8mKYAU
E8LB7JuUJCxpWcJ+sDu7agkPDilLIMky6F8cKEPiv3t180+FFYBqKTKnfYiCG29eUZwa9y6+lclczdSxyA==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2023-09-29 18:03:53 | Firmante

D6sSI7nK2lP1bhfU93dIVQqkRBoGKBzHAMxzsT/ej784cXwhErZiV7mdK0NZAXkVnFurTFGsficR0vlfXL1lfvQM7mW0ETWBi0dXawV3dii9QsT/sPK4PT0bWozgFet1uaZfgxi3iX
KXzd9OvLwZrOUZDJujkGBy+9iKjnUcS/7Buu+mXC8HrTDFUFHnsM4yYjepWQrSbye8ppqaEoFaVYpfe7Y3r0c0miFLBaxEBAFW8zAN9MvLTPzEkVzmSngtVaT/5opv8E6vMrRwF
k1F+IPo+yk85VvcqJ5TpvscX1s8IP8AUd2T/5BjKws0cGqLUKGA6U+2MEGv3AXi9cw==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-10-03 13:05:41 | Firmante

Zn/KlmK9iZgEG2cX9N2JTIFvnmCU+9g5lAcZBWP33zyxfxyKdNtuqQTrQe2awl8jBneP9tlnLWafsr249o+ofbhlfedzE6IIEZCTJ11I6/ZHex6owmOz9hp2uc7INh4qq8ge6P9xP9alPQo
++ijH8QAzaXbn4B71rYBkBYC8cYjuCQnoXfCOaW6oRWX1JoTBjy2IKnuDBxF5UjC5ltsSu8s0W8aZgb9Jjifmpu5NRjmw4NqIKnovZpZS6rX3N4Nwko9VRcBrSA1v9LVRL8kxod
cahljKZNiaEXr8ivT0mSDrS5mM7H81k4GqF61qhaHlnt6Np3gUqCkq+wCmVsj/w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



oGvPZ5ijN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9sllg33NpXjQkFuktYarYLdVrw8dJdC>

