



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

RESPUESTA INMUNE DE LÍNEAS INSERCIONALES OX-RAC7 DE *Arabidopsis thaliana* FRENTE A PATÓGENOS CON DIFERENTES ESTILOS DE VIDA

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JESSICA SAMANTHA SEGURA MUÑOZ

DIRECTOR

DR. MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA

CODIRECTORA

M.C. IVETTE GARCÍA SOTO

CUERNAVACA, MORELOS

Febrero, 2024

Este trabajo se realizó dentro del laboratorio IV del Programa de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, gracias a la beca otorgada por el Proyecto PAPIIT IN203023 de la DGAPA UNAM.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco ...

A mi tutor de tesis, el Dr. Mario Alberto Serrano Ortega por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, así como su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A mi co-tutora de tesis, la M.C. Ivette García Soto por todas sus valiosas enseñanzas, tiempo, consejos, paciencia y amistad que me brindo durante la realización de este proyecto que me permitieron poder finalizarlo.

A mi comité tutorial, la Dra. Rosa Cerros Tlatilpa, Dra. Verónica Obregón Baboza, Dr. Ramón Suárez Rodríguez y Dr. Edgar Dantán González por el apoyo, sugerencias y comprensión que tuvieron conmigo en cada evaluación.

Al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera, a la M.C. Yoloxochitl Sanchez Guevara y al Dr. Gastón Contreras Jiménez por el apoyo técnico.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco ...

A mis hijos amados, Azura, Enki y Asshar por ser la motivación de mejorar día con día.

A mi querido compañero, amigo y esposo Gastón por todo el amor, paciencia, comprensión y ayuda que me ha dado durante todos estos años juntos.

A mi padre por todo el amor y confianza que me ha dado. Por darme la libertad que he necesitado para ser quien realmente soy.

A mi familia por acompañarme en cada uno de mis logros y fracasos. Por siempre estar ahí en cada ocasión que los he necesitado.

A mi hermana Diana Camacho por siempre apoyarme y motivarme a continuar con mis propósitos.

A mis amigos Reynel, Corina, Ricardo, Michel y Humberto por siempre estar para mí y por todos los momentos que hemos compartido juntos durante todos estos años.

A mis compañeros de laboratorio Angie, Norma, Jair, Yordan, Carlos, Elizabeth, Luis, Martha, Gladis, Rocío y Litzy por brindarme su ayuda y conocimientos en todas las ocasiones que lo necesite.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Organismos fitopatógenos.....	2
2.2. <i>Botrytis cinerea</i>	3
2.2.1 Mecanismo de infección <i>B. cinerea</i>	4
2.3 <i>Pseudomonas syringae</i>	5
2.3.1 Mecanismo de infección de <i>P. syringae</i>	5
2.4 <i>Pectobacterium brasiliense</i>	6
2.4.1 Mecanismo de infección de <i>P. brasiliense</i>	6
2.5 Sistema inmune innato en plantas.....	6
Figura 1. Modelo zig-zag del sistema inmune de plantas. La detección de PAMP's activa la respuesta PTI de la planta, por su parte el patógeno libera efectores para evadir la PTI, por lo que la planta activa su segunda respuesta llamada ETI que tiene una mayor amplitud de defensa, sin embargo, el patógeno es capaz de desarrollar proteínas efectoras más virulentas para la planta y a su vez la planta tiene una respuesta ETI más eficaz (Jones y Dangl, 2006).	7
2.6 GTPasas pequeñas.....	8
2.7 Proteínas RAC/ROP.....	8
2.7.1 El papel de las RAC/ROP en la patogénesis.....	10
2.7.2 RAC7/ROP9.....	10
2.8 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPOTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Material vegetal.....	14
6.1.1 Estratificación y germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
6.1.2 Germinación de esporas de <i>B. cinerea</i>	15
6.1.3 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de <i>A. thaliana</i> con <i>B. cinerea</i>	15
6.2 Preparación del pre-inóculo de <i>P. syringae</i>	16
6.2.1 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de <i>A. thaliana</i> con <i>P. syringae</i>	16
6.2.2 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en plantas de <i>A. thaliana</i> infectadas con <i>P. syringae</i>	17
6.3 Preparación de pre-inoculo de <i>P. brasiliense</i>	18
6.3.1 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de <i>A. thaliana</i> con <i>P. brasiliense</i>	18
6.4 Generación de construcciones genéticas para determinar la localización subcelular de RAC7.....	19
6.4.1 Amplificación de <i>VENUS</i>	19
6.4.2 Purificación del producto PCR.....	23

6.4.3 Digestión de plásmidos.....	23
6.4.4 Ensamble Gibson	24
6.4.5 Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i>	25
6.4.6 Confirmación de colonias de bacterias <i>E.coli</i> DH5α transformadas	25
6.4.7 Purificación del plásmido	26
6.4.8 Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i>	27
6.4.9 Confirmación de colonias de bacterias <i>A. tumefaciens</i> GV3101 transformadas	27
6.5. Transformación de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> por agroinfiltración	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1 Infección de líneas insercionales de OX-RAC7 de <i>A. thaliana</i> con <i>B. cinerea</i>.....	29
7.2 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de <i>A. thaliana</i> con <i>P. syringae</i>	31
7.3 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de <i>A. thaliana</i> con <i>P. brasiliense</i>.....	33
7.4 Seguimiento de la localización subcelular de RAC7	35
7.4.1 Amplificación de VENUS y RAC7.....	35
7.4.2 Purificación del producto de PCR.....	38
7.4.3 Digestión de plásmidos	38
7.4.5 Purificación de plásmido	40
7.4.6 Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	41
7.4.7. Transformación de hojas de <i>N. benthamiana</i> por agroinfiltración	42
8. CONCLUSIONES.....	45
9. PERSPECTIVAS.....	46
9. LITERATURA CITADA	47
ANEXOS	56

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas durante su crecimiento están constantemente expuestas a diversos factores ambientales, incluyendo el ataque de organismos que afectan su desarrollo y reproducción (del Amor et al., 2006). Para evitar estos daños cuentan con un arsenal de defensas preexistentes (del Amor et al., 2006), por ejemplo los mecanismos de defensa pasiva y los mecanismos de defensa inducibles (Cruz et al., 2006). Los mecanismos de defensa pasiva consisten en barreras físicas como la cutícula, formada por ceras y cutina que cubren los órganos vegetales superiores; la pared celular; así como la forma, tamaño y comportamiento de los estomas y lenticelas (Cruz et al., 2006). Los mecanismos de defensa inducibles incluyen genes de defensa que se expresan de forma local en el sitio de infección y señales sistémicas, que provienen del sitio de infección y que inducen las defensas en toda la planta, muy similares a la inmunidad innata de los animales (Cruz et al., 2006; Zipfel, 2008).

El estudio de estos mecanismos de defensa adquiere gran importancia en el sector agrícola, debido a que las enfermedades provocadas por patógenos tienen un impacto en la pérdida de alimentos a nivel mundial, lo que pone en riesgo la disponibilidad de los mismos. Los agricultores han hecho un uso indiscriminado de plaguicidas utilizados para garantizar la protección de los cultivos contra enfermedades, tan solo al año son utilizados 2 toneladas de plaguicidas en el mundo (Zhitao et al., 2023). Sin embargo, estos plaguicidas contienen compuestos que se acumulan en suelos y cuerpos de agua, contaminando el ambiente y llegando a afectar la salud de los organismos, incluyendo al humano que se

encuentran expuestos a estos agroquímicos (Arauz, 1998; Lahlali et al., 2022). Por lo que para poder reducir el uso de plaguicidas es importante buscar otras alternativas que ocasionen menos afectaciones en el medio ambiente y en los organismos expuestos. Una de estas alternativas es conocer los mecanismos moleculares de defensa usados por las propias plantas para contrarrestar los ataques de los patógenos, ya que la identificación y caracterización de las defensas vegetales inducibles permitirá tener más estrategias para reducir las afectaciones causadas por los fitopatógenos. Con esto en mente, y con el fin de elucidar los mecanismos moleculares usados por la planta para interactuar con los microorganismos patógenos, en este proyecto nos enfocamos en caracterizar el papel del gen *RAC7/ROP9* durante la interacción *Arabidopsis thaliana*-patógeno, utilizando patógenos con distintos estilos de vida que afectan a un gran número de especies de plantas de importancia agrícola.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Organismos fitopatógenos

Existe un gran número de organismos patógenos de plantas, también llamados fitopatógenos, que causan daños en el sector agrícola y hortícola, entre los cuales se encuentran los hongos, bacterias, plantas parásitas, nemátodos, protozoarios y micoplasmas, así como también otros agentes infecciosos como virus y viroides (Agrios, 2005; Al-Ani y Furtado, 2020).

Los patógenos de plantas han desarrollado diversas estrategias para obtener nutrientes y cumplir con su ciclo de vida. con base en la manera en la que estos

obtienen nutrientes se les ha clasificado como: 1) biótrofos, los cuales infectan a la planta sin llegar a causarles la muerte, los 2) necrótrofos que causan la muerte celular del hospedero en el sitio de infección para poder adquirir nutrientes y los 3) hemibitrofos los cuales cuentan con una etapa inicial donde utilizan mecanismos de infección similares a los patógenos biótrofos y una segunda en la cual causan la muerte celular del hospedero como lo hacen los necrótrofos (Agrios, 2005).

Dichos organismos son los responsables de grandes pérdidas en la producción de alimentos a nivel mundial, con pérdidas estimadas de alrededor del 27 al 42% de la producción (Singh, 2014). Tan solo los hongos fitopatógenos son responsables de causar el 80% de las enfermedades en plantas (Hussein et al., 2014), particularmente *Botrytis cinerea* es el segundo hongo fitopatógeno con mayor importancia económica debido a la amplia gama de huéspedes que infecta y a su gran distribución mundial. Este hongo afecta hortalizas, plantas ornamentales, y cultivos de interés alimenticio (Williamson et al., 2007; Dean et al., 2012).

Otro grupo de patógenos vegetales con impacto en la agricultura son las bacterias, estas causan enfermedades en cualquier órgano de la planta e incluso en semillas (Patyka, 2016). Llegan a dañar parcial o totalmente los órganos de la planta hasta provocar la muerte. También se ha observado que las plantas infectadas con bacterias tienen una disminución en la producción de frutos y bayas, reduciendo la calidad y rendimiento de la cosecha (Patyka, 2016).

2.2. *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* comprende más de 20 especies que se caracterizan por ser un grupo de hongos necrótrofos, que provocan la muerte celular del hospedero y

la descomposición del tejido vegetal infectado (Staats et al., 2005). En particular, *B. cinerea* es un patógeno ubicuo que afecta a un gran número de plantas, en su mayoría dicotiledóneas, siempre y cuando las condiciones ambientales lo permitan (Williamson et al., 2007). Este patógeno provoca la enfermedad conocida como “moho gris” o “podredumbre”, la cual se caracteriza por el reblandecimiento y coloración marrón de los tejidos vegetales infectados (Pinilla y Álvarez, 2002). Se ha convertido en una de las enfermedades más comunes que afecta a más de 200 especies vegetales de cultivos en todo el mundo, principalmente a plantas adultas, debilitadas o heridas, tejidos senescentes y alimentos durante la postcosecha (Williamson et al., 2007; Beever y Weeds, 2007). De igual manera, se han reportado infecciones transmitidas por semillas en más de 50 plantas hospederas (Maude, 1980).

2.2.1 Mecanismo de infección *B. cinerea*

La infección de *B. cinerea* comienza cuando las esporas se establecen sobre los tejidos vegetales del hospedero y germinan. Para poder penetrar la cutícula de las plantas desarrollan un apresorio, que es una estructura que se diferencia en forma de estaca o gancho (Gourges et al., 2004). La punta del apresorio secreta enzimas como las cutinasas y lipasas que degradan la pared celular, además también produce peróxido de hidrogeno, un compuesto que se cree inhibe la actividad de las oxidasas, responsables de reforzar la cutícula del hospedero vegetal, así es como le facilita al hongo penetrar los tejidos de la planta (Tenberge, 2002). Una vez que el patógeno penetra la cutícula vegetal, el gancho crece sobre la pared anticlinal de la célula epidérmica subyacente, que al ser rica en pectina el

hongo secreta pectinasas, Pectin Metil Esterasas (PMEs), celulasas y hemicelulasas para facilitar la infección (Tenberge, 2002).

2.3 *Pseudomonas syringae*

Existen alrededor de 200 especies bacterianas causantes de enfermedades en plantas (Leonberger et al, 2016). Contrario a los hongos, las bacterias no cuentan con estrategias para atravesar directamente la epidermis e ingresar al tejido vegetal, por lo que aprovechan aberturas naturales de la superficie de la epidermis de las hojas (hidátodos, estomas y nectarios), del tallo (lenticelas) o por lesiones causadas por insectos o por factores abióticos. Los estomas son las principales aberturas naturales de ingreso de las bacterias patógenas debido a que se encuentran en mayor número sobre la superficie de la planta (Melotto et al., 2008).

Las bacterias gram negativas de *P. syringae* están compuestas por cepas que infectan un amplio rango de plantas. Se conocen alrededor de 50 diferentes patovares en función del rango de hospederos específicos que tienen (Morris et al., 2007). Las plantas infectadas por *P. syringae* causan manchas necróticas y clorosis en hojas, tallos, frutos y otras partes aéreas de la planta (Beattie y Lindow, 1995).

2.3.1 Mecanismo de infección de *P. syringae*

P. syringae es un fitopatógeno hemibiótrofo que tiene una etapa epífita en la cual reside sobre la superficie de la planta, multiplicándose y en espera de poder ingresar al tejido vegetal por medio de aberturas naturales o lesiones. Una vez

dentro de la planta comienza su etapa endófito, alojándose en el apoplasto y causando necrosis para obtener nutrientes de las células muertas (Beattie y Lindow, 1995; Melotto et al., 2008).

2.4 *Pectobacterium brasiliense*

P. brasiliense, antiguamente conocido como *Pectobacterium carotovorum*, es una bacteria gram negativa y es uno de los principales patógenos que causa pudriciones blandas a una amplia variedad de cultivos, principalmente a la papa (*Solanum tuberosum*) y sobre todo, mayores afectaciones en la postcosecha. Esto ha generado grandes pérdidas económicas en el sector agrícola (De la Rosa, 2017; Narváez-Barragán et al., 2020).

2.4.1 Mecanismo de infección de *P. brasiliense*

Cuando las condiciones de humedad son adecuadas, las bacterias que se encuentran en el suelo o sobre la superficie de las plantas u otros organismos, pueden ingresar por estomas o por heridas de la planta. Para obtener nutrientes cuentan con enzimas como la pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasas, que intervienen en la degradación de los componentes de la pared celular vegetal, provocando la maceración de los tejidos infectados (De la Rosa, 2017).

2.5 Sistema inmune innato en plantas

El sistema inmune innato de las plantas se divide en dos diferentes tipos de respuesta durante la interacción planta-patógeno: PTI (del inglés *PAMP-Triggered*

Immunity) y ETI (*Effector-Triggered immunity*). La primera inicia cuando receptores PRR's (del inglés, *Pattern Recognition Receptors*) reconocen patrones moleculares provenientes del patógeno llamados PAMP's o MAMP's (*Pathogen-Associate Molecular Patterns / Microorganism-Associate Molecular Patterns*). Estos patrones moleculares son componentes esenciales típicos de los grupos microbianos, como la quitina en el caso de los hongos. Una vez que las proteínas PRR's reconocen los PAMP's/MAMP's conducen a la inmunidad desencadenada por PAMP llamada respuesta PTI. La segunda respuesta es llevada a cabo cuando los patógenos producen proteínas efectoras que inhiben la PTI. En respuesta, el hospedero induce la susceptibilidad activada por efectores ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*), donde los efectores son reconocidos por proteínas NB-LRR (*Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat*) que desencadenan la respuesta ETI para combatir nuevamente al patógeno. Tanto la PTI como la ETI dan lugar a respuestas similares, aunque la ETI resulta ser una repuesta cualitativamente más eficaz y rápida y que generalmente implica la muerte celular. (Jones y Dangl, 2006) (Fig. 1).

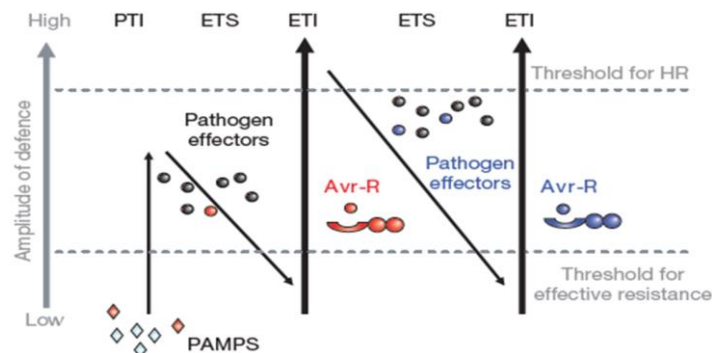


Figura 1. Modelo zig-zag del sistema inmune de plantas. La detección de PAMP's activa la respuesta PTI de la planta, por su parte el patógeno libera efectores para evadir la PTI, por lo que la planta activa su segunda respuesta llamada ETI que tiene una mayor amplitud de defensa, sin embargo, el patógeno es capaz de desarrollar proteínas efectoras más virulentas para la planta y a su vez la planta tiene una respuesta ETI más eficaz (Jones y Dangl, 2006).

2.6 GTPasas pequeñas

Las proteínas de la superfamilia RAS pertenecientes a las proteínas G monoméricas pequeñas, se encuentran en eucariontes (Colicelli, 2004). Estas han sido divididas de acuerdo a sus secuencias y similitudes funcionales en cinco subfamilias: RAN, RAB, RHO, RAS y ARF. Estas proteínas se caracterizan por funcionar como interruptores moleculares que alternan su estado de “encendido” cuando se unen a GTP y su estado “apagado” cuando hidrolizan GTP a GDP. Todas las proteínas de la superfamilia RAS tienen un dominio conservado llamadas cajas G (G1-G5) o dominio G, en donde ocurre la unión e hidrólisis de GTP. Además, en el caso de las subfamilias RAS, RHO y RAB cuentan con un dominio C-terminal hipervariable el cual sufre modificaciones post-traduccionales que le permite el anclaje a la membrana celular (Rojas et al., 2012).

Las proteínas RAB, RAN y ARF están involucradas en el control de la formación de vesículas, en el proceso de tráfico nuclear y en el crecimiento y desarrollo celular (Rojas et al., 2012). Por su parte las proteínas RHO y RAC desempeñan funciones reguladoras en la organización del citoesqueleto de actina, además las proteínas RHO también participan como puntos de control en las redes de señalización (Rojas et al., 2012).

2.7 Proteínas RAC/ROP

La familia de las proteínas RHO está conformada por las subfamilias RHO, CDC42, RAC y ROP (del inglés *Rho proteins of plants*) (Winge et al., 1997). Esta última subfamilia originalmente llamada RAC por su gran similitud con las

proteínas RAC de los mamíferos (Winge et al., 1997) se encuentra exclusivamente en los miembros de las algas verdes, musgos y angiospermas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Eklund et al., 2010). De acuerdo con la secuencia de aminoácidos en la región C-terminal, las ROP se han dividido en dos subgrupos: Tipo I y Tipo II, se ha sugerido que las de tipo II se diversificaron a partir del tipo I mediante la inserción de un intrón adicional en su extremo 3' a partir de un gen ROP ancestral (Winge et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente las ROP funcionan como interruptores moleculares, pasando de un estado activo, cuando se encuentran unidas a GTP, a un estado inactivo, cuando el GTP se hidroliza a GDP. Esta activación e inactivación dependientes de la unión de GTP/GDP están regulados por factores de intercambio de nucleótidos llamados GEF (del inglés: *Guanine Nucleotide Exchange Factor*), que ayuda a la liberación de GDP, y por proteínas activadoras de GTPasa llamadas GAP (del inglés: *GTPase activating protein*), que promueven la hidrólisis de GTP a GDP para que las proteínas ROP puedan pasar del estado activo al inactivo (Berken y Wittinghofer, 2008; García, 2019).

Cada planta cuenta con un número variable de proteínas ROP, por ejemplo: *Selaginella moellendorffii* (Licofita) tiene dos, *Physcomitrella patens* (musgo) y *Pinus taeda* (conífera) cuentan con cuatro, *Zea mays* (maíz), *Solanum lycopersicum* (jitomate) y *Lotus japonicus* tienen nueve, *Oryza sativa* (arroz) tiene siete y *Arabidopsis thaliana* cuenta con once (Fowler, 2010).

Las ROP además de estar implicadas en la regulación de actina y organización de microtúbulos del citoesqueleto, participan en la endocitosis, exocitosis, transporte de auxinas, señalización mediada por ABA, formación de

pared celular secundaria y respuesta a patógenos bacterianos y fúngicos (Zheng, et al., 2002).

2.7.1 El papel de las RAC/ROP en la patogénesis

RAC1 de la planta del arroz *O. sativa* (OsRAC1) es la RAC/ROP más estudiada, se ha demostrado que es clave para la señalización temprana de defensa PTI y ETI mediada por las proteínas PRR y NLR durante la interacción con el hongo *Magnaporthe oryzae* (Engelhardt et al., 2020). Otra RAC estudiada es la de la cebada (*Hordeum vulgare*), HvRACB, que actúa de manera contraria a OsRAC1, dado a que confiere mayor susceptibilidad al hongo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* causante de la enfermedad del oídio de la cebada, esto debido a que forma un compartimiento apoplástico en el que se promueve el arreglo del haustorio, el cual posee una matriz extrahaustorial similar a la pared celular y además una membrana continua con las células vegetales del hospedero. Este comportamiento se ha comparado con el crecimiento de pelos radiculares y/o de tubos polínicos que requieren de la participación de las ROP en el rearrreglo del citoesqueleto y tráfico vesicular (Engelhardt et al., 2020).

2.7.2 RAC7/ROP9

La RAC7/ROP9 de *A. thaliana* es una GTPasa pequeña que aún se desconoce su función, sin embargo, su ortólogo OsRAC1 en plantas de arroz (*O. sativa*), está muy bien estudiada y se descubrió que tiene una participación fundamental en la activación de los procesos defensa corriente abajo de la detección de elicitores por las proteínas PRR de la célula vegetal. Estudios

demonstraron que un mutante activado constitutivamente de OsRAC1 mostraba una mayor resistencia a la enfermedad del estallido del arroz provocada por el patógeno *M. grisea* y a la enfermedad del tizón causada por *Xanthomonas oryzae*, ya que presentó una mayor formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) seguido de la muerte celular (Sormo et al., 2006; Young-Ho et al., 2006).

2.8 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Existen varias plantas que se han utilizado como modelos genéticos, tal es el caso del tomate, arroz, cebada y petunia entre otras (Meinke et al., 2012). Sin embargo, *A. thaliana* es uno de los modelos biológicos mejor establecido para el análisis de las rutas metabólicas y fisiológicas básicas de las plantas. Esto debido a que fue la primera planta en secuenciarse su genoma y actualmente se cuenta con una base de datos muy completa (Koch et al., 2017).

A. thaliana es un herbácea perteneciente a la familia de las Crucíferas (Brassicaceae), con una distribución en toda Europa, Asia y América del Norte. Tiene un genoma relativamente pequeño de aproximadamente 125 Mb (20,000 genes), organizados en cinco cromosomas. Su ciclo de vida es relativamente corto, de aproximadamente 6 semanas, tarda alrededor de tres semanas en florecer y la planta adulta llega a alcanzar una altura de 30 cm. Sus hojas tienen pequeños tricomas y crecen en forma de roseta que van de 2 a 10 cm de diámetro (dependiendo de las condiciones de crecimiento). Sus flores llegan a medir 2 mm, mientras que las semillas miden solo 0.5 mm de longitud (Marsch et al., 2009; Meinke et al., 2012). La reproducción es autógama, lo que permite que los

cruzamientos se puedan llevar a cabo fácilmente (González y Álvarez, 2007). Por su pequeño tamaño pueden cultivarse en placas de Petri o en pequeñas macetas.

Dadas a las características antes mencionadas, *A. thaliana* resulta un buen modelo biológico para comprender el crecimiento, desarrollo, acción y respuestas a señales ambientales o a interacciones con otros organismos y aunque se ha recopilado gran información aún sigue siendo limitada (Meinke et al., 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

En las plantas el reconocimiento de los patógenos es llevado a cabo por receptores que desencadenan procesos celulares tales como la deposición de calosa, la acumulación de especies reactivas del oxígeno, incremento en las concentraciones de calcio y activación de las MAPK. Aun cuando son bien conocidos los eventos fisiológicos que se activan ante el reconocimiento de patógenos, no se conocen los mecanismos de señalización que conectan el reconocimiento del patógeno con la respuesta inmune de la planta. La familia de proteínas reguladoras RAC/ROP pudieran ser dicha conexión, debido a su papel bien descrito como interruptores moleculares. En *O. sativa* se ha reportado el papel de OsRAC1 en la defensa de esta planta frente a varios agentes fitopatógenos. En *A. thaliana* AtRAC7 constituye el ortólogo más cercano de OsRAC1. En el laboratorio de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) se ha estudiado el papel de dicha proteína en la interacción planta-patógeno a través de la caracterización funcional de las líneas insercionales *OX-RAC7* de *A. thaliana* y se ha observado que presentan

susceptibilidad incrementada a *B. cinerea* debido a la represión de importantes vías de defensa. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual RAC7/ROP9 pudiera regular la respuesta de *A. thaliana* frente a este patógeno o a otros con diferentes estilos de vida. Es por ello en este proyecto se propuso determinar el posible papel de RAC7/ROP9 frente a patógenos de interés agrícola, así como la generación de construcciones genéticas que permitan el estudio de localización subcelular de RAC7/ROP9 frente a patógenos a través de la generación de la fusión traduccional de dicha proteína con la proteína fluorescente Venus.

4. HIPOTESIS

El gen *RAC7/ROP9* está involucrado en la respuesta inmune de *A. thaliana* frente a *B. cinerea*, *P. Syringae* y *P. brasiliense*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Caracterizar la susceptibilidad de líneas insercionales *OX-RAC7* de *Arabidopsis thaliana* frente a patógenos con diferentes estilos de vida.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el grado de susceptibilidad de líneas sobrepresoras *RAC7/ROP9* en *A. thaliana* frente a *B. cinerea*, *P. syringae* y *P. brasiliense*.
- Determinar si existen cambios en la localización subcelular de RAC7/ROP9 frente a *B. cinerea* por medio de la fusión traduccional *VENUS:RAC7*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0) como control (wild type) y dos líneas homocigotas (previamente genotipificadas), sobreexpresantes de *AtRAC7/ROP9* (*OX-RAC7.1* Y *OX-RAC7.2*) solicitadas al Instituto Salk (Tabla1). Las líneas insercionales *OX-RAC7* tienen el T-DNA insertado en la región 5' UTR (Anexo1).

Número de acceso ROP	Nombre	Línea de inserción	Nombre de la línea de inserción
AT4g28950	<i>AtRAC7</i>	SALK_019272.56.00.x	<i>OX-RAC7.1</i>
		SALK_015223.56.00.x	<i>OX-RAC7.2</i>

6.1.1 Estratificación y germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*

La estratificación de las semillas de *A. thaliana*, se realizó colocándolas en un tubo de eppendorf con 500 µl de H₂O destilada, durante 3 días a una temperatura de 4°C. Al ser semillas muy pequeñas, fueron depositadas en una maceta con la ayuda de una pipeta y llevadas al cuarto de germinación durante 10 días. Una vez germinadas las semillas, las plántulas fueron separadas y trasplantadas en charolas con sustrato compuesto con peat moss y vermiculita en una proporción 3:1. Posteriormente fueron colocadas en el invernadero para su crecimiento durante 4-5 semanas, a una temperatura de 22°C y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

6.1.2 Germinación de esporas de *B. cinerea*

Para la germinación de esporas se utilizó la cepa B05.10 de *B. cinerea* la cual se cultivó en placas de agar papa dextrosa (PDA, 6g L⁻¹). Posteriormente las esporas fueron recolectadas con agua destilada y filtradas para remover las hifas. Para preparar el inóculo con *B. cinerea* se realizó en un medio ¼ caldo papa dextrosa PDB con una concentración de 5x10⁴ esporas/ml de *B. cinerea*, y se dejó reposar en oscuridad durante 1 hora antes de ser utilizada (Aragón et al., 2021).

6.1.3 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de *A. thaliana* con *B. cinerea*

Se utilizaron plantas Col-0 y líneas insercionales OX-RAC7 (OX-RAC7.1 Y OX-RAC7.2) de *A. thaliana* de 4-5 semanas de edad para la infección con *B. cinerea*. Para ello se colocaron 6 µl de solución con esporas a una concentración de 5x10⁴ esporas/ml directamente sobre las hojas de la planta. Posteriormente se cubrieron y sellaron entre dos charolas oscuras para mantener las condiciones de humedad y oscuridad para el crecimiento e infección óptimo del hongo. Después de 3 días, se evaluaron síntomas de infección por *B. cinerea* como el reblandecimiento de tejido. Para medir el área de lesión fúngica las hojas fueron cortadas y pegadas sobre un fondo blanco para ser fotografiadas y medir el área de lesión de cada una de las hojas con el programa ImageJ. Una vez que se obtuvo el área total de lesión causada por *B. cinerea* de las hojas infectadas, se utilizó el programa de GraphPad para procesar los datos y graficarlos (Aragón et al., 2021).

6.2 Preparación del pre-inóculo de *P. syringae*

Se inoculó una colonia de *P. syringae* de una placa fresca en 50 ml de medio LB líquido con Rif (50µl/ml) y se incubó a 28°C overnight (8-12h). Al siguiente día se midió la densidad óptica hasta que se obtuvo una $OD_{600nm}=0.6$ para asegurar que las bacterias se encontraban en la fase logarítmica y por lo tanto eran viables. Por otra parte, se incubó medio LB sin *P. syringae* que se utilizó como control para establecer el estándar (blanco) para la lectura en el espectrofotómetro. El cultivo líquido de bacterias fue centrifugado a 2,500 g por 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de bacterias en 50 ml de $MgCl_2$ 10 mM (Anexo 3). Se midió la densidad óptica y se ajustó a una $OD_{600}= 0.2$ (contiene aproximadamente 1×10^8 UFC/ml) para infectar las plantas de *A. thaliana* (Jacobo et al., 2017).

6.2.1 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de *A. thaliana* con *P. syringae*

Antes de comenzar con la infección de Col-0, OX-RAC7.1 y OX-RAC7.2 con *P. syringae* pv. tomato DC3000 se marcaron dos hojas por cada planta para poder identificarlas después de la infección. Se utilizó $MgCl_2$ para infiltrar las hojas que se utilizaron como control. Por otro lado, las hojas que se infectaron fueron inoculadas con una suspensión de $MgCl_2$ y *P. syringae*. La infiltración se realizó a presión con una jeringa de 3ml en el envés de las hojas, por lo que fueron invertidas cuidadosamente para evitar dañarlas. Posteriormente se cubrieron las plantas para mantener la humedad y oscuridad y fueron llevadas al cuarto de cultivo durante 3 días (Jacobo et al., 2017).

6.2.2 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en plantas de *A. thaliana* infectadas con *P. syringae*.

Después de los 3 días de la infección, se colectaron las hojas infectadas y se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% durante 1 minuto, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril por 1 min en cada enjuague y se dejaron secar cuidando que quedaran extendidas las hojas. Una vez secas las hojas, se cortaron discos de 1cm² de área con la boquilla de una punta de pipeta (1,000 µl) estéril y se colocaron 8 discos (8 cm²) en cada tubo Eppendorf (1.5 ml) que contenía 1ml de MgCl₂ (10 mM) para cada una de las réplicas. Los discos se maceraron con mini-pistilos de plástico estériles hasta que el tejido vegetal ya no era visible. Se realizaron diluciones seriadas hasta 1x10⁴ y se plaquearon las diluciones de 1X10⁻³ y 1X10⁻⁴. En cada placa se colocaron 4 alícuotas de 10 µl (un total de 40 µl por placa) con su respectiva dilución y se incubaron a 28°C por 48 h. Para el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), se calculó el factor de dilución (1,000 µl) entre el volumen que se aplicó para cada replica técnica (0.01 ml) y nuevamente dividido entre el área de tejido presente en cada muestra (8 cm²). La población fue calculada dividiendo las unidades formadoras de colonias entre el tejido vegetal que se utilizó (UFC/cm² de tejido vegetal) (Jacobo et al., 2017).

6.3 Preparación de pre-inoculo de *P. brasiliense*

El pre-inoculo se preparó tomando una pequeña cantidad del cultivo de *P. brasiliense* la cual se depositó en 3 ml de medio LB líquido y se dejó en incubación a 30°C overnight (8-12h). Se mantuvo el pre-inóculo en la incubadora hasta que se obtuvo una $OD_{600nm}=0.6$, ésta es la densidad óptica en la cual las bacterias se encuentran en la fase exponencial. A continuación, se centrifugó el cultivo a 2,500 g por 10 min y se desechó el sobrenadante, volviendo a resuspender el pellet con medio LB. Finalmente se midió la densidad óptica y se ajustó para obtener una $OD_{600nm}= 0.1$ (densidad óptica en la cual se tiene aproximadamente 1×10^8 UFC/ml), para poder infectar las plantas de *A. thaliana* (Narváez-Barragán et al., 2020).

6.3.1 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de *A. thaliana* con *P. brasiliense*

Previo a la infección, los tallos de las hojas fueron marcados. A cada hoja infectada (2 por planta) se le colocó 6 μ l de inoculo sobre la superficie de la hoja y fueron cubiertas con una tapa para mantener la humedad y oscuridad, lo que facilita la infección de la bacteria. En un lapso de 24-48 h se observaron las lesiones causadas por la bacteria y se calculó el porcentaje de incidencia (Narváez-Barragán et al., 2020).

6.4 Generación de construcciones genéticas para determinar la localización subcelular de RAC7

6.4.1 Amplificación de VENUS

Para realizar la fusión traduccional de *VENUS:RAC7* y poder determinar si existen cambios en su localización subcelular frente *B. cinerea*, se generaron dos construcciones. La primera está constituida únicamente por la proteína fluorescente VENUS la cual llamamos TurboID:VENUS y se utilizó como control. La segunda construcción consistió en la fusión de la proteína fluorescente VENUS y la secuencia codificante del gen *RAC7/ROP9* y se nombró TurboID:VENUS:RAC7. Se utilizó el plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 como vector de expresión.

Primero se establecieron las condiciones de amplificación de *VENUS* mediante un gradiente de temperatura para determinar a qué temperatura la ADN polimerasa Phusion (Thermo Fisher) tenía una amplificación más eficiente. Se inició a partir de los 62°C hasta los 72°C con intervalos de 2°C.

Para generar la versión de *VENUS* que se utilizó para ensamblarse únicamente al plásmido (construcción TurboID:VENUS), se realizó una amplificación por PCR de la cual se obtuvieron fragmentos de *VENUS* con extremos sobresalientes de cadena sencilla complementarios en sus extremos 5' y 3' al plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 (Anexo 2). La PCR se realizó con los componentes que se observan en la Tabla 2 utilizando los siguientes oligos F: 5'TGCGGTCTGCCGAAAAGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAG3' y R: 5'AATTGCTCGAGGGATCCCCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC3' con el programa que se detalla en la Tabla 3.

Tabla 2. Componentes de la PCR para 1 reacción utilizando la ADN polimerasa Phusion para amplificar la versión de VENUS que se utilizó para la construcción control TurboID:VENUS (20 µl)

Componentes	Volumen
H ₂ O	11.8 µl
Buffer HF Phusion (5X)	4 µl
dNTP's (10nM)	0.4 µl
Primer F (10pM)	1 µl
Primer R(10pM)	1 µl
DMSO	0.6 µl
Polimerasa Phusion (2 000U/ml)	0.2 µl
Templado <i>VENUS</i> (269 ng/µl)	1 µl

Tabla 3. Programa utilizado para la amplificación de VENUS con la ADN polimerasa Phusion (Thermo Fisher) para la construcción del plásmido control TurboID:VENUS.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 min	
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	60	30 s	
Elongación	72	30 s	
Elongación final	72	5 min	
	10	∞	

Para realizar la construcción TurboID:VENUS:RAC7 se generó una segunda versión de *Venus* con extremos sobresalientes de cadena sencilla con complementariedad en su extremo 5' al plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 y en su extremo 3' a RAC7 (Anexo 3). Para realizar la PCR se utilizaron los componentes como se muestra en Tabla 4 y se utilizaron los oligos F: 5'TGCGGTCTGCCGAAAAGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAG3' y R:

5´AAGCACTCATCTTGTACAGCTCGTCCATGC3´ con el programa que se describe en la Tabla 5.

Tabla 4. Componentes de la PCR para 1 reacción utilizando ADN polimerasa Phusion para amplificar la versión de VENUS que se utilizó para la construcción control TurboID:VENUS:RAC7 (25 µl).

Componentes	Volumen
H ₂ O	20.36 µl
Buffer HF Phusion (5X)	2.7 µl
dNTP´s (10nM)	0.5 µl
Primer F (10pM)	1.1 µl
Primer R (10PM)	1.1 µl
Polimerasa Phusion (2 000U/ml)	0.2 µl
Templado VENUS (176.70 ng/µl)	1 µl

Tabla 5. Programa utilizado para la amplificación de VENUS con ADN polimerasa Phusion para la construcción del plásmido TurboID: VENUS:RAC7.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2:30 min	
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	60	30 s	
Elongación	72	1:45 min	
Elongación final	72	5 min	
	10	∞	

De igual manera se realizó la amplificación de RAC7 para generar fragmentos con extremos sobresalientes de cadena sencilla con complementariedad en su extremo 5´ a VENUS y en su extremo 3´ al plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3.

Los primers que se utilizaron fueron **F: 5´**

GCTGTACAAGATGAGTGCTTCGAAGTTCATAAAATG3' y R: 5'
 AATTGCTCGAGGGATCCCCCTTAAGCAGCGGTGCAACC3' los elementos y
 programa de PCR que se utilizaron se observan en las Tablas 6 y 7
 respectivamente.

Tabla 6. Componentes de la PCR para 1 reacción utilizando ADN polimerasa Phusion para amplificar RAC7 que se utilizó para la construcción control TurboID:VENUS:RAC7 (25 µl)

Componente	Volumen
H ₂ O	20.36 µl
Buffer (5X)	2.7 µl
dNTP's (10nM)	0.5 µl
Primer F (10pM)	1.1 µl
Primer R (10pM)	1.1 µl
Polimerasa Phusion (2 000U/ml)	0.2 µl
Templado RAC7(190 ng/µl)	1 µl

Tabla 7. Programa que se utilizó para la amplificación de RAC7 con ADN polimerasa Phusion para la construcción del plásmido TurboID:VENUS:RAC7.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2:30 min	
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	63	30 s	
Elongación	72	45 s	
Elongación final	72	5 min	
	10	∞	

6.4.2 Purificación del producto PCR

Los productos amplificados de las dos versiones de *VENUS* y de *RAC7* fueron purificados con filtros de membrana con un grosor de 0.025 μm . Para ello se colocó una membrana sobre agua destilada estéril evitando que la cara superior tuviera contacto con el agua estéril. El producto de PCR fue depositado sobre la membrana y se dejó en reposo durante 30 min. Pasado el tiempo se colectó el producto de PCR y se midió la concentración de ADN en el nanodrop.

6.4.3 Digestión de plásmidos

Para ensamblar el inserto de ADN de *VENUS* para hacer la construcción TurboID:VENUS y los insertos de ADN de *VENUS* y *RAC7* para hacer la construcción de TurboID:VENUS:RAC7, se realizó una digestión del plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 con la enzima de restricción SmaI que tiene su sitio de corte en la secuencia CCC/GGG. Los componentes de la digestión que se utilizaron se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes utilizados para realizar la digestión del plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 con la enzima de restricción SmaI (CCC/GGG) para poder linealizar el plásmido y realizar el ensamble Gibson con los insertos de ADN (50 μl).

Componentes	Volumen
ADN plasmídico (64. 400ng/ μl)	27.7 μl
Enzima SmaI (20 000 U/ml)	1 μl
Buffer (10X)	5 μl
H ₂ O	28.71 μl

6.4.4 Ensamble Gibson

Para crear las construcciones de TurboID:VENUS y TurboID:VENUS:RAC7 se utilizó el método de ensamble de Gibson (NEBuilder HiFi DNA). Este método utiliza T5 exonucleasas para realizar cortes en los extremos 5' del plásmido y de los insertos de ADN que se unirán al plásmido. Los extremos 3' del plásmido y de los insertos de ADN, se unen por complementariedad de bases. Después, la ADN polimerasa sintetiza los nucleótidos faltantes y por último las T4 ADN ligasas sellan covalentemente los extremos del o los inserto(s) con los del plásmido. Esta reacción se realizó a una temperatura de 50°C durante 15 min para la construcción TurboID:VENUS y 1hr para la construcción TurboID:VENUS:RAC7. Los componentes que se utilizaron para realizar este ensamble se describen en la Tabla 9.

TurboID:VENUS		TurboID:VENUS:RAC7	
Componentes	Volumen	Componentes	Volumen
<i>VENUS</i> (269 ng/µl)	1 µl	<i>VENUS</i> (176.70 ng/µl)	1 µl
P.digerido (64.400 ng/µl)	2 µl	<i>RAC7</i> (190 ng/µl)	1 µl
Mix NEBuilder HiFi DNA (2X)	2 µl	P. digerido (64.400 ng/µl)	2 µl
H ₂ O	1 µl	Mix NEBuilder HiFi DNA (2X)	2 µl

6.4.5 Transformación de bacterias *Escherichia coli*

Una vez realizados los dos ensambles, se procedió a realizar la transformación en bacterias de *Escherichia coli* DH5 α mediante la técnica de choque térmico. Para esto se utilizaron 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α a las cuales se les añadió 6 μ l de la reacción del ensamble de Gibson. Esto se colocó en hielo durante 30 min, después se transfirió al termoblock a una temperatura de 42°C por 1 min y por último se colocó de nuevo en hielo durante 1 min. Las bacterias fueron colocadas en 1 ml de medio LB y puestas en la incubadora de 37°C durante 1 hora para después ser sembradas en cajas Petri con medio LB y el antibiótico kanamicina a una concentración de 50 μ g/ml. Se dejaron durante 24 h para observar la formación de colonias.

6.4.6 Confirmación de colonias de bacterias *E.coli* DH5 α transformadas

Las colonias de bacterias *E.coli* DH5 α crecidas en las placas, fueron seleccionadas al azar para realizar una PCR de colonias y constatar que se trataban de colonias transformadas. Los primers que se utilizaron para confirmar las bacterias transformadas con la construcción TurboID:VENUS fueron **F: 5'ATGGTGAGCAAGGGCGAG3'** y **R: 5'TTACTTGTACAGCTCGTCCATG3'** los cuales amplificaron un fragmento de *Venus* de ~700pb. Para la construcción TurboID:VENUS:RAC7 se utilizaron los primers **F: 5'TGTGTTACTGTTGGAGATGGG3'** y **R: 5'AACCGACGAAGTTCAGGCATC3'** los cuales amplificaron un fragmento de *RAC7* de ~300pb. Las colonias que mostraron el tamaño de banda esperado en el gel de electroforesis se crecieron

en un caldo de cultivo de LB y kanamicina (50 µg/ml) overnight para poder realizar la purificación del plásmido.

6.4.7 Purificación del plásmido

Se realizó la purificación de los plásmidos pLYY137-pUb-TurboID:VENUS y pLYY137-pUb TurboID:VENUS:RAC7 clonadas en las bacterias *E. coli* DH5α y poder transformar bacterias de *Agrobacterum tumefaciens* GV3101, las cuales se utilizaron para transformar hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Primero se elaboró un pre-inóculo colocando una pequeña muestra de la colonia seleccionada de la bacteria *E. coli* DH5α en 15 ml de medio LB con 50 µg/ml de kanamicina a una temperatura de 37°C overnight. Esto se realizó para cada una de las colonias seleccionadas. Una vez pasado un periodo de 12-16 h se tomó 1 ml del pre-inóculo y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min, después se desechó el sobrenadante, repitiendo este último paso.

El pellet obtenido se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión y se agitó con el vórtex hasta que se obtuvo un líquido color blanco. Se agregaron 250 µl de solución de lisis y se mezcló por inmersión, después se añadieron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló nuevamente por inmersión hasta que se obtuvo una solución con consistencia viscosa, la cual se centrifugo a 13,500 rpm durante 5 min. Se transfirieron ~800 µl de la solución a un tubo de colecta haciéndola para por una columna de purificación y se centrifugó a 13,500 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de solución de lavado al tubo colector con la columna de purificación y se centrifugó a 13,500 rpm durante

1 min, este último paso se repitió una vez más. La columna se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se le añadió 25 µl de buffer de elución, se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 min y se centrifugó a 13,500 rpm por 2 min, se repitió este último paso sin descartar el sobrenadante. Por último, se midió la concentración de ADN en el nanodrop.

6.4.8 Transformación de bacterias de *A. tumefaciens*

Los plásmidos obtenidos de la purificación se utilizaron para transformar bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101. Esto se llevó a cabo colocando en una celda 100 µl de las bacterias electrocompetentes y 2 µl del plásmido purificado. Después la celda fue colocada en el electroporador y se aplicó un choque eléctrico a 1.8 V. Para la recuperación de las bacterias del pulso eléctrico se añadió un 1 ml de medio LB dejándolas a una temperatura de 30°C durante 2 h en agitación. Por último, las bacterias fueron sembradas en medio LB con los antibióticos kanamicina y rifampicina a una concentración de 50 µg/ml y 15 µg/ml, respectivamente. Las colonias crecieron durante 2 días a una temperatura de 30°C (Gómez et al., 2018).

6.4.9 Confirmación de colonias de bacterias *A. tumefaciens* GV3101 transformadas

Las colonias crecidas en placas se seleccionaron al azar para realizar una PCR de colonias y corroborar que las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 estaban transformadas.

Para las colonias de las bacterias *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con los plásmidos pLYY137-pUb-TurboID:VENUS y pLYY137-pUb TurboID:VENUS:RAC7 se realizó la amplificación del gen *VENUS* como se hizo con las bacterias de *E. coli* DH5 α . Las colonias seleccionadas con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7 se comprobaron mediante la amplificación del gen *RAC7*. Se utilizaron los mismos primers que se usaron para la comprobación de colonias transformadas de bacterias *E. coli* DH5 α .

6.5. Transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración

Para realizar la transformación de las hojas de *N. benthamiana* se realizó agroinfiltración con *A. tumefaciens* transformadas con los plásmidos pLYY137-pUb-TurboID:VENUS y pLYY137-pUb TurboID:VENUS:RAC7. Para esto se elaboró un pre-inóculo para cada construcción de *A. tumefaciens* en medio LB con los antibióticos kanamicina (50 μ g/ml) y rifampicina (15 μ g/ml). Después de 12-16 h, al alcanzar una $O.D_{600nm}=2.0$ se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min y se resuspendió el pellet en 50 ml de buffer de agroinfiltración hasta que se disolvió y se ajustó una $O.D_{600nm}=1.0$.

Posteriormente se realizaron pequeños rasguños en el envés de las hojas que se seleccionaron para transformar y se les infiltró con *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con su respectiva construcción. Las plantas fueron llevadas a oscuridad durante un día y después llevadas al invernadero durante 2 días antes de ser observadas al microscopio confocal. Se utilizó el modelo Olympus FV1000 Upright y para poder observar la presencia de fluorescencia de *VENUS* se

utilizaron las longitudes de onda (λ) de 488nm y 510nm correspondientes a la longitud de onda de excitación y emisión respectivamente.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Infección de líneas insercionales de *OX-RAC7* de *A. thaliana* con *B. cinerea*

Se evaluaron las hojas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con *B. cinerea* de 3 réplicas biológicas, para un total de 53 hojas por línea. Los resultados arrojaron que existen diferencias significativas en el tamaño del área de lesión causada por el hongo *B. cinerea*, entre las plantas sobreexpresantes de *RAC7* y las Wild type Col-0 (Figura 2). Estos resultados indican que existe una mayor susceptibilidad al hongo cuando se sobreexpresa *RAC7*.

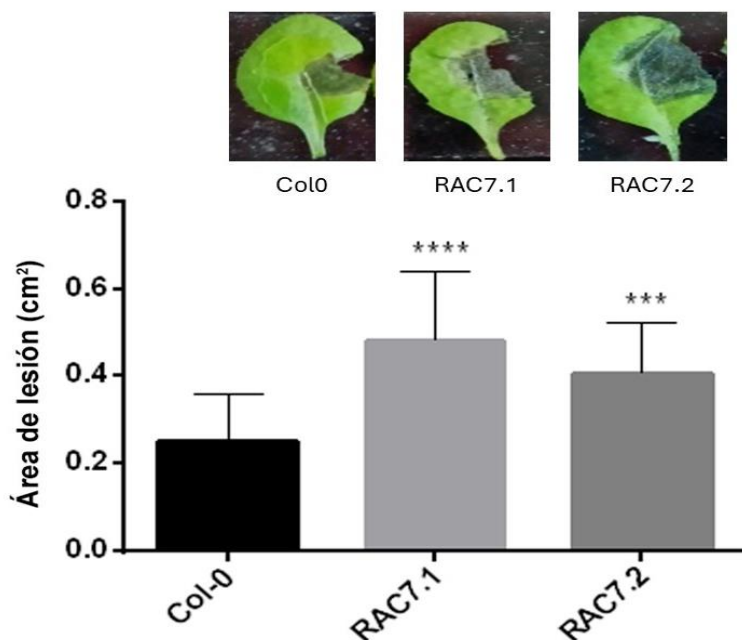


Figura 2. Área de lesión (cm²) en hojas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea*. Las barras representan el promedio del área de lesión y las barras de error muestran la desviación estándar. Los asteriscos sobre las barras de error indican diferencia significativa entre las plantas sobreexpresantes de *RAC7* con respecto a la Wild type (Col-0). Los resultados fueron obtenidos mediante la prueba estadística ANOVA y un análisis post hoc $p < 0.05$.

Anteriormente se han reportado otros casos donde la sobreexpresión de otras RAC, aumenta la susceptibilidad de las plantas a patógenos (Zhang et al., 2020; WeiB et al., 2022). En el caso de la planta de la cebada (*Hordeum vulgare*), en la cual se observó que al sobreexpresar *HvRACB*, la planta fue más susceptible al hongo *Blumeria graminis* f. sp *hordeij*, debido a que se promovía el reacomodo del haustorio sobre la pared celular, facilitando la entrada e infección causada por este patógeno fúngico (Engelhardt et al., 2020).

De igual modo la sobreexpresión de *OsRACB* en *Oriza sativa*, demostró mayor vulnerabilidad a la enfermedad del estallido del arroz causada por el hongo *Magnaporthe grisea*. Aunque aún se desconoce la causa, se observó que *OsRACB* se relocaliza en la membrana plasmática cuando la planta del arroz estaba infectada con *Magnaporthe grisea* (Young-Ho et al., 2006). Otra RAC que actúa negativamente en la defensa de la planta del trigo (*Triticum aestivum*) frente *Puccinia striiformis* f. sp *tritici* es *TaRAC6*. En este caso se observó una mayor susceptibilidad al hongo debido a la inhibición en la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Zhang et al., 2020).

Sin embargo, también existe evidencia de que la RAC *OsRAC1* de la planta del arroz (*O. sativa*), actúa como regulador positivo en la activación de defensa de la planta. Se observó que las mutantes activadas constitutivamente tenían una mayor resistencia a la enfermedad del estallido del arroz causada por el hongo *M. grisea*, además de obtener el mismo resultado con el patógeno bacteriano *X. oryzae* que causa la enfermedad del tizón del arroz (Young-Ho et al., 2006), esto debido a que había un aumento en la producción de intermediarios de las

especies reactivas, así como también en la respuesta hipersensible (Ono et al., 2001).

RAC7 es el ortólogo más cercano de *OsRAC1* (<https://www.arabidopsis.org>), sin embargo, su sobreexpresión potencia la susceptibilidad y no la resistencia como en el caso de *OsRAC1*, lo que sugiere que a pesar de la cercanía filogenética *AtRAC7* y *RAC1* actúan mediante mecanismos diferentes en los patosistemas estudiados. El estudio de las vías de señalización por las cuales *RAC7* regula el sistema inmune sería un interesante proyecto para desarrollar en el futuro.

7.2 Infección de líneas insercionales *OX-RAC7* de *A. thaliana* con *P. syringae*

La bacteria hemibiotrofa *P. syringae* causa clorosis en el tejido vegetal que infecta, por lo que para evaluar si existía resistencia o susceptibilidad a estas bacterias en las líneas insercionales *OX-RAC7* de *A. thaliana* susceptibles a *B. cinerea*, se infectaron plantas con una suspensión de dicha bacteria. Posteriormente se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) de un total de 60 plantas de *A. thaliana* divididas en 3 réplicas biológicas y 4 técnicas después de la infección.

Los resultados indicaron que la sobreexpresión de *RAC7* también incrementa la susceptibilidad de *A. thaliana* frente a *P. syringae* como en el caso de *B. cinerea*, debido a que se observa un mayor crecimiento bacteriano y daño vegetal con respecto a la Wild type Col-0 (Figura 3).

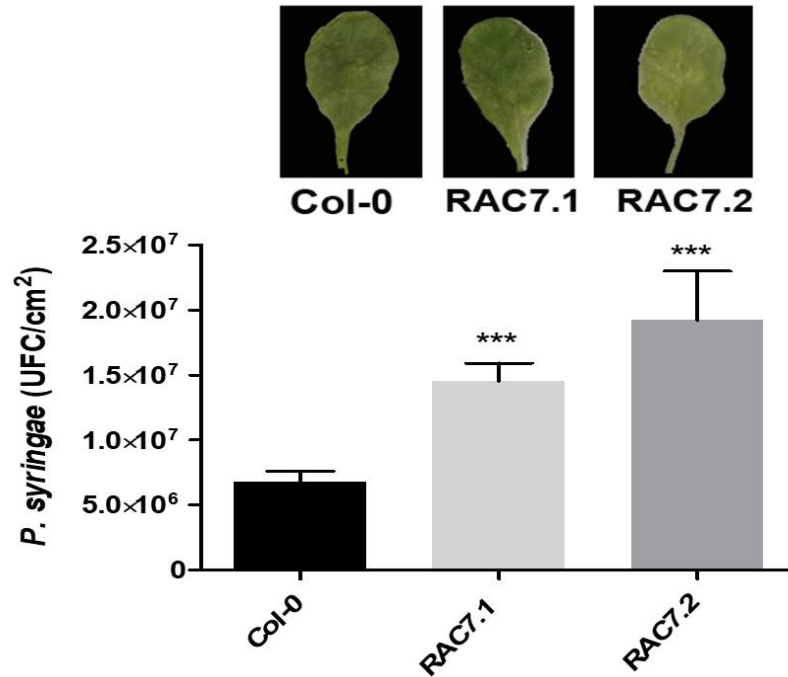


Figura 3. Conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. syringae* de la dilución 1×10^{-3} en tejido vegetal (8cm^2) de *A. thaliana*. Las barras representan el promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas y las barras de error muestran la desviación estándar. Se obtuvieron los resultados mediante la prueba estadística de ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Hasta el momento se conoce que las bacterias de *P. syringae* producen la fitotoxina coronatina (COR) y los efectores de virulencia AvrB, HopBB1 y HopX1 que utilizan para evadir la respuesta de defensa PTI de la planta hospedera (Ishiga et al., 2013). La coronatina es una molécula análoga estructural y funcionalmente de la forma activa del jasmonato isoleucina (JA-Ile), que provocan la inhibición del ácido salicílico (SA) y el ácido abscísico (ABA) lo cual permite que los estomas permanezcan abiertos causando la entrada de bacterias (Ishiga et al., 2013). La producción de coronatina se ha propuesto como el principal mecanismo de infección al cual se le atribuye principalmente a *Pst* DC3000 (Ishiga et al., 2013). Además *P. syringae* también cuentan otros factores

de virulencia como HopM1 y AvrE que inhiben la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la deposición de calosa. Aunque, García-Soto et al., (2024) demostraron que las plantas sobreexpresoras de RAC7 no muestran cambios en la acumulación de especies reactivas del oxígeno y calosa, sí observaron una disminución de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de hormonas, sugiriendo un posible mecanismo que explica la susceptibilidad incrementada de las líneas insercionales (Xiu-Fang et al., 2018).

7.3 Infección de líneas insercionales OX-RAC7 de *A. thaliana* con *P. brasiliense*

P. brasiliense es una bacteria necrotrófa que degrada el tejido vegetal que infecta (Narváez-Barragán et al., 2020). En las líneas estudiadas OX-RAC7 y Col-0 causó necrosis en el tejido vegetal y muchas de las hojas infectadas mostraron maceración completa del área foliar, por lo que fue imposible medir el área de lesión y se determinó evaluar el porcentaje de incidencia como lo reportaron Narváez-Barragán et al., (2020).

Se evaluaron las hojas de 92 plantas de *A. thaliana* (16 plantas de Col-0, 39 OX-RAC7.1 y 37 OX-RAC7.2) a las 48 h después de la infección. Se observó que las hojas de Col-0 no presentaron lesión aparente durante ese periodo de tiempo, mientras que las hojas de las líneas insercionales OX-RAC7 presentaron maceración del tejido.

Los análisis estadísticos indicaron que en el lapso de 48 h existe susceptibilidad a *P. brasiliense* en las líneas insercionales OX-RAC7 mientras que

en plantas de Col-0 no (Figura 4). Esto podría indicarnos que la sobreexpresión de *RAC7* también podría incrementar la susceptibilidad frente a este patógeno.

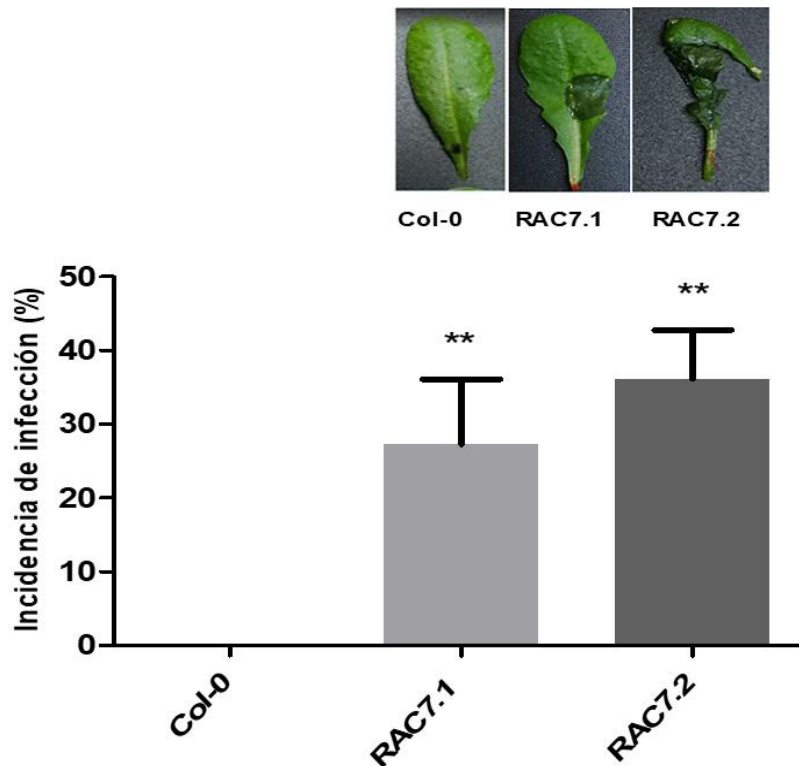


Figura 4. Porcentaje de incidencia en plantas de *A. thaliana* infectadas con *P. brasiliense*. Las barras representan el promedio del porcentaje de incidencia de infección causado por *P. brasiliense* en hojas de *A. thaliana* y las barras de error muestran la desviación estándar. Los asteriscos sobre las barras de error indican la diferencia significativa que existe entre *RAC7* con respecto a la wild type (Col-0). Los resultados fueron obtenidos mediante la prueba estadística ANOVA, con un nivel de significancia de 0.05 y un valor de $p < 0.05$.

P. brasiliense cuenta con enzimas que ayudan a degradar la pared celular del hospedero tales como pectinasas, celulasas y proteasas, una vez que la planta detecta la maceración de los tejidos activa sus mecanismos de defensa como la síntesis de jasmonato y etileno. Por otro lado, *P. brasiliense* libera efectores como HrpN y PehA para contrarrestar la producción de jasmonato y etileno lo que hace que la planta active otros mecanismos de defensa tanto a nivel local y basal (Djami-Tchatchou et al., 2017). Como anteriormente mencionó García-Soto et al.,

(2024) las plantas *OX-RAC7* son deficientes en la biosíntesis de jasmonatos y ácido salicílico. Se ha reportado que el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ) y el etileno son reguladores de crecimiento vegetal y que también participan en la respuesta de defensa de la planta contra patógenos. Se ha comprobado que el AS se requiere para la resistencia de patógenos biotrofos y hemibiotrofos mientras que el AJ y etileno participan en la resistencia de patógenos necrotrófos e insectos. Por lo que la señalización tanto del AS y el AJ son esenciales no solo para la activación de defensa de la planta sino también para una defensa prolongada (Laredo et al., 2017). Por lo que los resultados obtenidos nos indican la posibilidad de que la deficiencia de estas hormonas sean la causa de la susceptibilidad de las líneas insercionales a todos los patógenos que aquí se evaluaron.

7.4 Seguimiento de la localización subcelular de RAC7

7.4.1 Amplificación de *VENUS* y *RAC7*

Para realizar la fusión traduccional de *VENUS:RAC7* y determinar su localización subcelular frente *Botrytis cinerea*, se generaron dos construcciones TurboID:*VENUS* y TurboID:*VENUS:RAC7*, partiendo de la secuencia codificante de *VENUS*. La amplificación de *VENUS* se realizó con dos diferentes pares de oligonucleótidos para generar dos versiones: 1) *VENUS* que se utilizó para ensamblarse únicamente al plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 y que se utilizó como control y 2) *VENUS* que se utilizó para ensamblarse en su extremo 5' al plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 y a *RAC7* en su extremo 3', La amplificación de *VENUS* por gradiente de temperatura demostró que los primers

tiene una mayor eficiencia en temperaturas de 70°C y 72°C, ya que en el gel de electroforesis se observan bandas con mayor intensidad en el carril 6 y 7, que corresponden al tamaño de *VENUS* de ~800 pb, por lo que se utilizó la temperatura de 72°C para las subsecuentes amplificaciones de *VENUS* (Figura 5).

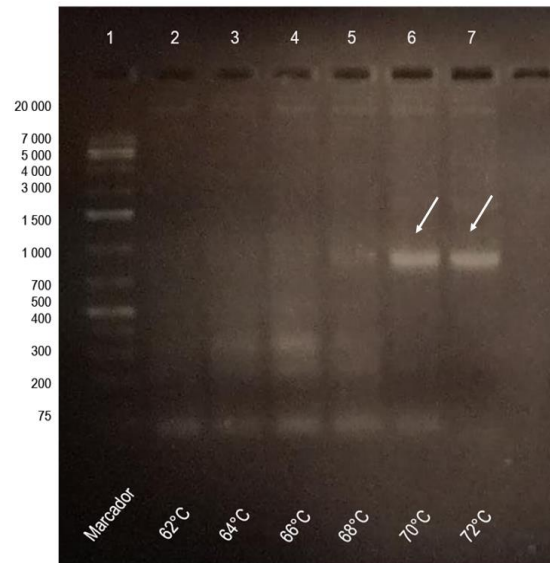


Figura 5. Amplificación de *VENUS* con PCR por gradiente de temperaturas (62°C -72°C). En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, los carriles 2-7 se observó la amplificación de *VENUS* a la altura de 800 pb en los carriles 6 (70°C) y 7 (72°C) que se encuentran señalados por flechas blancas. Se utilizó la temperatura de 72 °C.

En las amplificaciones de *VENUS* para su clonación se observó el tamaño de banda esperado de 800pb (Figura 6). Por otro lado, se amplificó *RAC7* el cual se utilizó para el ensamble de la construcción TurboID:*VENUS*:*RAC7*, la amplificación se corroboró con el gel de electroforesis en el que se observó el tamaño de banda esperado de 630 pb (Figura 7).

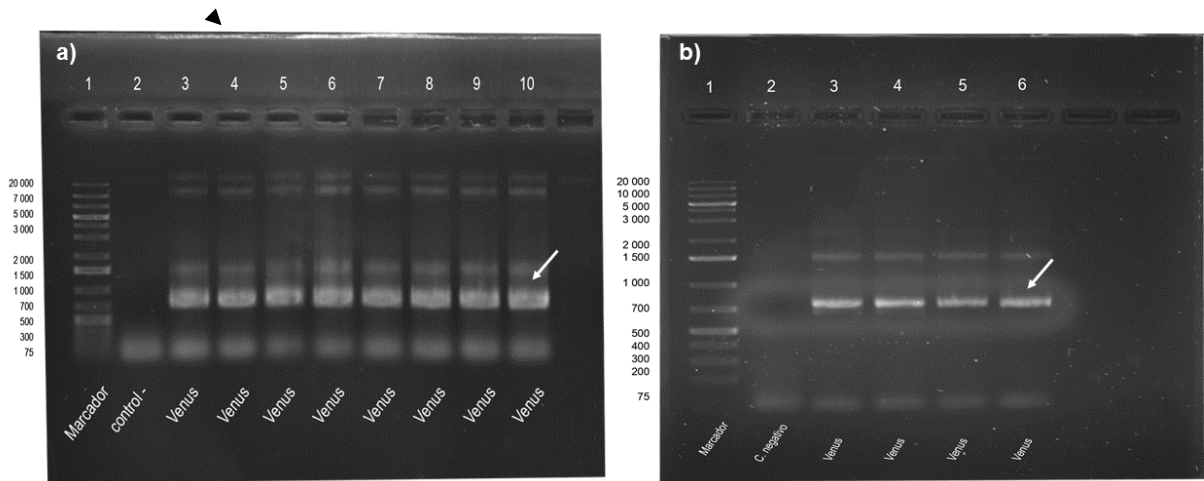


Figura 6. Amplificación de *VENUS* para la construcción de los plásmidos TurboID:*VENUS* y TurboID:*VENUS*:RAC7. a) Amplificación de *VENUS* que se utilizó para realizar la construcción del plásmido control TurboID:*VENUS* y la b) amplificación de *VENUS* que se utilizó para la construcción del plásmido TurboID:*VENUS*:RAC7. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus. En los siguientes carriles de ambas imágenes se encuentran señalado por flechas blancas el tamaño de banda esperado de ~800pb que corresponden al tamaño de *VENUS*.

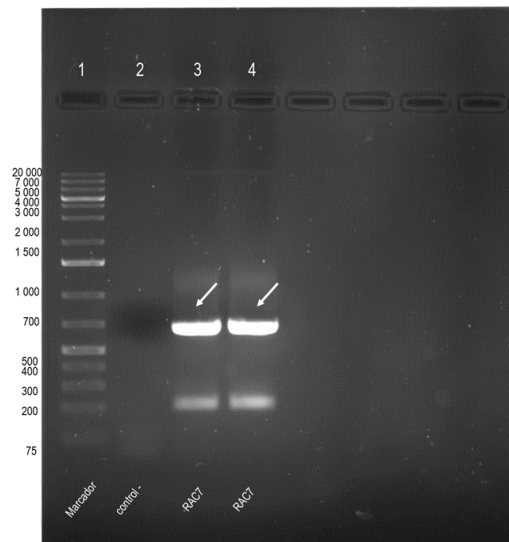


Figura 7. Amplificación de *RAC7*. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, en el carril 2 el control negativo y en los carriles 3 y 4 la amplificación de *Venus* que se utilizó para la construcción del plásmido TurboID:*VENUS*:RAC7 marcadas por flechas blancas indicando el tamaño de banda esperado de ~630pb.

7.4.2 Purificación del producto de PCR

Se purificaron los productos de *VENUS* (las dos versiones) y de *RAC7* con membrana para diálisis. La concentración de ADN purificado se midió en el nanodrop y se obtuvo que para la versión de *VENUS* que se utilizó para generar la construcción control TurboID:VENUS la concentración fue de 146.95 ng/μl. Para la versión de *VENUS* que se utilizó para la construcción TurboID:VENUS:RAC7 se obtuvo 176.70 ng/μl y una concentración de 190 ng/μ para *RAC7* (Tabla 10).

7.4.3 Digestión de plásmidos

Se realizó y verificó la digestión del plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 por medio del tamaño del fragmento en gel de electroforesis y se obtuvo el tamaño de banda esperado de ~11,000 pb. (Figura 8). El plásmido digerido fue empleado para ensamblar los productos de PCR purificados y obtener las construcciones deseadas.

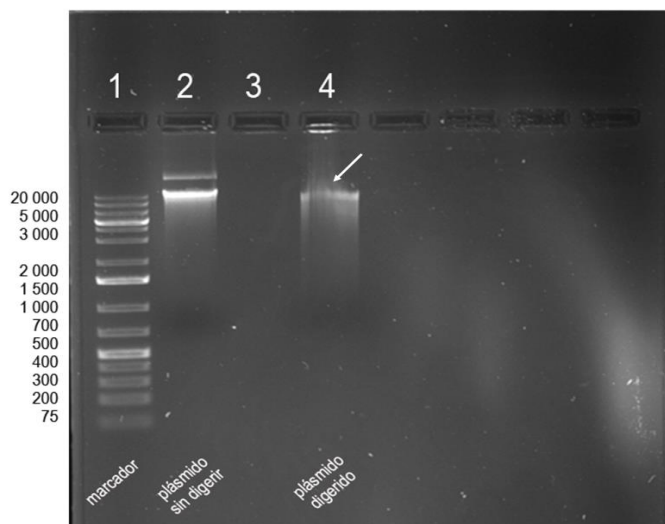


Figura 8. Gel de electroforesis de la digestión del plásmido pLYY137-pUb-TurboID-msc3 con la enzima SmaI. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, el carril 2 el plásmido digerido y en el carril 4 marcado por una flecha blanca el plásmido sin digerir.

7.4.4 Ensamble Gibson y transformación de *E. coli* DH5 α

Con el método de ensamble de Gibson se crearon dos plásmidos diferentes: 1) pLYY137-pUb-TurboID:VENUS que utilizamos como control, y 2) pLYY137-pUb TurboID:VENUS:RAC7. Los plásmidos se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* DH5 α . Estas bacterias crecieron en placas con medio LB y kanamicina a una concentración de 50 μ g/ml. Las colonias que crecieron fueron seleccionadas al azar y se corroboró su transformación por PCR de colonias.

Para las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido TurboID:VENUS se seleccionaron 5 colonias, de las cuales solo las colonias 1,3 y 5 mostraron el tamaño de banda esperado de \sim 700pb pb correspondiente al tamaño de *VENUS* (Figura 9).

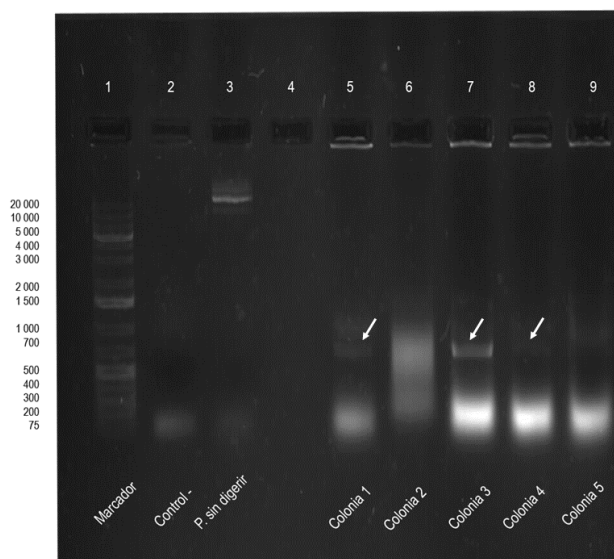


Figura 9. Corroboración de colonias transformadas de bacterias *E. coli* DH5 α con el plásmido TurboID:VENUS mediante la amplificación de *VENUS*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, en el carril 2 el control negativo, en el 3 el plásmido sin digerir y en los carriles del 5-9 se encuentran las diferentes colonias (1-5) que crecieron y se seleccionaron de las placas con medio LB y kanamicina. Señalado por una flecha blanca se observa que en las colonias 1,3 y 4 amplifico el tamaño de banda esperado de \sim 700 pb.

La PCR de colonias para la comprobación de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7 se realizó amplificando un fragmento de *RAC7* (~300pb). El gel de electroforesis mostró que las colonias 3 y 5 fueron transformadas (Figura 10).

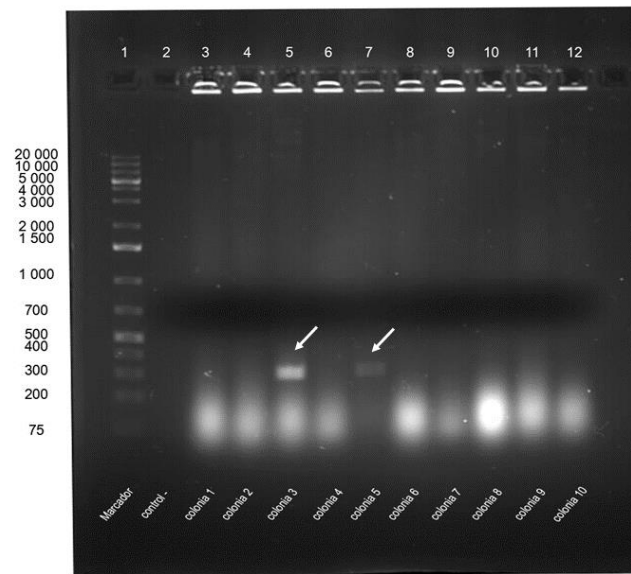


Figura 10. Corroboración de colonias transformadas de bacterias *E. coli* DH5 α con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7 mediante la amplificación de *RAC7*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, en el 2 el control negativo y en los carriles del 3-12 se encuentran las diferentes colonias (1-10) que crecieron y se seleccionaron. Se observa señalado por flechas blancas que en las colonias 3 y 5 amplifico el tamaño de banda esperado de ~ 300pb.

7.4.5 Purificación de plásmido

Se purificó el plásmido TurboID:VENUS de las 3 colonias transformadas de bacterias *E. coli* DH5 α que se corroboraron por PCR de colonias. Para cada una de ellas se cuantificó la concentración de ADN (Anexo 4).

También se realizó la purificación de los plásmidos de las 2 colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7 que se corroboraron por PCR de colonias. Se cuantificó la concentración de ADN en el nanodrop para corroborar la correcta purificación (Anexo 5).

7.4.6 Transformación de *A. tumefaciens*

Para confirmar la transformación de las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con el plásmido TurboID:VENUS se realizó la amplificación de *VENUS* la cual se observó en el gel de electroforesis con el tamaño de banda esperado de ~700pb (Figura 11).

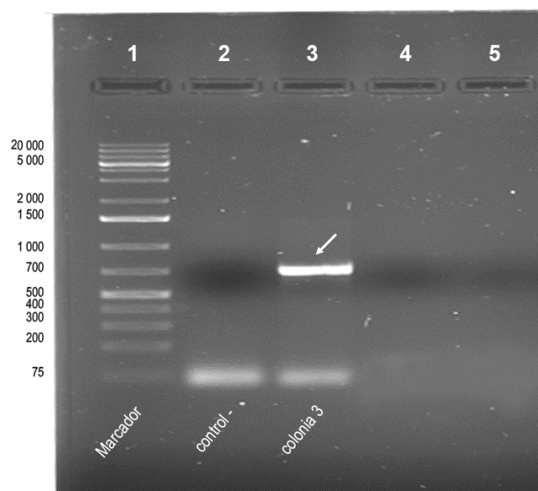


Figura 11. Comprobación de la colonia 3 de bacterias *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con el plásmido TurboID:VENUS. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, en el carril 2 el control negativo y en el carril 3 señalado por una flecha blanca el tamaño de banda esperado de ~700 pb que corresponden a un fragmento de *VENUS*.

La comprobación de *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7 se realizó amplificando un fragmento de *RAC7*, el cual se observó en el gel de electroforesis con un tamaño de banda de ~300pb (Figura 12).

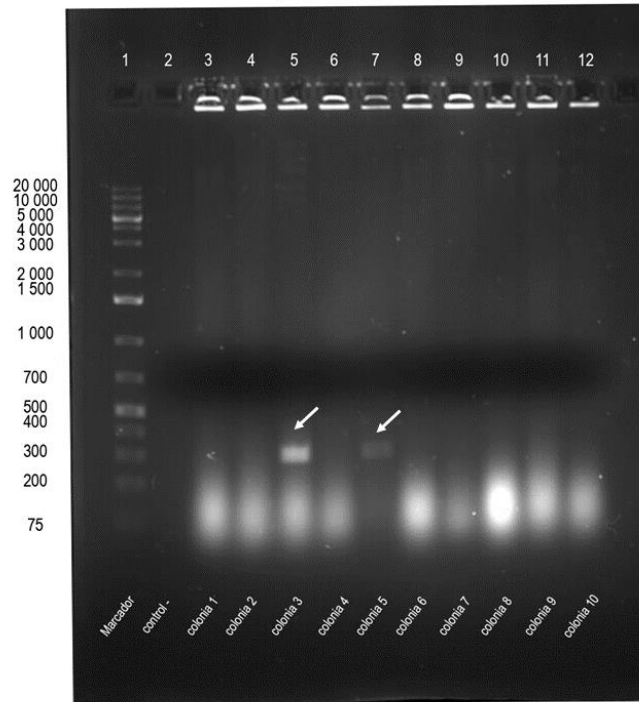


Figura 12. Comprobación de la colonia 3 de bacterias *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Gene ruler 1KB plus, en el carril 2 el control negativo y en los carriles 3-12 las colonias crecidas después de la transformación. Marcado por flechas blancas se observan las colonias 3 y 5 con el tamaño de banda esperado de ~300pb de la amplificación de un fragmento de *RAC7*.

7.4.7. Transformación de hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración

Con el objetivo de evaluar la localización subcelular de RAC7 en plantas de *N. benthamiana*. Las hojas de tabaco transformadas con las construcciones TurboID:VENUS y TurboID:VENUS:RAC7 fueron observadas al microscopio confocal, donde se observó fluorescencia amarilla emitida por VENUS para ambas construcciones (Figura 13).

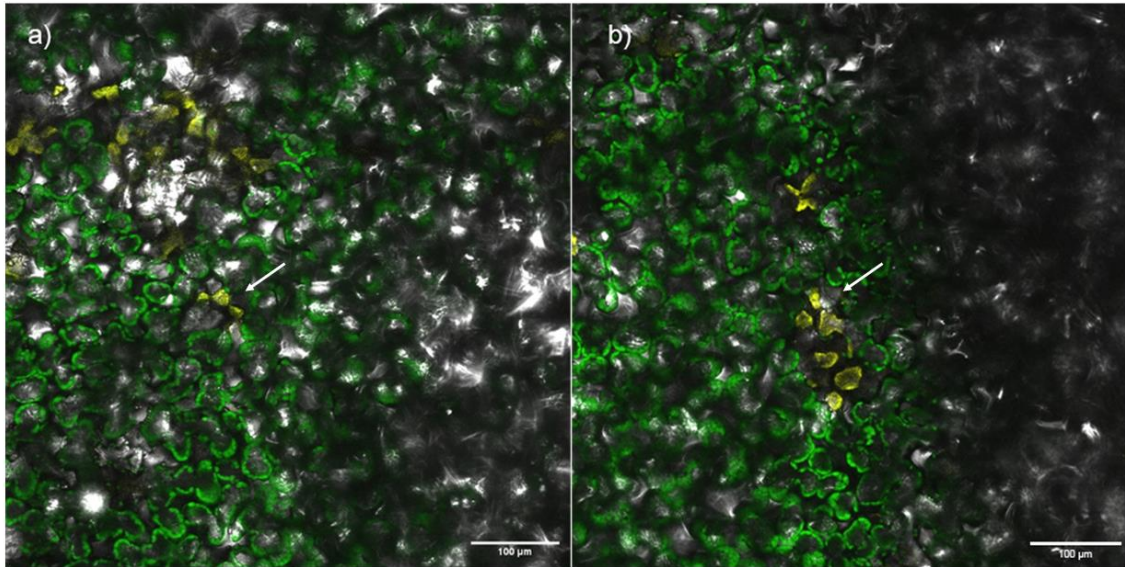


Figura 13. Fluorescencia emitida por la proteína VENUS YFP (del inglés Yellow Fluorescent Protein) en hojas de tabaco (*N. benthamiana*). Marcado por flechas se observa en color amarillo la presencia de fluorescencia generada por VENUS. De lado derecho (a) se observa las hojas de tabaco transformadas con el plásmido TurboID:VENUS y de lado izquierdo (b) las hojas de tabaco transformadas con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7. Las muestras se obtuvieron utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000 Upright.

En el caso de las hojas de tabaco transformadas con las construcciones TurboID:VENUS y TurboID:VENUS:RAC7 e infectadas con el patógeno *B. cinerea* se obtuvo únicamente la presencia de fluorescencia en el control (TurboID:VENUS), mientras que en las hojas transformadas con TurboID:VENUS:RAC7 hubo ausencia de fluorescencia (Figura 14).

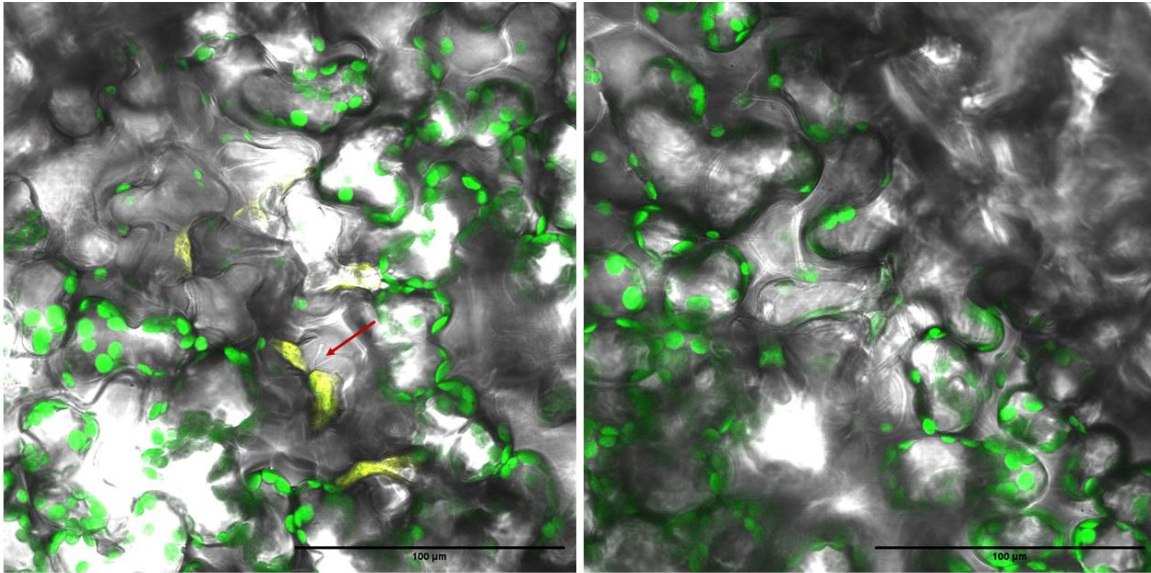


Figura 14. Localización de RAC7 en células transformadas de tabaco (*N. benthamiana*) e infectadas con *B. cinerea*. En la imagen de lado izquierdo c) marcado por una flecha se observa la presencia de fluorescencia de VENUS situada en la membrana plasmática de las células transformadas con el plásmido control TurboID:VENUS mientras, que en la imagen de la derecha (d) correspondiente a células de tabaco transformadas con el plásmido TurboID:VENUS:RAC7 no se observa fluorescencia de VENUS. Las muestras se obtuvieron utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000 invertido con el objetivo 100x.

La pérdida de la fluorescencia en las hojas transformadas con la fusión traduccional VENUS:RAC7 e infectadas con *B. cinerea*, sugiere una posible inhibición de la expresión de RAC7. De acuerdo con García-Soto et al. (2024) y datos de RNAseq (<https://www.arabidopsis.org/>) el transcrito de RAC7 disminuye su expresión en presencia de *B. cinerea*. Dicho hongo, cuenta con efectores dentro de los cuales también se incluyen a los micro ARN (miARN). Estos miARN son capaces de translocarse a la célula vegetal y tener funciones como la metilación del ADN o interferencia del ARN causando el silenciamiento génico transcripcional o postranscripcional. Esto les permite regular o reducir los niveles de transcripción de genes implicados en la defensa de la planta durante la interacción planta-patógeno y así evadir la respuesta de defensa de la planta

hospedera (Weiberg et al., 2013; Qin et al., 2023). Hasta el momento no se conoce si el transcrito de *ATRAC7* es blanco de regulación de algún miRNA de la planta o del patógeno. Además, las ROP GTPasas son reguladas a nivel postraducciona por modificaciones lipídicas que rigen su localización subcelular, así como por las proteínas GEF, GAP y GDI, que rigen su activación, desactivación y tiempo de vida media (Berken y Wittinghofer, 2006; Feiguelman et al., 2018). La pérdida de la fluorescencia ante la presencia del patógeno sugiere que alguno de los mecanismos de regulación postraducciona pueden estar actuando para degradar o inactivar a *RAC7* y poder inducir la respuesta de defensa de la planta.

8. CONCLUSIONES

La sobreexpresión de *RAC7* en plantas de *A. thaliana* provocó mayor susceptibilidad a los fitopatógenos *B. cinerea*, *P. syringae* y *P. brasiliense*, lo cual indica que *RAC7* actúa como regulador negativo en la respuesta de defensa inmune de la planta frente a estos patógenos.

Las plantas transformadas de *N. benthamiana* con la construcción TurboID:VENUS:*RAC7* tuvieron una aparente inhibición de *RAC7* ante la presencia del patógeno, aunque se desconocen los mecanismos por los cuales esté ocurriendo la inhibición, y si está ocurriendo por parte del hospedero o del patógeno.

9. PERSPECTIVAS

- Explorar si las vías de defensa dependientes de las OX-RAC7 se ven afectadas antes de la infección con los patógenos *B. cinerea*, *P. syringae* y *P. brasiliense*.
- Examinar posibles afectaciones en estructuras importantes (pared celular y citoesqueleto) que facilitan la entrada de patógenos en las OX-RAC7.

9. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Al-Ani, L. y Furtado, E. (2020). The effect of incompatible plant pathogens on the host plant. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp.47-53). Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-12-818469-1.00004-3.
- Aragón, W., Formey, D., Aviles-Baltazar, N. Y., Torees, M. y Serrano, M. (2021). Arabidopsis thaliana Cuticle Composition Contributes to Differential Defense Response to Botrytis cinerea. *Front Plant Sci*, 12, 1-17. DOI: 10.3389/fpls.2021.738949.
- Arauz, C., F. (1998). *Fitopatología, Un enfoque agroecológico*. San José, Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=I6jDW5HI9BAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Beattie, G. y Lindow S. (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review Phytopathology*, 33, 145-172. DOI: 10.1146/annurev.py.33.090195.001045.
- Beever, R., E. y Weeds, P., L. (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. DOI: 10.1007/978-1-4020-2626-3_3
- Berken, A. y Wittinghofer, A. (2008). Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (1), 380-393. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.12.008.

- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science Signaling*, RE13. DOI:10.1126/stke.2502004re13.
- Cruz, M., Hernández, Y. y Rivas, E. (2006). Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 10 (29), 45-54.
- De la Rosa, H. (2017). Efectividad Biológica de Bactericidas a base de cobre y Biológicos Contra *Pectobacterium carotovorum* (Jones, 1901.) Waldee, 1945 *in vitro*. [para optar para el [título de ingeniero agrónomo paratitólogo]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro División de Agronomía Departamento de Parasitología. Saltillo, Coahuila.
- Dean, R., Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond, K. E., Prieto, 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. DOI:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Del Amor, F. M., Navarro J., Gambín, J. M., Ortuño, G. y Palao, C. (2006). Mecanismos de defensa natural de las plantas. El cultivo ecológico frente al convencional. *SEAE Zaragoza*, 65 (1): 1-5.
- Djami-Tchatchou, A.T., Goszczynska, T., Subba, G. V. y Ntushelo, K. (2017). Gene expression response of *Arabidopsis thaliana* to inoculation with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *Journal of Plant Pathology*, 99 (3), 47-57. DOI: 10.4454/jpp.v99i3.3949.
- Eklund, D. M., Svensson, E. M., y Benedikt, K. (2010). Physcomitrella patents: a model to investigate the role of RAC/ROP GTPase signalling in tip growth. *Journal of Experimental Botany*, 61(7), 1917-1937. DOI: 10.1093/jxb/erq080.

- Engelhardt, S., Trutzenberg, A y Hückelhoven. (2020). Regulation and Functions of ROP GTPase in Plant-Microbe Interactions. *Cells*, 6 (1), 2016. DOI: 10.3390/cells9092016.
- Feguelman, G., Fu, Y. y Yalovsky, S. (2018). ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. *Plant Physiology*, 176 (1) :57-79
- Fowler J. E. (2010). Evolution of the ROPGTPase signaling module. En S. Yalovsky, F. Baluska & A. Jones. *Integrated G Protein Signaling in Plants* (1ra ed., pp 305-327). Springer-Verlag.
- García, I. (2019). Identificación del intercomparto de proteínas ROP durante el rearrreglo del citoesqueleto en *Lotus japonicus* ante la endosimbiosis bacteriana. [Tesis de Maestría, Centro de Ciencias Genómicas]. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2019/junio/0790592/0790592.pdf>.
- García-Soto, I., Formaey, D., Mora-Toledo, A.,Cárdenas, L., Aragón, W., Tromas, A.,Duque-Ortiz, A., Jiménez-Bremont, J. F. y Serrano, M. (2024). *AtRAC7/ROP9* Small GTPase Regulates *A.thaliana* Immune Systems in Response to *B.cinerea* infection. *International journal of Molecular Science*, 25 (529): 2-25. DOI: 10.3390/ijms25010591.
- Gómez, L. Y., Gómez, S. y Núñez, V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia en Desarrollo*,9 (2), 1-16.

- González, S. y Álvarez, R. (2007). *Arabidopsis thaliana a través del microscopio óptico de campo claro y del microscopio electrónico de transmisión*. Universidad de León.
- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M. H., y Levis, C. (2004). The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology*, 51 (1), 619-629. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.0366.x.
- Hussein, A., Alhasan, R., Abdelwahab, S. and Siddig, M. (2014). Isolation and identification of *Streptomyces rochei* strain active against Phytopathogenic Fungi. *British Microbiology Research Journal*, 4 (10), 1057 – 1068. DOI: 10.1371/journal.pone.0075728
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S., y Myrose, K. (2013). Jasmonate ZIM-Domain (JAZ) Protein Regulates Host and Nonhost Pathogen-Induced Cell Death in Tomato and *Nicotiana benthamiana*, *PLOS ONE*, 8 (9), e75728. DOI: 1371/journal.pone.0075728.
- Jacob, C., Panchal, S. y Melotto, M. (2017). Surface Inoculation and Quantification of *Pseudomonas syringae* Population in the *Arabidopsis* Leaf Apoplast. *Bio-protocol*, 7 (5), 1-9. DOI:10.21769/BioProtoc.2167.
- Jones, J. D. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329). DO:10.1038/nature05286.
- Koch, I., Nöthen, J. y Schelleiff, E. (2017). Modeling the Metabolism of *Arabidopsis thaliana*: Application of Network Decomposition and Network Reduction in the Context of Petri Nets. *Frontiers in Genetics*, 8 (1), 1-22. DOI:10.3389/fgene.2017.00085.

- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., Hamss, H., Belabess, Z. y Barka, E., (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10 (596), 1-33. DOI:10.3390/microorganisms10030596.
- Laredo, E. I., Martínez, J. L., Iliná, A., Guillen, L. y Hernández, F. (2017). Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8 (3), 673-683.
- Leonberger, K., Jackson, K., Smith, R. y Gauthier, N. (2016). Plant Diseases. *Agriculture and Natural Resources Publications*, 182 (1), 1-24.
- Marsch, N., Zúñiga, V.M., Reyes, J. I., Salazar, O.R. y Folter, S. (2009). Genómica Funcional de Plantas: Estudio del Desarrollo de Flores y Frutos. *Acta Universitaria*, 19 (1), 21-29.
- Maude, R., B. (1980). Disease control. In: *The Biology of Botrytis*. London: Academy Press, pp. 275-308.
- Meinke, D., Cherry, M., Dean, C., Rounsley, S. y Koornneef. (2012). Arabidopsis thalian: A model plant for Genoma analysis. *Science*, 282 (2), 262-282. DOI:10.1126/science.282.5389.662.
- Melotto, M., Underwood, W. y He, S. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *The Annual Review of Phytopathology*, 46, 101-122. DOI: 10.1146/annurev.phyto.121107.104959
- Morris, C., Kinkel, L., Xiao, K., Prior, P. y Sans, D. (2007). Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Elsevier*, 7 (1): 84-92. DOI: 10.1016/j.meegid.2006.05.002.

- Narváez-Barragán D., A., Tovar-Herrera, O. E., Torres, M., Rodríguez, M., Humphris, S., Toth, I. K., Segovia, L., Serrano, M. y Martínez-Anaya, C. (2020). Expansin-like Exl1 from *Pectobacterium* is a virulence factor required for host infection, and induces a defence plant response involving ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *NatureResearch*, 10:7747. DOI: 10.1038/s41598-020-54529-9.
- Ono, E., Wong, H. L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O. y Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *PNAS*, 98 (2): 759-764. DOI: 10.1073/pnas.021273498.
- Patyka, V. (2016). Phytopathogenic bacteria in contemporary agriculture. *Мікробіол. Журн*, 78 (6), 71-83.
- Pinilla, B. y Álvarez, M. (2002). Estudios epidemiológicos de la “pudrición calcinal” de las pomáceas causadas por *Botrytis cinerea*. En Sociedad Chilena de Fitopatología. *XI Congreso Nacional de Fitopatología Resúmenes* (47), Santa Cruz Chile.
- Qin, S., Veloso, J., Baak, M., Boogmans, B., Bosman, T., Puccetti, G., Shi-Kunne, X., Smit, S., Grant-Downton, R., Leinsen, T., Hahn, M. y van Khan J. A. L. (2023). Molecular characterization reveals no functional evidence for naturally occurring cross-kingdom RNA interference in the early stages of *Botrytis cinerea*-tomato interaction. *Molecular Plant Pathology*, 24: 3-15. DOI:10.1111/mpp.13269
- Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A. y Valencia, A. (2012). The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Journal of Cell Biology*, 196 (2), 189-201. DOI:10.1083/jcb.201103008.

- Singh, H. (2014). Management of Plant Pathogen with Microorganisms. *Proc Indian Natl Sci Acad*, 80 (1), 443-454. DOI:10.16943/ptinsa/2014/55120.
- Sormo, C., Leiros, I., Brembu, T., Winge, P., Os, V. y Bones, A. (2006). The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* RAC7/ROP9: The first RAS superfamily GTPase from the plant kingdom. *ElsevierLSEVIER*, 67 (1): 2332-2340. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.08.011.
- Staats, M., Van Baarlen, P. y Van Kan, A., L. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (2), 333-346. DOI:10.1093/molbev/msi020.
- TAIR. (11 de febrero de 2013). AT4G28950. The Arabidopsis Information Resource.<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At4g28950>.
- Tenberge, K. (2002). Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski y N. Delen. *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (1ra. ed., pp 67-84). Springer.
- WeiB L., Gaelings, L., Reiner, T., Mergner, J., Kuster, B., Fehér, A., Hensel, G., Gahrtz, M., Kumlehn, J., Engelhardt, S. y Hückelhoven, R. (2022). Posttranslational modification of the RHO of plants protein RACB by phosphorylation and cross-kingdom conserved ubiquitination. *PLOS ONE*, 17 (3): 1-30. DOI: 10.1371/journal.pone.0258924.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.D. y Jin H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host

- RNA interference pathways. *Science*, 342: 118–123.
DOI:10.1126/science.1239705.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580. DOI:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Winge, P., Brembu, T. y Bones, A., M. (1997). Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology*, 35, 483-495. DOI:10.1023/a:1005804508902.
- Winge, P., Brembu, T., Kristensen, R. y Bones, A. M. (2000). Genetic Structure and Evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 156, 1959-1971. DOI:10.1093/genetics/156.4.1959.
- Xiu-Fang, X., Brian, K. y Sheng, Y. H. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen: *Nature Reviews Microbiology*, 1, 1-13. Doi:10.1038/nrmicro.2018.17. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.17.
- Young-Ho, J., Ganesh K., A., Randeep, R., Jung-A, K., Mi-Ok, L., Pil, G., C., Young, J., K., Min-Jea, K., Junko, S., Sun-Hyung, K., Hitoshi, I. y Nam-Soo, J. (2006). Functional characterization of *OsRacB* GTPase—a potentially negative regulator of basal disease resistance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44 (1): 68-77. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.12.001.
- Zhang, Q., Zhang, X., Zhuang R., Wei, Z., Shu, W., Wang, X y Kang, Z. (2020). TaRC6 Is a Potential Susceptibility Factor by Regulating the ROS Burst Negatively in the Wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. tritici Interaction. *Frontiers in Plant Science*, 11 (716): 1-12. DOI: 10.3389/fpls.2020.00716

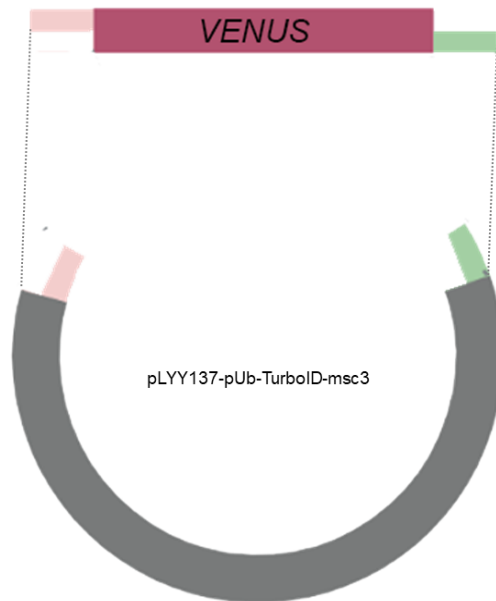
- Zheng, Z. L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D. N., Chary, S. N., Schroeder, J. I., Shen, J. y Yang, Z. (2002). Plasma membrane-associated ROP 10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *The plant cell*, 14, 2787-2797. DOI:10.1105/tpc.005611.
- Zhitao, Y., Tao, L. y Haifeng, Q. (2023). Pesticide interference and additional effects on plant microbiomes. *E/Sevier*, 888:164149. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164149.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20, 10-16. DOI: 10.1016/j.coi.2007.11.003.

ANEXOS

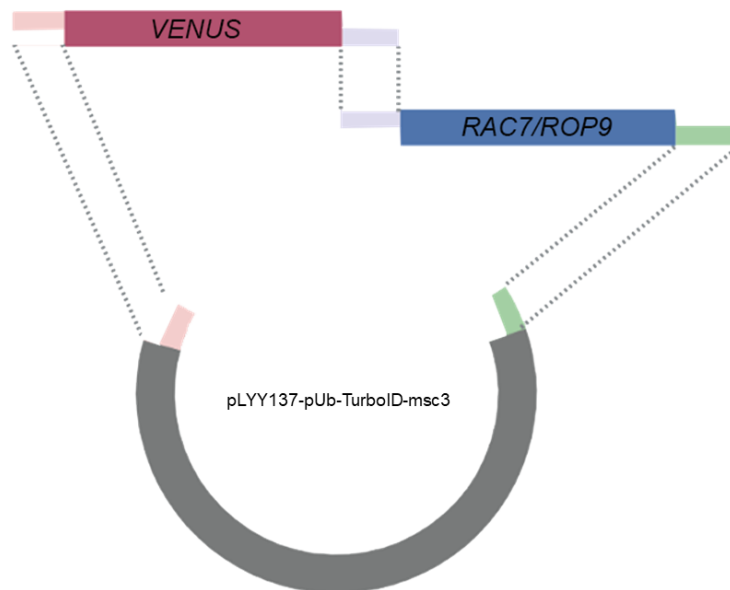
1. LÍNEAS SOBREEXPRESANTES DE *ATRAC7/ROP9*



2. Construcción TurboID:VENUS



3. Construcción TurboID:VENUS:RAC7





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Secretaría de Extensión

Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 26 de febrero del 2024

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES

P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. SEGURA MUÑOZ JESSICA SAMANTHA**, con el título del trabajo: **RESPUESTA INMUNE DE LÍNEAS INSERCIONALES OX-RAC7 DE *Arabidopsis thaliana* FRENTE A PATÓGENOS CON DIFERENTES ESTILOS DE VIDA.** En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. ROSA CERROS TLATILPA

SECRETARIO: DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA

VOCAL: DR. MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA

SUPLENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Unidad Biomédica,
Tel. (777) 329 7047, 329 7000, Ext. 3527 / titulaciones.biologia@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



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

MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA | Fecha:2024-02-26 13:08:35 | Firmante

Day7VPsBpjQ6VPhUupllUsWTBnwbgnuNIN2buj6J5s+X1c2eCvyYsdgpN/oga4cOk4kxAVzab60aKJ5Oph4hkNpFVu0Njt1Go16M1EpKDYAD6eydRSLkVBjc5MNPJXSnEj8DQzr3HXJiyTttU0PrK2c8sA8p8xuQaj2LtytcOpVuxgBvwSCPejElv/McU4X+tkivm4DNUGLY31KFupYIIQUe06hEN/6cpsQx64nPFYLEQ47cZ2iwiaidTy1v/CeBNGcEqtdEagbPwlaWbeEATwHUM3d11evpO4FhmL4h3QcA12HbGglmylipJLfrclLBw3YGoQtAJh8XGO3OJJ0Wqg==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2024-02-26 13:26:15 | Firmante

rdYBhaElr8Mz5Z0NuSvVEDfO1iHumZPmUvCXdPSI5bMqXlt6ZPKhyRffDIAscZmvzp50o0YpFoGkMkiACbWmjsa5Ane89F5+0XBtL5VzrVmKAWQUx3vriUke7UkWHjpGlbwAupwWvC9sauYN5oOgV1B61IEZjBpV66uWT2L1EMqWq0S2mmFbd03oodPkvWYsQsJfJqKQcCYMu0UvTgpX46UQE6XzNVF6kxZwtW/kqkQWdwNvbzBK1Q6zWd/xrWe1AZJ41YkTLs13rRdZuLl/VeE9+3F/7+IL9EIGNnddF6XozdpBMMtBRXkcPg3Aez9vbgj7KwtsaDbQ8ea4o/Pw==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2024-02-26 15:46:07 | Firmante

E1q0Qb9tLcJhI4XEGNyYfzHFS63p7rwOphg9oitlrjwYIRxSf/wfLmddmM2G33FhSRf/z7uTUwibFmCnSZgq+JxLduMZkVbt5C+g7cwKMkOsf/wUyqrhoeY1YWiSalKhrUhyJXjltNjJjAlDeWSaaJDVMGnv36xf1M4r/hLcOMjs3NUW05a6ZE9NLK8DIT1/BSyl7onF0yvLTtqSjUH5M0gmM9KaOg7PKFp8vCUtDDICTQ1t3Z0W6LxVwPjFX7rkq9a8As7Y5pOGwhQLov012IJVQJmqDSXgYoYAXsj82mC8O2S3xLN6LZFBngg4Dxo2R6lvHwMVFVQ5eoFowA==

ROSA CERROS TLATILPA | Fecha:2024-02-26 15:48:01 | Firmante

gia2znnndni2/Lcpf/75b66FIOTMOPVLAdszmf0DKDM4SxexpAo4xJHOPLHtWp6uER8EzdeDUQO4dMA8NQ6mbPlzP2eefm4WDBev03p5wnp1FpVZaCVJkC0oTr7ROxuLJcklY16BScyNtORZxokAyy/4adlFjFN2FKAtmgf8NH4ZMTDswHwrWAJdNHUk2AEOXZVlz/qZM3EVSgHEarTUXJasMvgVBSlZFI2ZGS4z4bj7HaMWG8NbnTRdmdROV+xkEs140WN eoi3SKoiSyOvsbAYZP1sKURnrWqc8KKjQhzy87fQH+lvqHBEA5Kibp5E4KmhZdelHftXfKAAEXJ7Ug==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2024-02-27 11:19:50 | Firmante

F/pFrK08VzZZI1VAcSwBw+r4MEvCnRs6B7ePvN SobwBaEXWP4nq7CF2ouivzf4Zctc3s8ZEYyYDVCJLrt2RUJwaG+ZCuDoFFwqxaM8aCuuOma/QwckpEWRBR7Yqh4eAN0DPit3EC4EZ/Gho7d0KRW188Gx/MH0m7fEkB2CQPDx6GiGyeCQ8z2X09YTswWykbFUG11znir7MLW6uRPlzOWkld1o2HkULHeC7L03XoEwBNruB4XX1FJtZjGVwtpgigzieUwbu/HJaehvhJiLhij4svDPIEO/ZVmBO4ibRF6FllgqnbGV51IPxQZZUsYIsAJt0yCPF3uirpZR6tshaw==

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



eVHASEpyP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Qvs7Dwj111q5Rn2B98WpKOhQuUJonlBp>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029