



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



“Funcionalidad del promotor *Ah-HFR* en respuesta a daño mecánico y herbivoría por larvas de *Manduca sexta*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTA

JESÚS GILBERTO LÓPEZ CARRILLO

DIRECTORES

DR. JOHN PAUL DÉLANO FRIER

DR. JOSÉ JAVIER HUIJARA VASCONSELOS

Villahermosa, Tabasco

Marzo de 2020



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS



Asunto: Autorización de impresión  
de Trabajo Recepcional.

Fecha: 10 de marzo de 2020.

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y  
TITULACIÓN DE LA UJAT.  
P R E S E N T E

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted que con base en el artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) **C. Jesús Gilberto López Carrillo**, con matrícula **142C16001**, egresado(a) de la Licenciatura de Ingeniero Agrónomo de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, la impresión de su Trabajo Recepcional bajo la modalidad de Tesis, titulado: **"Funcionalidad del promotor Ah-HFR en respuesta a daño mecánico y herbivoría por larvas de *Manduca sexta*"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Ph.D. ROBERTO ANTONIO CANTÚ GARZA  
DIRECTOR



DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente Alumno.  
Archivo  
Ph.D. RACG/MC.AMA

Miembro CUMEX desde 2008  
Consortio de  
Universidades  
Mexicanas  
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km 25, Carret. Villahermosa-Teapa  
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México  
Tel. (+52 993) 358-15-85 y 142-9150  
Correos electrónicos: [direccion.daca@ujat.mx](mailto:direccion.daca@ujat.mx), [daca.direccion@gmail.com](mailto:daca.direccion@gmail.com)

### CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional denominado "**Funcionalidad del promotor *Ah-HFR* en respuesta a daño mecánico y herbivoría por larvas de *Manduca sexta***", del cual soy autor titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco del Trabajo Recepcional antes mencionado, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 13 días del mes de marzo del año 2020.

AUTORIZO

Jesús Gilberto López Carrillo

NOMBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ese enorme esfuerzo descomunal que han hecho con el afán de brindarme la mejor educación posible.

Estaré enormemente agradecido con el Dr. John Paul Délano Frier y la M.C. Gabriela Cabrales Orona, quienes no dudaron en aceptarme en su laboratorio y por todo su apoyo durante el lapso de mi estancia.

Agradezco mucho el apoyo que me han otorgado mis profesores en la culminación de mi tesis: Dr. José Javier Huijara Vasconcelos, Dr. Efraín de la Cruz Lázaro, Dra. Hortensia Brito Vega, Dr. César Márquez Quiroz y al MC. Jaime Gabriel Cázares Camero.

A mis mejores amigos, que están a un mensaje de texto o llamada telefónica. Quienes sin importar las circunstancias, siempre estuvieron conmigo. Fernanda Camacho, Priscila Bautista, Diana Laura y Orlando Camargo.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas: Norma, Ismael, Andrea, Claudia, Sarita, Gil, Mariela, Kathia, Vero, Alesandro y Frida, por aquellos momentos compartidos, tanto de bromas como académicos, y en su momento, personales.

Finalmente, quiero terminar agradeciendo con total sinceridad y cariño a una persona muy especial para mí, Cali, la chica de las plantas raras.

## CRÉDITOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas, bajo la asesoría del **Dr. John Paul Délano Frier** y de la **M.C. Gabriela Cbrales Oronona**, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, perteneciente al CINVESTAV-IPN, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, con recursos económicos del proyecto “**Caracterización funcional de genes de amaranto de grano mediante la sobreexpresión y fusión transcripcional en *A. thaliana***”, apoyado por Conacyt.

México.

de Tabasco.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                     |            |
|---------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                      | <b>iii</b> |
| <b>I INTRODUCCIÓN.....</b>                                          | <b>1</b>   |
| <b>II OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>                               | <b>6</b>   |
| <b>2.1 Objetivo general .....</b>                                   | <b>6</b>   |
| 2.1.1 Objetivos específicos.....                                    | 6          |
| <b>2.2 Hipótesis .....</b>                                          | <b>6</b>   |
| <b>III ANTECEDENTES .....</b>                                       | <b>7</b>   |
| <b>3.1 Estrés en plantas.....</b>                                   | <b>7</b>   |
| 3.1.1 Estrés abiótico .....                                         | 7          |
| 3.1.2 Estrés biótico .....                                          | 8          |
| <b>3.2 Resistencia.....</b>                                         | <b>10</b>  |
| <b>3.3 Tolerancia .....</b>                                         | <b>11</b>  |
| <b>3.4 Las fitohormonas y el estrés .....</b>                       | <b>12</b>  |
| <b>3.5 Hábitos alimenticios de herbívoros.....</b>                  | <b>14</b>  |
| 3.5.1 <i>Manduca sexta</i> .....                                    | 14         |
| <b>3.7 Regiones promotoras .....</b>                                | <b>15</b>  |
| <b>3.8 El gen <i>HFR</i>.....</b>                                   | <b>17</b>  |
| <b>3.9 Genes reporteros .....</b>                                   | <b>17</b>  |
| 3.9.1 Proteína verde fluorescente (GFP) .....                       | 18         |
| 3.9.2 $\beta$ -glucoronidasa (GUS).....                             | 19         |
| 3.9.3 Gen de selección para conferir resistencia a Kanamicina ..... | 20         |
| <b>3.10 Planta modelo: <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>         | <b>20</b>  |

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>IV MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                         | <b>22</b> |
| <b>4.1 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del promotor .....</b>                     | <b>22</b> |
| <b>4.2 Selección de transformantes en T1 .....</b>                                          | <b>22</b> |
| <b>4.3 Esterilización de semillas .....</b>                                                 | <b>23</b> |
| <b>4.4 Trasplante para obtención de plantas transgénicas T2 .....</b>                       | <b>23</b> |
| <b>4.5 Daño por herbivoría.....</b>                                                         | <b>24</b> |
| <b>4.6 Daño mecánico.....</b>                                                               | <b>25</b> |
| <b>4.7 Análisis de expresión de GUS mediante localización histoquímica .....</b>            | <b>25</b> |
| <b>4.8 Ensayos de daño mecánico y por herbivoría en T3.....</b>                             | <b>26</b> |
| <b>V RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>                                                        | <b>27</b> |
| <b>5.1 Analisis de la secuencia del promotor.....</b>                                       | <b>27</b> |
| <b>5.2 Selección de transformantes de las generaciones T1 y T2.....</b>                     | <b>28</b> |
| <b>5.3 Respuesta a daño mecánico en T2 .....</b>                                            | <b>30</b> |
| <b>5.3 Respuesta a herbivoría por larvas de insectos masticadores en plantas T2 ...</b>     | <b>31</b> |
| <b>5.4 Expresión de GUs por daño mecánico y herbivoría por insectos en plantas T3 .....</b> | <b>35</b> |
| <b>VI CONCLUSIONES .....</b>                                                                | <b>38</b> |
| <b>VII PERSPECTIVAS .....</b>                                                               | <b>39</b> |
| <b>VIII REFERENCIAS .....</b>                                                               | <b>40</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Figura 1.</i> Mapa de la región promotora del gen <i>AhHFR</i> de <i>Amaranthus hyocondriacus</i> ....         | 27 |
| <i>Figura 2.</i> Porcentaje de plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas durante dos generaciones: T1 y T2..... | 30 |
| <i>Figura 3.</i> Localización histoquímica de la actividad de GUS por daño mecánico y herbivoría. ....            | 34 |
| <i>Figura 4.</i> Localización histoquímica de la actividad de GUS en inflorescencia de <i>A. thaliana</i> . ....  | 35 |
| <i>Figura 5.</i> Expresión del pAh-Hfr::GUS-GFP en <i>Arabidopsis</i> . ....                                      | 37 |

## I INTRODUCCIÓN

Un gen es la unidad de herencia, constituida por un segmento de ADN (incluido la región promotora y la que se transcribe) situado en un locus determinado, que codifica un producto funcional (como un polipéptido o una proteína) que contribuye a establecer las características fenotípicas de un individuo. Cuando se desconoce la función de un gen, este puede ser caracterizado a nivel de secuencia u homología, transcripcional y funcionalmente (Wain *et al.*, 2002). El gen *AhHFR*, identificado en *Amaranthus hypocondriacus* (una de las tres especies de amaranto de grano), es inducido como respuesta al ataque de larvas de *Trichoplusia ni*, un insecto masticador. Esta respuesta indica que puede estar involucrado en la respuesta de defensa de la planta contra insectos masticadores (Cabrales, 2017). En un análisis *in silico* de la región promotora de este gen, se enumeraron cinco familias importantes de elementos reguladores: i) MADS (Minichromosome Maintenance Factor; Agamous; Deficiens; Serum Response Factor) que identifica a una superfamilia de factores de transcripción involucrados en los estados meristemáticos del desarrollo floral (Smaczniak *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2017); ii) AHBP (Arabidopsis homeobox protein) que regula el crecimiento embrionario, brotación, patrón de raíces, control de crecimiento bajo sombra, determinación del destino de órganos, y proliferación celular (Deihimi *et al.*, 2012; Ilyas *et al.*, 2016); iii) L1BX (o Homeodomain protein) que media la respuesta a estrés biótico estimulado por elicitores fúngicos confiriendo tolerancia al estrés oxidativo, así como su participación en la regulación del desarrollo embrionario (Xu *et al.*, 2012; Sheshadri *et al.*, 2018); iv) DOF (DNA binding with One Finger) que son factores de transcripción

involucrados en la regulación de respuestas a estrés, así como de procesos fotosintéticos o de inducción floral (Noguero *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2015), y v) GTBX (GT-Box elements) asociados con la regulación transcripcional sensible a la luz, sal y resistencia a patógenos, (Ilyas *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 1999). Este análisis sugiere una serie de investigaciones para evaluar las distintas funciones que puede tener un gen. Una estrategia para determinar la funcionalidad es con genes reporteros, por ejemplo,  $\beta$ -glucoronidasa (GUS) y proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). En este sentido *Arabidopsis thaliana* es una especie ampliamente utilizada como modelo para los experimentos en plantas transgénicas que involucran la inserción de un gen para su análisis funcional, sobreexpresión o silenciamiento de genes endógenos, o complementación de un alelo mutante por transformación. En este mismo sentido, si la funcionalidad de la secuencia del gen candidato es conocida los resultados también pueden ser transferidos a organismos de interés antropocéntrico (Anderson y Mitchell-Olds, 2011). Bajo este enfoque, las especies de plantas cultivables con fines de producción podrían verse beneficiadas. Sobre todo, en las especies que debido a diferentes procesos (domesticación, monocultivos, y disminución de poblaciones) han perdido diversidad genética, por lo que algunas veces carecen de genes de respuesta contra estreses bióticos y abióticos (Chen *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2016), lo que contribuye a disminuir el rendimiento y calidad de los cultivos.

El género *Amaranthus* pertenece a la familia *Amaranthaceae* e incluye aproximadamente 60 especies, de las cuales tres son utilizadas para la producción de granos: *Amaranthus hypocondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, (Brenner *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2010). El

amaranto es un cultivo muy versátil que crece en un amplio rango de condiciones agroclimáticas; resiste sequía, calor (mayor a 28.9 °C), plagas y enfermedades, de la misma forma se adapta rápidamente a nuevas condiciones ambientales, incluyendo algunas que los cultivos convencionales, como cereales, no soportarían (Belton y Taylor, 2002; Brenner *et al.*, 2010; Garc, 2016). En otro contexto, un estudio demostró que el cultivo de *A. hypocondriacus* tiene un gran potencial para la fitorremediación de suelos contaminados con cadmio, y su eficiencia de fitorremediación fue significativamente influenciada por el corte, tiempo de crecimiento, y fertilización (Li *et al.*, 2013). Todas estas características deseables, realzan la importancia del amaranto para el estudio de los genes de función desconocida que posee.

Las estrategias de defensa de la planta contra insectos han despertado un intenso interés e impulsado una activa investigación con profundos logros, especialmente en los últimos 30 años (Heil, 2014). Aunque las plantas, (Li *et al.*, 2019), no tengan la capacidad de moverse, sus respuestas moleculares a su ambiente son extremadamente complejas (Cramer *et al.*, 2011). Los insectos son unos de los desafíos a los que las plantas están continuamente expuestas y ambos organismos han coevolucionado por más de 300 millones de años (Waterman *et al.*, 2019), generando una presión de selección por ambas partes (Erb y Reymond, 2019). Esto se ha visto reflejado en la compleja interacción planta-herbívoro. Usualmente, la respuesta de defensa en la planta se activa cuando ésta reconoce señales liberadas por el organismo atacante. Entre éstas están los Patrones Moleculares Asociados a la Herbivoría (o HAMP, por sus siglas en inglés), elicitores o efectores (metabolitos

secundarios y/o proteínas). Asimismo, la planta misma puede liberar elicitores (Halitschke y Baldwin, 2004; Major y Constabel, 2006; Peiffer y Felton, 2009). A nivel intracelular, las principales fitohormonas involucradas en mediar las respuestas de defensa son el ácido jasmónico (AJ), el ácido salicílico (AS) y el etileno (ET). Durante todo el proceso defensivo, la planta desencadena cascadas de señalización complejas (p.e., rutas de señalización de naturaleza química o eléctrica) activadas tanto local como sistémicamente, que resultan en la producción de especies reactivas de oxígeno (o EROS), liberación rápida y efímera de  $\text{Ca}^{2+}$ , síntesis de hormonas de defensa y de metabolitos especializados, y la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV), que contribuyen a mitigar los efectos impuestos por el estrés biótico (Rejeb *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2017; Toyota *et al.*, 2018).

Hace 79 años se propuso a *A. thaliana* como organismo genético modelo y en 1980 fue usado por primera vez. El éxito de su uso en laboratorio se debe a factores como, el reducido tamaño de su genoma (que codifica para aproximadamente 20 mil genes), tiempo corto entre generaciones (entre seis y ocho semanas), de fácil cruzamiento, alta fecundidad y la disponibilidad de un alto número de mutantes para cada uno de sus genes, las cuales pueden ser, también, fácilmente generadas en el laboratorio (Meinke *et al.*, 1998; Provar *et al.*, 2016). *A. thaliana* es un organismo genéticamente manejable, que puede ser transformado usando algunos de los métodos más populares, como el basado en la infección con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes* (Clough y Bent, 1998), la electroporación o la biobalística, donde solo el primero posee una alta eficiencia de transformación. Existen otros métodos, de menor eficiencia de transformación y para algunos de ellos, costos elevados.

Éstos son mencionados a continuación: Infiltración al vacío, ondas de choque y ultrasonido, transformación mediada por fibras de carburo de silicio, microinyección, macroinyección, y láser de microhaz (Rivera *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la funcionalidad de la región promotora del gen *Ah-HFR* en transformantes de *A. thaliana* mediante la tinción histoquímica de GUS en respuesta al daño mecánico y a herbivoría por larvas de *Manduca sexta*, un insecto masticador de uso común en el laboratorio.

## II OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la funcionalidad de la región promotora del gen *Ah-HFR* en transformantes de *Arabidopsis thaliana* mediante la tinción histoquímica de la  $\beta$ -glucoronidasa (GUS) en respuesta al daño mecánico y herbivoría por larvas de *Manduca sexta*.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

Seleccionar líneas de *A. thaliana* expresantes de la región promotora del gen *Ah-HFR* acoplada al gen reportero *GUS*.

Evaluar las líneas expresantes de la región promotora del gen *Ah-HFR* ante dos condiciones de estrés: Daño mecánico y herbivoría por larvas de *Manduca sexta*.

Identificar la actividad de  $\beta$ -glucoronidasa en líneas seleccionadas de *A. thaliana* capaces de expresar, en hojas, la región promotora del gen *Ah-HFR* acoplada al gen reportero *GUS* en respuesta a daño mecánico y herbivoría por larvas de *M. sexta*.

### 2.2 Hipótesis

La región promotora del gen *Ah-HFR* responderá al estrés biótico ocasionado por herbivoría causada por larvas de *Manduca sexta* (herbívoría) y/ o al daño mecánico al ser analizada en plantas de *A. thaliana* transformadas con el promotor de este gen acoplado al gen reportero *GUS*.

### III ANTECEDENTES

#### 3.1 Estrés en plantas

El estrés puede ser definido como un cambio brusco en el ambiente que excede el estado óptimo del organismo y causa un desbalance homeostático que debe ser compensado con una respuesta para su aclimatación o adaptación (Kilian *et al.*, 2012). Debido a su vida sésil, las plantas están continuamente sujetas a este tipo de desbalance (Suzuki *et al.*, 2014), de tal manera que dependen del despliegue de una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios, y/ o proteínas para responder a diferentes tipos de estrés (Neilson *et al.*, 2013). El estrés en plantas se divide en dos clases; por un lado, el estrés abiótico es reconocido como una condición ambiental (e.g., sequía, anegación, salinidad, calor, frío, luz excesiva y toxicidad química (Le *et al.*, 2003; Cramer *et al.*, 2011) que reduce el rendimiento y crecimiento adecuado de las plantas. A su vez, el estrés biótico es inducido por cualquier tipo de daño físico provocado por herbívoros o patógenos (Bruce y Pickett, 2007).

##### 3.1.1 Estrés abiótico

Las condiciones ambientales extremas a las que se enfrentan las plantas provocan estrés. Para sobrevivir, crecer y reproducirse bajo estas circunstancias, dependen de sistemas complejos que regulan su adaptación en respuesta a señales de estrés (Mizoi *et al.*, 2012). Por ejemplo, el déficit de agua inhibe el crecimiento de la planta al reducir la absorción de la misma por las células, y altera enzimáticamente las propiedades reológicas de la pared celular (Skirycz e Inzé, 2010). Estos procesos de adaptación incluyen cambios bioquímicos, fisiológicos y de desarrollo, regulados por expresión de genes que responden a señales (Mizoi

*et al.*, 2012). Dependiendo del nivel y duración del estrés, puede tener un efecto significativo en la complejidad de la respuesta (Pinheiro y Chaves, 2011) y en el daño fisiológico causado a la planta. De forma general, todos estos factores causantes del estrés abiótico afectan directa o indirectamente la síntesis, concentración, metabolismo, transporte y almacenamiento de carbohidratos, y en el mismo sentido, también se llevan a cabo eventos de transducción de señales mediante rutas de señalización específicas. Mismos que actúan como señales potenciales que interactúan con la luz, disponibilidad de nitrógeno y factores de estrés abiótico para regular el desarrollo y crecimiento de la planta (Osuna *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2010).

### **3.1.2 Estrés biótico**

El estrés biótico es inducido por cualquier tipo de daño físico provocado por herbívoros o patógenos (Bruce y Pickett, 2007). Por lo tanto, el metabolismo relacionado con la defensa de las plantas es activado cuando se detecta un organismo ajeno, ocasionando la sobreexpresión de genes asociados con la producción de metabolitos o proteínas de índole defensivo, como inhibidores de proteínasa, toxinas o COV que repelen plagas o atraen a sus enemigos naturales (Bruce y Pickett, 2007). Pero la respuesta de defensa de las plantas puede ser modificada al ser suprimida por organismos atacantes especializados, que pueden producir niveles fisiológicamente activos de enzimas desintoxicantes que interfieren con el metabolismo de la planta en formas que benefician al atacante (Bruce y Pickett, 2007).

Los insectos masticadores (sobre todo en el estado larvario), además de liberar HAMP, provocan un daño mecánico en las células sobre las que actuaron, modificando el espacio

extracelular al mezclar los componentes del citoplasma con fragmentos de la pared celular y capas externas; una de ellas es la cutícula cerosa (Acevedo *et al.*, 2015). Durante este evento, también son producidos los patrones moleculares asociados a daño mecánico (o DAMP, por sus siglas en inglés), como los oligogalacturónicos, sistemina y otros péptidos elicitores (Heil y Land, 2014)) que, junto con los HAMP, son detectados por receptores de reconocimiento de Patrones (o PRR, por sus siglas en inglés) como las cinasas asociadas a la pared (o WKR, por sus siglas en inglés) (Brutus *et al.*, 2010). Incluso las moléculas de ATP, además de ser detectadas por el receptor DORN1 (que es un tipo de cinasa receptora de leucina) (Choi *et al.*, 2014), inducen, también, genes que responden a AJ (Tripathi *et al.*, 2018). Durante el daño, también ocurre una despolarización de la membrana plasmática, aumenta temporalmente el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , se inicia la producción de EROS, al igual que la actividad de cinasas tipo MAPK (o proteína cinasa de mitógeno activado) (Qia *et al.*, 2010; Barbero *et al.*, 2016). El  $\text{Ca}^{2+}$ , que es reconocido a través de sus sensores, como la CML37, una proteína del tipo calmodulina (Scholz *et al.*, 2014) regula positivamente la ruta del AJ, mientras que otros como la CML42 la regulan negativamente (Vadassery *et al.*, 2012). Las EROS son producidas rápidamente, tanto de forma local como sistémica, por las oxidasas NADPH ubicadas en la membrana plasmática y activadas en respuesta a daño mecánico (Miller *et al.*, 2009). Sin embargo, pueden actuar de modo positivo o negativo dependiendo de la especie (Block *et al.*, 2018). Corriente debajo de estos procesos como la despolarización de la membrana, la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , la acumulación de EROS, y la activación de MAPK, se genera AJ-Ile (Jasmonil-L-Isoleucina), que es la forma bioactiva del

AJ. Mientras tanto, enzimas localizadas en el peroxisoma y cloroplasto son rápidamente activadas para generar la descarga primaria de AJ mediante mecanismos desconocidos (Monte *et al.*, 2018). La unión de JA-Ile al complejo SCF<sup>COI1</sup>, que es el receptor de AJ acoplado a la proteólisis dependiente de ubiquitinación, conduce a la degradación de represores tipo JAZ (llamados así por ser proteínas que responden a jasmonato y que poseen un dominio ZIM), dando como resultado la activación de factores de transcripción de la familia WRKY, MYB y MYC, así como MYC<sub>2</sub> y EREB<sub>58</sub>) que regulan la producción de metabolitos y proteínas de defensa como fenilpropanoides, alcaloides (e.g., nicotina), sesquiterpenos, treonina deaminasa e inhibidores de proteínasa (Erb y Reymond, 2019).

### 3.2 Resistencia

Es una estrategia de defensa que ocurre cuando la estructura o características químicas de la planta repelen al herbívoro y minimizan la cantidad de daño que la planta experimenta (Howe y Jander, 2008; Stout, 2013). Entre sus mecanismos se pueden describir los siguientes: la disuasión química de insectos a través de la producción de señales de alarma constituidas por feromonas repelentes; emisión de volátiles de la planta inducidos por herbívoros (HIPV, por sus siglas en inglés), y péptidos elicitores que afectan el crecimiento de la larva y atraen parasitoides (es decir, componentes de la llamada defensa indirecta) (Huffaker *et al.*, 2013; Bruce *et al.*, 2015; Tamiru *et al.*, 2015). Además, la planta cuenta con barreras físicas para defenderse del ataque de plagas y evitar su alimentación, u ovoposición, como la producción de cera epicuticular (White y Eigenbrode, 2000), tricomas glandulares (Figueiredo *et al.*, 2013) y altas densidades de tricomas no glandulares (Graham *et al.*, 2014). Asimismo, puede

acumular compuestos tóxicos para reducir su palatabilidad (Santolamazza-Carbone *et al.*, 2016). Todas estas estrategias son parte de la llamada defensa directa.

Como se mencionó anteriormente, la palatabilidad de tejidos de las plantas puede ser reducida mediante la producción de metabolitos secundarios (Boege y Marquis, 2005), también conocidos como metabolitos de defensa. Éstos son un grupo de compuestos producidos tanto por plantas, algas, hongos, bacterias y animales (Gribble, 2003), y aunque no son necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta, sí lo son para su supervivencia. Las fitoalexinas (e.g., alcaloides, terpenoides, etc.), un grupo de metabolitos cuya acumulación se induce para proteger a la planta de la herbivoría por insectos de varios gremios alimenticios (Moran y Thompson, 2001).

De igual manera, el número de insectos herbívoros puede ser disminuido mediante la liberación de volátiles y néctar extra floral exudado por la planta, mecanismo clasificado como defensa indirecta, donde la planta interactúa con los enemigos de los insectos plaga (Maffei, 2010).

### **3.3 Tolerancia**

Las plantas reducen mediante esta estrategia los efectos negativos del daño causado por el herbívoro en el rendimiento del cultivo (Strauss y Agrawal, 1999; Stout, 2013). Los mecanismos implicados son, modificaciones de la fotosíntesis, para estimular el crecimiento de la planta una vez que ha cesado la defoliación (Johnson *et al.*, 2012). La tolerancia a la herbivoría también depende del vigor de la raíz y el tallo, y su capacidad de acumular carbohidratos de reserva (Allsopp y Cox, 2002). Por otra parte, de manera fenológica se

retrasa la distribución de fotosintatos a la raíz para favorecer la formación de tejido foliar (Robert *et al.*, 2015).

Es más probable que las características de la resistencia impongan una fuerte presión de selección debido a los impactos severos en la dieta de las plagas, sugiriendo que las características de la tolerancia son más estables, con mayor posibilidad de proveer un control de plagas a largo plazo (Mitchell *et al.*, 2016). Sin embargo, la pérdida causada por las plagas en los cultivos pueden prevenirse o evitarse con algunos mecanismos de resistencia, como la “defensa inducida”, que ocurre después de que la planta es atacada. Durante esta interacción, se reconoce el daño causado por el insecto por medio de moléculas derivadas de este último, denominadas HAMP (Gouhier-Darimont *et al.*, 2013; Hilker y Meiners, 2010; Romeis y Herde, 2014). Algo similar ocurre con los huevos depositados sobre las plantas, que pueden ser reconocidos, activando una “alerta temprana”, en donde se adelanta el periodo de llegada de los enemigos naturales, reduciendo la emergencia y desarrollo de larvas (Hilker y Meiners, 2011; Tamiru *et al.*, 2015).

### **3.4 Las fitohormonas y el estrés**

Las plantas han desarrollado mecanismos complejos para percibir señales externas y responder en consecuencia, alterando la expresión de numerosas moléculas señalizadoras de defensa (Derksen *et al.*, 2013). Las plantas responden a la mayoría de las condiciones de estrés reduciendo su fotosíntesis y metabolismo para aumentar su sobrevivencia en un ambiente adverso, y como resultado, varios procesos sufren cambios. Durante el estrés se incrementa, también, la actividad antioxidante, se produce una acumulación de metabolitos

secundarios, y cambios en la expresión de genes (Krasensky y Jonak, 2012). En el control de todos estos procesos se encuentran involucradas las fitohormonas o reguladores de crecimiento.

Las fitohormonas regulan un amplio rango de respuestas adaptativas en las plantas bajo condiciones de estrés abiótico, tales como el crecimiento, desarrollo, distribución de nutrientes, y fuente o almacenamiento transicional. En particular, las auxinas son importantes dado el amplio rango de procesos que regulan. Las plantas responden, también, a señales inducidas por las principales hormonas del estrés como el ácido abscísico (ABA), AJ, AS y ET (Salopek-Sondi *et al.*, 2017), las cuales tienen, también, un rol importante en la regulación del estrés biótico (Verma *et al.*, 2016). Sin embargo, de manera frecuente, bajo condiciones desfavorables las auxinas mantienen interacciones con otras fitohormonas (Chandler, 2009; Kohli, Sreenivasulu *et al.*, 2013) como citocininas, brasinoesteroides, giberelinas, y estrigolactonas, con las que interactúa, ya sea sinérgicamente o antagónicamente, para desencadenar cascadas de eventos que conducen a las respuestas por estrés (Salopek-Sondi *et al.*, 2017). A continuación, se describe brevemente las interacciones de las fitohormonas de mayor importancia en el estrés con las auxinas. La importancia de estas últimas se debe a su prominente rol en múltiples procesos de desarrollo (e.g., morfología de la hoja, patrón vascular, tropismo, desarrollo de pelos radiculares, abertura y movimiento de estomas, senescencia, desarrollo del fruto, y la iniciación de raíces laterales) (Ray, 2017), que deben ser mediados de forma precisa durante un evento de estrés.

### 3.5 Hábitos alimenticios de herbívoros

Los insectos, según la forma de alimentarse, se clasifican en varios gremios o categorías. Entre los más dañinos para la agricultura están los insectos masticadores y los chupadores (Bonaventure, 2012). Los primeros laceran el tejido de la planta para alimentarse, mientras que los otros, al usar su estilete para llegar al floema y absorber la savia, causan una mínima ruptura celular (Leitner *et al.*, 2005), semejante al daño causado por patógenos. En consecuencia, las plantas usualmente los reconocen de esta forma y por lo tanto, ocurre una muerte celular programada típica de la defensa de las plantas contra patógenos biotróficos (Broekgaarden *et al.*, 2011). En este sentido, la planta puede distinguir y reconocer el tipo de daño causado en su tejido por un herbívoro atacante y de este modo la respuesta de defensa puede variar enormemente (Martin y Kamoun 2012; Reese *et al.*, 2016), ya que la planta por sí misma, puede reconocer componentes celulares autoderivados o DAMP (e.g., fragmentos de pared celular, glucosa, y electrolitos) relacionados en la respuesta a tejidos dañados (Heil, 2012) para protegerse. Por otra parte, la planta reconoce señales químicas provenientes de los insectos masticadores, como los HAMP, que producen una respuesta de defensa específica diferente a la de los DAMP (Mithöfer y Boland, 2008).

#### 3.5.1 *Manduca sexta*

El orden Lepidóptera es tan diverso que comprende alrededor de 180 mil especies descritas, la mayoría de las cuales ( $\approx 99\%$ ) son fitófagas (Mallet, 2014). *Manduca sexta* es un insecto herbívoro especialista (se alimenta exclusivamente de plantas solanáceas) que pertenece a este orden, aunque recientemente se encontró que *Manduca* es capaz de

desarrollarse en diferentes especies de plantas no hospederas (Koenig *et al.*, 2015). Sus larvas son ampliamente utilizadas en experimentos de laboratorio, como organismo modelo, tanto para estudios fisiológicos y bioquímicos, así como organismo fitófago en el estudio de las respuesta de defensa de las plantas (Baldwin, 2001). Esta especie se caracteriza por un rápido desarrollo y crecimiento (su ciclo de vida es de  $\approx 40$  d), que permite obtener hasta 9 generaciones por año, mientras que su peso en estado larval oscila entre 7.5 y 9 g (Bell y Joachim, 1976).

La saliva de los lepidópteros contiene enzimas antioxidantes (e.g., peroxiredosinas, peroxidasas, y catalasas). Estos compuestos podrían ayudarle a evitar su reconocimiento por las plantas al reducir las EROS, que son conocidas por ser mensajeros secundarios en la señalización de la planta (Baxter *et al.*, 2014). La saliva también contiene varios inhibidores de proteasas que pueden estar involucrados en reducir el efecto nocivo de las proteasas de la planta en la digestión del insecto (Li *et al.*, 2009).

### **3.7 Regiones promotoras**

Las secuencias promotoras son los principales elementos de regulación de la expresión de genes (Solovyev *et al.*, 2010). Un promotor es una secuencia de ADN localizada antes del inicio de la transcripción que incluye las regiones de interacción para factores de transcripción y las regiones localizadas a - 10 (TATAAT) y - 35 (TTGACA) pares de bases del sitio de inicio de la transcripción que son importantes para la expresión (Potenza *et al.*, 2004). Estas regiones están compuestas por una secuencia central de ADN (i.e., el “Promotor central”) y por otros elementos reguladores como, iniciadores, silenciadores y otras

secuencias de ADN, que interactúan con proteínas de unión al ADN (i.e., factores de transcripción), para regular la expresión de genes en células de plantas (Benfey y Chua, 1990). Un factor de transcripción es una proteína de unión del ADN que es capaz de reconocer, y unirse, a sitios específicos de la región promotora para regular los niveles de transcripción de sus genes en dirección 5' a 3' (Yu y Li, 2017).

Existen dos tipos de promotores: 1) los constitutivos, dirigen la expresión génica de manera uniforme en la mayoría de los tejidos y células en todos los estados de crecimiento y desarrollo de la planta, mismos que confieren altos niveles de expresión transgénica cuando son transferidos a células de las plantas (Dutt *et al.*, 2014). Por otra parte, 2) los promotores inducibles son inducidos por factores físicos como el estrés biótico y abiótico o agentes químicos, y son una herramienta poderosa para regular la expresión de genes en ciertas etapas del desarrollo de las plantas o tejidos (Dutt *et al.*, 2014). Los promotores inducibles son también útiles para la regulación de genes letales potencialmente o genes regulados por estrés que son activados como resultado de estreses biótico y abiótico (Hernandez-Garcia y Finer, 2014). Esta clase de promotores pueden ser clasificados según la señal percibida, como por ejemplo: señales endógenas provenientes de fitohormonas, estímulos físicos externos provocados por estrés biótico y abiótico, y estímulos químicos externos (Hernandez-Garcia y Finer, 2014). Las plantas, durante su evolución, han adquirido mecanismos intrincados de regulación de genes para mitigar las condiciones ambientales adversas a las que se enfrentan normalmente, por lo que poseen un gran número de este tipo de promotores. Además, dichos promotores son ideales para aplicaciones biotecnológicas en la agricultura. Ejemplo de ello,

son los promotores inducidos por patógenos e inactivados bajo condiciones libre de enfermedades (Kovalchuk *et al.*, 2010).

### 3.8 El gen *HFR*

El gen *HFR* de trigo responde a la mosca de Hess y codifica para una proteína con actividad insecticida (Pyati *et al.*, 2012). Contiene un dominio tipo lectina/aglutinina, con un posible rol defensivo. En el gen *HFR-2*, aislado en trigo, se halló que codifica proteínas tipo aglutinina similares a las descritas en la semilla de *Amaranthus spp.* Asimismo, contiene una región similar a proteínas hemolíticas de hongos y bacterias que son capaces de formar poros en la membrana celular de células de la sangre (Puthoff *et al.*, 2005).

En un estudio previo (Cabrales-Orona, 2017), se encontró que en tres especies de amaranto de grano (*A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*), se incrementaron los niveles de expresión del gen *HFR* en respuesta a la herbivoría por larvas de *Trichoplusia ni*. Sin embargo, a nivel sistémico la respuesta en *A. caudatus* fue reprimida. Por otro lado, la respuesta sistémica en hojas intactas de plantas dañadas se encontró el mismo patrón de expresión: es decir, inducción en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, y represión en *A. caudatus*. Con base a lo anterior, se justifica la importancia de evaluar la función de este gen en un organismo modelo, como lo es *A. thaliana*.

### 3.9 Genes reporteros

La expresión de genes reporteros en plantas transgénicas es exacta en análisis sensibles, facilitando el análisis de la expresión de un gen foráneo, como el rol de actuación en cis de la secuencia en la regulación de la actividad del gen (Weising *et al.*, 1988). El control de la

actividad genética puede ser manifestado en muchos niveles, incluyendo la iniciación de transcripción o traducción, transformación, y transporte o degradación de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) o proteínas (Jefferson *et al.*, 1987). La medida del producto del gen reportero provee un estimado indirecto de la inducción en la expresión del gen dirigida por la secuencia reguladora (Ausubel *et al.*, 2003). El sistema de análisis del gen reportero ideal tiene las características de ser sensible, cuantitativo, rápido, fácil, reproducible y seguro (Schenborn y Groskreutz, 1999).

La clororanfenicol acetiltransferasa (CAT), de *Escherichia coli*, fue usada en la primera publicación para describir el vector del reportero genético y el sistema de análisis de regulación transcripcional en células madre (Gorman *et al.*, 1982). Desde entonces, varios genes reporteros y su análisis han sido desarrollados. Entre éstos se incluyen los codificantes para las siguientes proteínas marcadoras o enzimas:  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, hormona del crecimiento,  $\beta$ -glucoronidasa (GUS), fosfatasa alcalina, proteína verde fluorescente (GFP) y  $\beta$ -lactamasa (Schenborn y Groskreutz, 1999).

### **3.9.1 Proteína verde fluorescente (GFP)**

La GFP es codificada por un gen de la medusa *Aequorea victoria*. La expresión de GFP se usa para monitorear la expresión de un gen o región promotora y para localizar la proteína de estudio en organismos vivos. La GFP es una proteína de 238 aminoácidos, que absorbe la luz azul (rango de 395 a 470 nm) y emite luz verde (rango de 509 a 540 nm) (Chalfie *et al.*, 1994). La expresión y localización de *GFP* puede ser directamente monitoreada en organismos y células vivas o fijadas usando UV o iluminación con luz azul (Chalfie *et al.*,

1994; Takada et al., 1997; Wang y Hazelrigg, 1994). Asimismo, GFP es muy estable al calor, pH extremo, y desnaturalizantes químicos.

### 3.9.2 $\beta$ -glucoronidasa (GUS)

El gen reportero *GUS* es uno de los que cuenta con mayor aceptación para su uso en el análisis de expresión génica en plantas. Una de sus principales ventajas es que permite realizar análisis rápidos y no radiactivos (Martin *et al.*, 1992). Además, debido a que los ensayos son extremadamente sensibles, es posible obtener datos cuantitativos (e.g., a nivel de expresión) y cualitativos (e.g., especificidad de expresión en tejidos y órganos) a escala espacio-temporal. Los ensayos cuantitativos son realizados usando sustancias fluorogénicas como 4-metilumbelliferril- $\beta$ -glucoronido (4-MUG) y 5-bromo-4-indolil- $\beta$ -D-glucoronido (X-gluc). Por otro lado, puede mostrar de forma cualitativa especificidad a nivel de tejidos y células (Martin *et al.*, 1992). La enzima GUS es muy estable, y tolera detergentes y condiciones iónicas de amplia variación. A su vez, los ensayos se pueden llevar a cabo en cualquier pH fisiológico, con un óptimo entre 5.2 y 8.0, y resiste inactivación térmica con una vida media a 55 °C por cerca de dos horas (Jefferson, 1987). Al usar este gen reportero que codifica una actividad enzimática no encontrada en el organismo de estudio, la sensibilidad con la cual la actividad quimérica del gen puede ser medida es limitada solo a las propiedades de la enzima reportera, permitiendo obtener ensayos de mayor calidad (Jefferson, 1987).

### 3.9.3 Gen de selección para conferir resistencia a Kanamicina

El transposón Tn5 lleva consigo el gen *neo* que confiere resistencia a los aminoglucósidos kanamicina y neomicina. El gen *neo* codifica para un aminoglucósido 3'-fosfotransferasa II (Berg *et al.*, 1975). La resistencia a kanamicina es mediada por alguna de las siguientes enzimas: fosfotransferasas (APH 2'' y APH 3'), acetiltransferasas (AAC 3' y AAC 6') y nucleotidiltransferasas (ANT 2'' y ANT 4') (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

### 3.10 Planta modelo: *Arabidopsis thaliana*

En el inicio de las investigaciones con genes, varias plantas fueron reconocidas como sistemas de modelo genético, y entre ellas estaban el maíz, tomate, guisante, arroz, cebada, petunia y boca de dragón. Sin embargo, los biólogos no llegaron a un consenso en cuál especie era la más adecuada para estudiar los procesos más comunes de todas las plantas, que ocurren durante el crecimiento y desarrollo, como la floración, crecimiento de raíz, acción hormonal y respuestas a señales ambientales. De modo que en 1975 se empezó a trabajar con *Arabidopsis* y se dieron cuenta que cumplía con las características mencionadas (Meinke *et al.*, 1998). Por ejemplo, la selección para rendimientos mayores y ausencia de semillas; en muchos casos, ha involucrado poliploidía (Özkan *et al.*, 2002; Rapp *et al.*, 2010), complicando la investigación genética. En contraste, las variedades de *A. thaliana* comúnmente usadas en laboratorios son recientemente descendidas de plantas silvestres (Mitchell-Olds, 2001) y permanecen diploides.

*A. thaliana* es una planta de la familia de la mostaza (crucifera o brasicacea), el género *Arabidopsis* contiene cerca de 10 especies que son nativas de Eurasia, Norte de África y

Norte América (Mitchell-Olds, 2001). Entre las características más importantes que hacen una planta modelo a *A. thaliana* están: su genoma relativamente pequeño (114.5 a 25 Mb), un ciclo de vida rápido (cerca de 6 semanas desde germinación hasta semilla madura), producción prolífica de semillas y fácil cosecha en espacios restringidos, eficientes métodos de transformación utilizando *A. tumefaciens*, una amplia gama de mutantes disponibles, bases de datos, y herramientas bioinformáticas (TAIR, 2019).

## IV MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV-IPN, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Guanajuato.

### 4.1 Análisis *in silico* de la secuencia del promotor

La región promotora fue analizada usando el programa Matilinspector, Matrix Family Library version 10.0 (<http://www.genomatix.de/>) con un filtro de plantas (i.e., *Arabidopsis thaliana*) para buscar supuestos sitios de unión de factores de transcripción. Este análisis fue llevado a cabo anteriormente por Cabrales-Orona (2017).

### 4.2 Selección de transformantes en T1

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron semillas de 16 líneas *pAh-Hfr::GUS-GFP* de *A. thaliana* (Líneas 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, y 22) de la primera generación o T1, las cuales fueron obtenidas por Cabrales Orona (2017). Estas líneas fueron transformadas insertando la región promotora del gen *AhHFR* de amaranto de grano (*A. hypochondriacus*). Previamente, se transformaron 22 plantas de *Arabidopsis* por el método de *floral dip*, y las semillas obtenidas fueron sembradas y, 15 días después, se cortó una hoja por cada planta de cada línea y se extrajo ADN para confirmar mediante PCR la inserción del promotor *AhHFR*. Para la selección de plantas transformadas, se sembraron aproximadamente 100 semillas previamente esterilizadas en cajas Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con kanamicina (Kan) (10 mg/ mL), que luego fueron germinadas en una cámara de cultivo (PERCIVAL®) durante 10 días a condiciones

de 22 °C, humedad relativa de 60 %, 16/ 8 h luz y oscuridad, respectivamente. Al finalizar este periodo, se hizo un conteo del número de plantas sobrevivientes al medio selectivo con Kan (Harrison *et al.*, 2006).

#### **4.3 Esterilización de semillas**

Las semillas de *A. thaliana*, antes de ser sembradas, fueron esterilizadas bajo condiciones de asépticas, en una cabina de flujo laminar vertical (VECO®). Para ello, las semillas almacenadas en tubos *ependorf* de 1.5 mL se lavaron en cuatro fases: i) con etanol 70 %; ii) cloro 20 %, iii y iv) dos lavados con agua estéril. Durante los lavados, se mantuvieron en agitación por medio de un vortex por dos, cinco, y un minuto, respectivamente. Finalmente, fueron almacenadas durante dos días a 4 °C en un almacén.

#### **4.4 Trasplante para obtención de plantas transgénicas T2**

El trasplante se hizo con aquellas plantas que mostraron vigor y un color verde intenso. De cada línea, se seleccionaron en promedio 15 plantas para ser trasplantadas en charolas de 200 cavidades, que antes se llenaron con una mezcla de “Sunshine Mix 3”; Sun Gro® Horticulture (<http://www.sungro.com/>), vermiculita y perlita, en relación (3:1:1). Dicho sustrato fue humedecido con un fertilizante soluble (Peter Profesional 20-10-20 N-P-K; royal brikman, global specialist in horticulture) a razón de 2 g L<sup>-1</sup>. Seguidamente las charolas fueron cubiertas con bolsas transparentes durante tres días para la aclimatación de las plántulas. Durante los días posteriores, el riego se realizó con agua potable a necesidad de las plantas y fue suspendido al inicio de la maduración de las silicuas. Finalmente, la colecta de semillas se hizo cuando las plantas estuvieron completamente secas, lo cual ocurrió aproximadamente

10 días después de suspender el riego. Las semillas colectadas de cada planta se almacenaron en tubos *ependorf* rotulados con el nombre de la línea correspondiente, número de planta, y fecha de colecta, finalmente fueron almacenadas a temperatura ambiente.

Para la obtención de plantas T2, necesarias para los ensayos de herbivoría por larvas y daño mecánico, se siguió el mismo procedimiento y condiciones antes mencionadas. Pero esta vez, se hizo uso de macetas en lugar de charolas para el óptimo desarrollo y crecimiento de las plantas.

#### **4.5 Daño por herbivoría**

A los 21 días después de la siembra, una planta T2 por cada una de las 16 líneas fue expuesta a larvas de *M. sexta* de primer instar. Los ensayos se llevaron a cabo con una planta por cada línea con su respectivo control. Del mismo modo, se emplearon dos plantas no transformadas (silvestres o “wild-type” [WT]) o transformadas con el vector vacío, con sus respectivos controles. Así mismo, se contó con una planta control positivo. Dos o tres larvas ayunadas previamente por 24 h fueron manipuladas con pinzas y puestas sobre una planta de cada línea. Posteriormente, las plantas fueron cubiertas con una malla hasta que la larva se alimentó de sus hojas. Una vez ocurrido el daño, la larva fue retirada de la planta y después de un tiempo de espera de 24 h, fue sustraída del sustrato en el que creció y sus raíces se lavaron tres veces para eliminar todo tipo de residuos. De forma cuidadosa, la planta fue secada con papel absorbente y puesta en una caja Petri, agregando 4 mL de la solución de X-Gluc y cubriéndola con papel aluminio. Finalmente fue incubada a 37 °C en oscuridad por 24 h. Ocurrido este tiempo, se hizo un lavado para desechar la solución utilizada y aclarar las

plantas para observar la tinción característica de GUS, de tonalidad azul. Por este motivo, con una micropipeta de 1 mL se retiró cuidadosamente la solución de X-Gluc evitando el contacto con la planta. Posteriormente se hicieron dos lavados con buffer Z, cuatro lavados con etanol 70 %; el número de lavados dependió de cuán sucia se encontraba la muestra. Para eliminar la clorofila, se utilizó una solución de acetona/ metanol (1:3 v/ v), dejando las muestras en esta solución el tiempo necesario hasta observar que las plantas adquirieron un color blancuzco transparente. Seguidamente, se retiró esta solución y se prosiguió a lavar dos veces las muestras con buffer Z. Esta solución también fue retirada para humedecer las muestras con glicerol 50 %. Finalmente, se obtuvieron imágenes de todas las muestras a través de una cámara acoplada al estereoscopio.

Las fotografías fueron obtenidas mediante un estereoscopio con cámara acoplada y se hizo un análisis visual de expresión de GUS.

#### **4.6 Daño mecánico**

El daño mecánico de las plantas T2 de 21 días de edad se realizó con pinzas de corte, rasgando de dos a tres hojas, tratando de no desprenderlas de la planta. Las plantas fueron incubadas en X-Gluc, conservándolas en glicerol para su análisis visual de expresión de GUS en el estereoscopio, siguiendo la misma metodología descrita para los ensayos de daño por herbivoría.

#### **4.7 Análisis de expresión de GUS mediante localización histoquímica**

El análisis de expresión de GUS, se midió de forma cualitativa, comparando plantas que se expusieron a estrés por herbivoría y daño mecánico, incluyendo el tipo WT y las plantas

transformadas únicamente con el vector vacío. Todas ellas fueron analizadas junto con sus respectivos controles. De la misma manera, una planta control positivo fue incubada en X-Gluc en cada uno de los ensayos realizados.

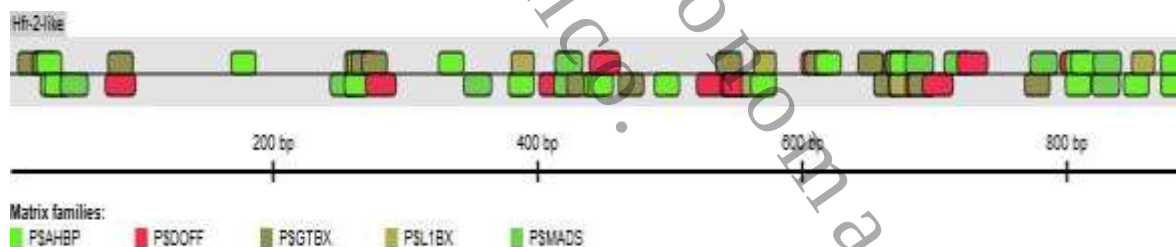
#### **4.8 Ensayos de daño mecánico y por herbivoría en T3**

Partiendo de los procedimientos que se llevaron a cabo en T2 para obtener las transformantes y para su exposición al estrés biótico y abiótico, en T3 se realizaron ensayos con las mismas líneas pero ahora en plantas de 5, 10, 18, 21 y 24 días de edad, evaluando la expresión de GUS a 6 y 24 h después de ser expuestas a estrés. Se utilizaron tres plantas por línea en cada edad y tiempo esperado después de ser expuestas a estrés, con sus respectivos controles. También se utilizaron plantas no transformadas (WT), transformadas con el vector vacío (VV), y el control positivo (C<sup>+</sup>). Sin embargo, en el caso de los ensayos en plantas de 5 y 10 días de edad, éstos se realizaron en de campana de flujo laminar, para evitar contaminación del medio MS. La razón de una discordancia entre el rango de edad en plantas fue por la disponibilidad de las larvas de *M. sexta*, porque se desconocía en qué momento estarían disponibles.

## V RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Analisis de la secuencia del promotor

El análisis *in silico*, llevado a cabo con el programa MATINSPECTOR, arrojó 5 familias de elementos reguladores ubicados en la secuencia de la región promotora del gen *AhHFR*. A modo general, AHBP, DOF, GTBX, L1BX, y MADS, tiene funciones involucradas en la proliferación celular, regulación en la respuesta a estrés, resistencia a patógenos, estrés biótico causado por patógenos, y en el desarrollo de la flor, respectivamente (Smaczniak *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2015; Ilyas *et al.*, 2016; Tanaka *et al.*, 2017; Sheshadri *et al.*, 2018 ). Sin embargo, el análisis mostró que hay un mayor número de reguladores del tipo AHBP y GTBX, involucrados en la proliferación celular y resistencia a patógenos, respectivamente. (Figura 1.).



**Figura 1.** Mapa de la región promotora del gen *AhHFR* de *Amaranthus hyocondriacus*. Los rectángulos con distintos colores, a lo largo de ambos lados de la línea, indican la posición y abundancia de las principales familias de elementos reguladores que controlan la activación del gen. El mapa fue obtenido de un análisis *in silico* en el software MATINSPECTOR de GENOMATIX (Cabrales-Orona, 2017).

Los resultados de este experimento sugieren la posible participación de este gen, en el desarrollo floral, en respuesta a estrés biótico causado por larvas de insectos masticadores, y en ciertas etapas de desarrollo de la planta.

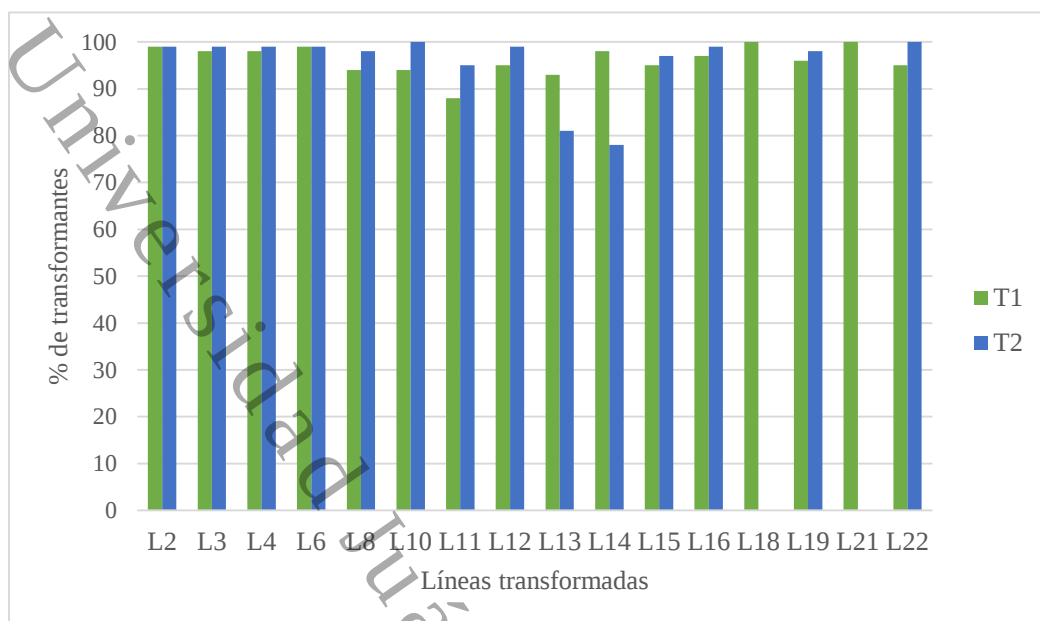
## 5.2 Selección de transformantes de las generaciones T1 y T2

Para seleccionar plantas transformadas con el promotor del gen *AhHFR*, 100 semillas de cada una de las 16 líneas en las generaciones T1 y T2 fueron germinadas y crecidas en medio MS adicionado con Kan, que fue el agente selectivo, durante 10 días. En T1 las líneas con más del 95 % de plantas resistentes a Kan fueron la L2, L3, L4, L6, L12, L14, L15, L16, L18, L21, y L22, y aquellas que obtuvieron un porcentaje por debajo del 95 % fueron L8, L10, L11, L13. En T2, únicamente las líneas L13 y L14 presentaron un porcentaje debajo del 95 %, mientras que las demás se ubicaron arriba de este valor porcentual. Las plantas que no sobrevivieron tuvieron un desarrollo anómalo y apariencia clorótica. Basándose en las leyes de Mendel, en cruza monohíbrida, los descendientes de la T1 son idénticos a uno de los progenitores, mientras que en la T2 se obtiene una proporción cercana a 3:1 (Rodríguez, 2009). En transformantes de *A. thaliana* mediante el método de floral dip se espera el mismo resultado obtenido por Mendel en la T1 y T2 (Weise, 2013). Sin embargo, aunque los resultados de selección obtenidos en este trabajo no concordaron con las dos afirmaciones mencionadas. Esto podría haberse debido a dos factores principales: i) el desconocimiento de la naturaleza del gen como recesivo o dominante, y ii) el gen regulado por este promotor es de función desconocida.

Además de las características de las plantas no resistentes a Kan, se tomó en cuenta aquellas semillas que no germinaron o que no lograron desarrollarse después de haber germinado. Las características que definieron este tipo de plantas fueron su reducido tamaño

y color negro, en contraste con aquellas que conservaron las mismas características de las que sí germinaron. Esto podría estar relacionado a la pérdida de viabilidad de germinación, que está asociada a diversos factores como, el nulo funcionamiento de genes de la dormancia y de la maduración, tales como *leafy cotyledon* y *abscisic acid intensive (abi3)*, que conducen a una gran reducción en la viabilidad de la semilla en plantas de *Arabidopsis* (Clerkx *et al.*, 2004; Sugliani *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha propuesto que la germinación de la semilla es completa solo cuando el contenido de EROS se encuentra dentro de una ventana que permite su señalización. Arriba o debajo de la “ventana oxidativa para la germinación”, bajas o altas cantidades de EROS no podrían permitir el éxito en la germinación (Bailly *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque la acumulación de eventos oxidativos irrumpe la dormancia de la semilla (El-Maarouf-Bouteau *et al.*, 2013), se considera que la oxidación de las semillas está vinculada con la pérdida de viabilidad (Nguyen *et al.*, 2015). Lo anterior podría justificar únicamente el nulo éxito de germinación de las semillas, consideradas en el momento de contar la cantidad de plantas cloróticas.

En la Figura 2, las líneas 18 y 21 no tuvieron datos de germinación en la segunda generación, debido al retardo en el secado de la planta para poder coleccionar las semillas. Por lo que se descartaron.



**Figura 2.** Porcentaje de germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* con el promotor del gen *AhHFR* durante dos generaciones, T1 y T2. La falta de datos de la generación T2 en las líneas 18 y 21 se debió a la pérdida de las semillas durante el proceso de cosecha.

### 5.3 Respuesta a daño mecánico en T2

La expresión del gen reportero GUS fue evaluada 24 h después del daño realizado a una planta por línea seleccionada. Se observó que la expresión de GUS fue más intensa en los peciolo. Mientras que en las plantas control WT y VV, la expresión de GUS se mantuvo reprimida. En este sentido, la respuesta de las plantas puede ser específica para un estímulo en particular (Bonaventure y Baldwin, 2010) aunque en este caso la respuesta fue lo que se esperaba porque podrían haberse mezclado señales asociadas con la activación de la respuesta sistémica como aquellas derivadas de elementos reguladores de proliferación celular que podrían haberse activado en el peciolo. En este sentido, la respuesta manifestada ante este daño es considerada sistémica porque se presenta en un órgano de la planta distinto a donde ocurrió el daño, y no se observó en el sitio dañado por larvas de *M. sexta*. En este sentido, las plantas pueden reconocer productos de su metabolismo (Heil *et al.*, 2012), por

ejemplo los DAMP, característicos de la respuesta sistémica (Akira *et al.*, 2006), los cuales pueden funcionar como señales particulares y podrían expresarse en otros tejidos para activar una respuesta aumentada solo al sufrir un futuro ataque. De este modo evitan la activación directa de mecanismos de defensa, que son costosos energéticamente (Heil y Ton, 2008). Por otro lado, la planta puede usar este mecanismo para evitar la infección a través de las heridas (que son una entrada y fuente de nutrimentos para patógenos) que podrían dañar otros órganos de la planta cuando no están preparadas con una respuesta de defensa. Sin embargo, este mecanismo, a diferencia de las estructuras constitutivas de defensa, es energéticamente más costoso, pero las plantas adicionalmente desarrollan mecanismos regulatorios sofisticados para percibir y desencadenar respuesta de defensa solo cuando éstas son requeridas (Bonaventure y Baldwin, 2010; Mithöfer y Boland, 2008). Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta manifestada podría involucrar la participación de alguno de los elementos reguladores GTBX, y DOF de la región promotora del gen *AhHFR*, cuyas principales funciones son regulación de la resistencia a patógenos, y de las respuestas de defensa, respectivamente. En otro trabajo, en el cual se analizó la función de los genes *CHS7* y *CHS8* de soya, implicados en la síntesis de flavonoides e isoflavonoides (Yi *et al.*, 2010), se detectaron, también, elementos reguladores del tipo GTBX y DOF en su región promotora lo que refuerza la posibilidad de que estos elementos están implicados en estímulos a respuestas ambientales, que involucran frecuentemente situaciones de estrés.

### **5.3 Respuesta a herbivoría por larvas de insectos masticadores en plantas T2**

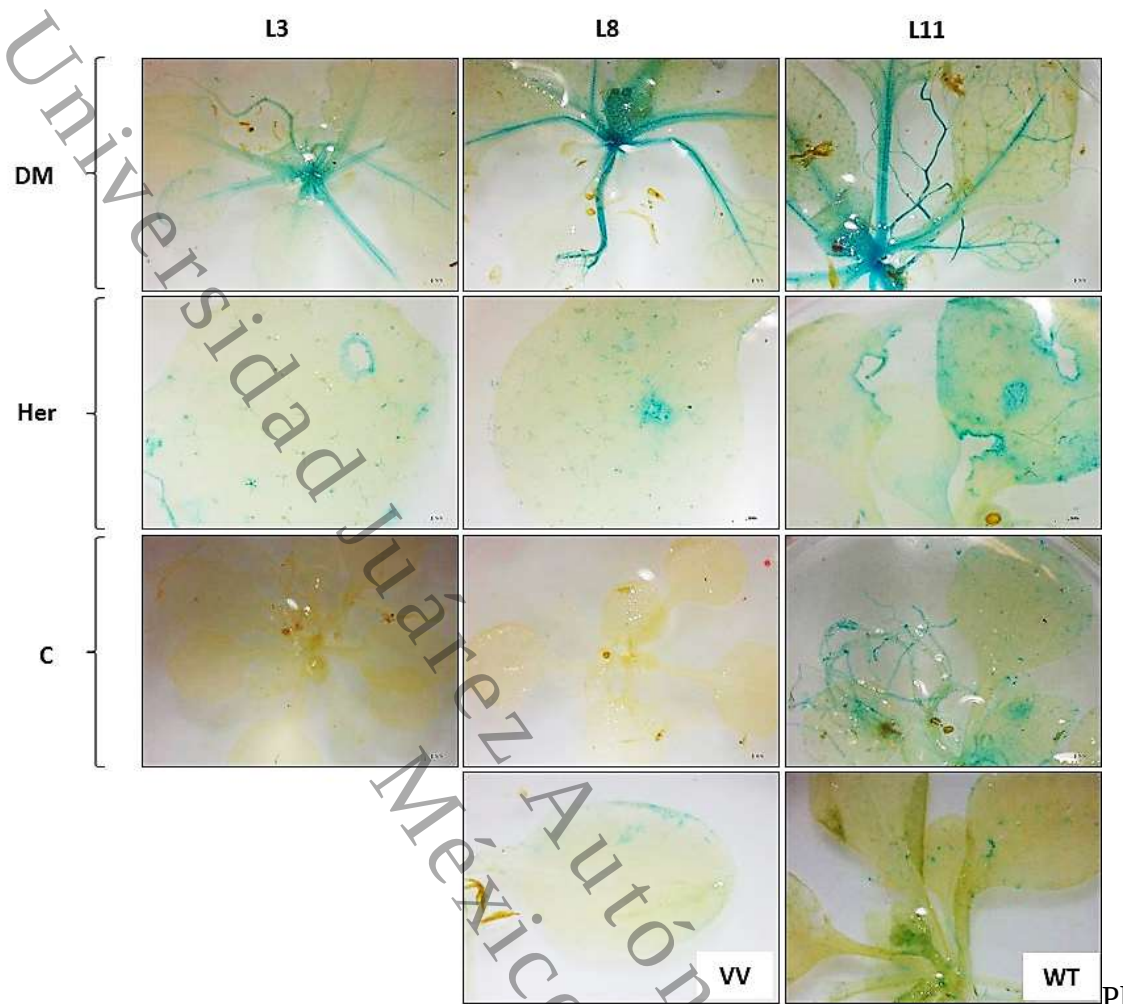
En la generación T2 de 21 días de edad, la expresión del gen reportero GUS fue observada en el borde del área dañada por la larva *M. sexta* a las 24 h (Figura 3). Después del daño causado por insectos, se desencadenaron algunas de las siguientes señales: i) aumento en el

flujo de iones a través de la membrana plasmática; ii) un colapso de la integridad de la membrana celular cerca de la zona dañada, (Maffei *et al.*, 2004); iii) activación de cascadas de cinasas (Wu *et al.*, 2007), y iv) la generación de EROS (Maffei *et al.*, 2006). Estas señales de defensas localizada se generan en el sitio de ataque y son restringidas al tejido dañado de la hoja (Mithöfer y Boland, 2008), lo que podría explicar la activación de la región promotora en el sitio dañado con larvas de *M. sexta*, como consecuencia del reconocimiento de factores de transcripción capaces de interactuar con elementos reguladores pertenecientes a las familias GTBX, DOFF, y L1BX, respectivamente, presentes en el promotor estudiado.

Contrariamente, la activación de genes y la consumación de cambios metabólicos pueden ocurrir horas después de la respuesta al estrés por daño de la larva, retraso que puede deberse a mecanismos represores causados por patógenos presentes en el insecto mediante una forma de una interacción mutualista con microorganismos (Maffei *et al.*, 2007). Aunque GTBX se activa ante la presencia de patógenos, no se descarta la posibilidad de la presencia de bacterias en la saliva de las larvas de *M. sexta*, las que podrían ser las responsables de reprimir la respuesta de defensa en *A. thaliana*. En este sentido, Chung *et al.*, (2013) sugirieron que la presencia de bacterias de géneros como *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Sphingobacterium*, y *Pseudomonas sp.* presentes en secreciones orales del escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) disminuyó la respuesta de genes de defensa dependientes de AJ como *CysPI* y *PPOF/B*, codificantes de un inhibidor de cisteína proteasas y polifenoloxidasas, respectivamente. De igual forma, Wang *et al.*, (2017) reportaron esta misma respuesta pero en el gusano cogollero (*Helicoverpa zea*). Más aún, numerosos genes de respuesta de defensa en maíz, fueron reprimidos en mayor grado por el gusano de la raíz

(*Diabrotica virgifera virgifera*) en interacción mutualista con *Wolbachia* sp. en contraste con los individuos libres de esta bacteria (Barr *et al.*, 2010).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



**Figura 3.** Localización histoquímica de la actividad de GUS activada por daño mecánico y larvas de *Manduca sexta*.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* de 21 días de edad expresantes del promotor *pAhHFR* posterior a la tinción histoquímica con  $\beta$ -glucuronidasa. En la parte superior de la figura se encuentran las plantas sometidas a daño mecánico (DM) y herbivoría (Her) por larvas de *Manduca sexta*. Sus respectivos controles se muestran en la tercera fila (C). Mientras que en la parte inferior se muestran plantas de *A. thaliana* expresantes del pFAST04 (vector vacío, VV) y plantas silvestres no transformadas (WT), sometidas a daño mecánico y herbivoría.

En la Figura 4 se observa que en las plantas T2, la expresión del gen reportero GUS se mantuvo activada en anteras (plantas de 25 y 28 días de edad) y en toda la flor (plantas de 32 días de edad). Esto podría coincidir con la función de uno de los elementos reguladores

tipo MADS (Figura 1), relacionados con el desarrollo floral (Smaczniak *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2017).

Sin embargo, debe mencionarse que el análisis de la expresión de GUS en plantas T2 no fue analizada partiendo de un diseño experimental, sino como parte de análisis previos para adecuar el protocolo a las condiciones apropiadas. De todas formas, todas las plantas que fueron seleccionadas, de forma aleatoria y, una por cada línea, mostraron expresión de GUS en estos tejidos cuando fueron sometidas a estrés.



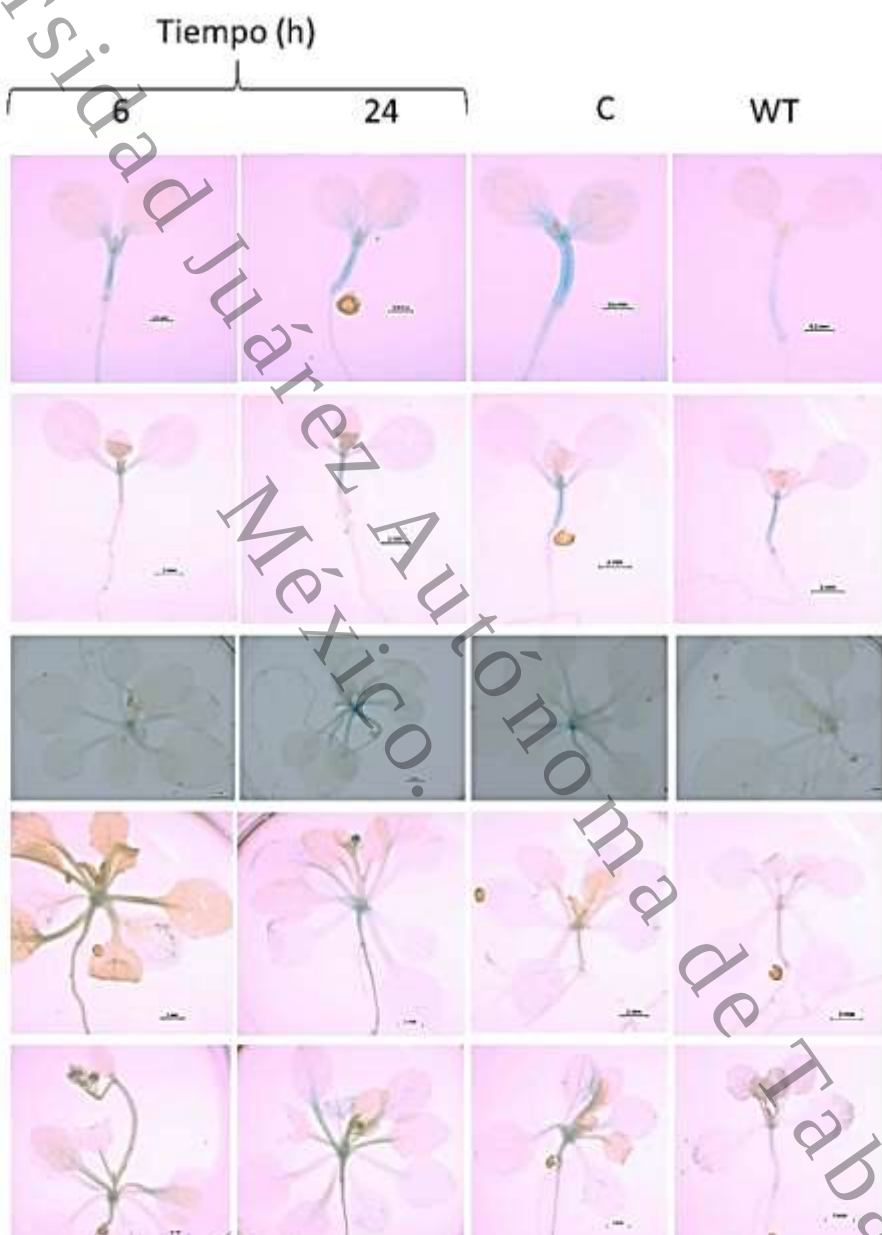
**Figura 4.** Localización histoquímica de la actividad de GUS en inflorescencia de *A. thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* expresantes del promotor *pHER* a los 25 (**a**), 28 (**b**) y 32 (**c**) días de edad sin exponer a ningún tipo de estrés, posterior a la tinción histoquímica  $\beta$ -glucoronidasa.

#### 5.4 Expresión de GUs por daño mecánico y herbivoría por insectos en plantas T3

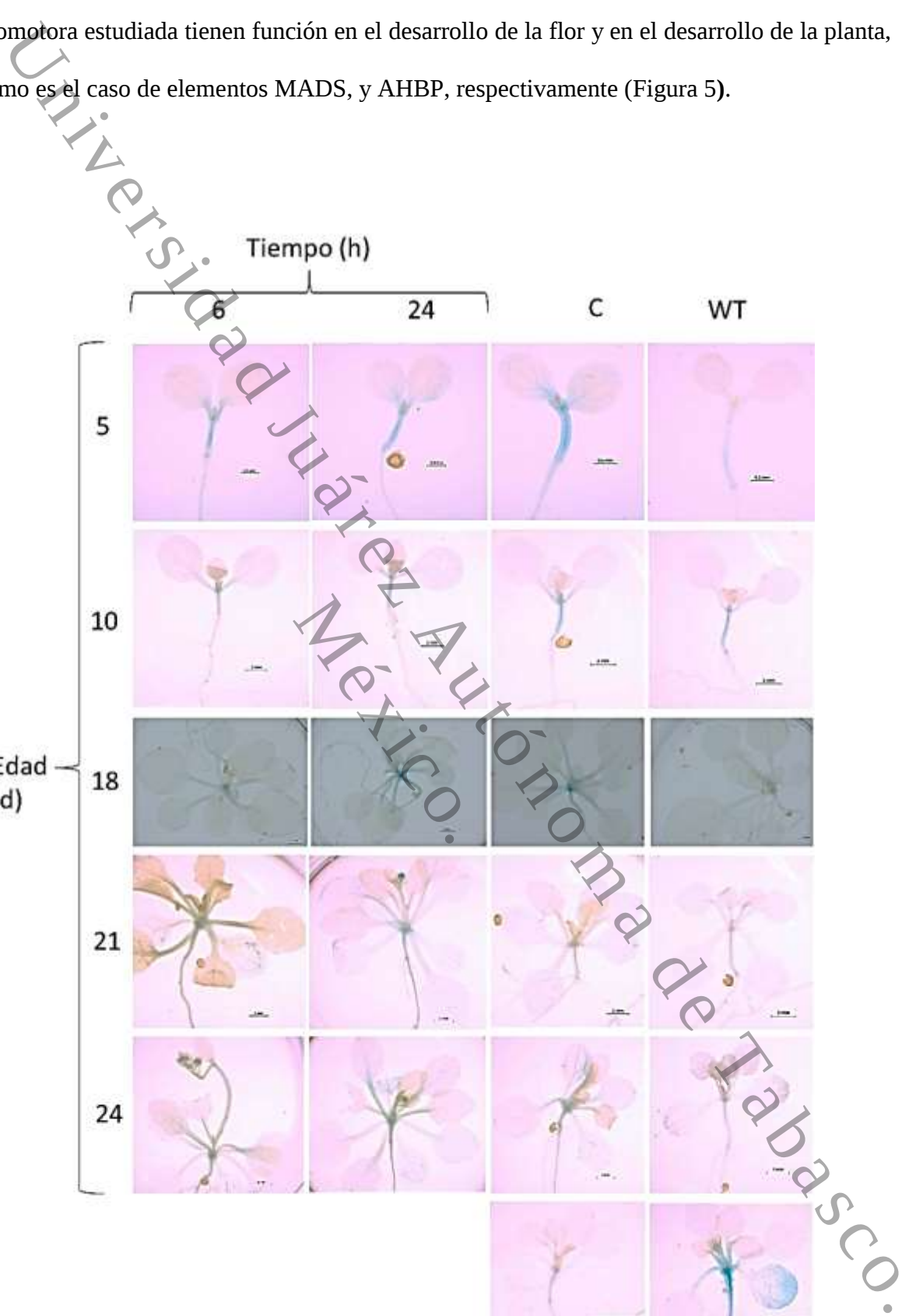
La respuesta, tanto al daño causado de forma mecánica como el causado por larvas de *M. sexta* en *A. thaliana*, se mantuvo reprimida en todas las plantas T2 de distintas edades y analizadas 6 y 24 h posterior a su exposición a estrés. Sin embargo, en plantas de 5 días de edad junto con el control proveniente de cada línea, se observó expresión de GUS en el tallo y meristemo apical, mientras que en plantas de 10 días, la expresión fue poco notable, activándose nuevamente en plantas de 18 y 24 días de edad en el meristemo apical y botones florales. Esto último concuerda con el hecho de que elementos reguladores de la región

omotora estudiada tienen función en el desarrollo de la flor y en el desarrollo de la planta, como es el caso de elementos MADS, y AHBP, respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Efecto de la edad y el tiempo en la expresión de *AtMADS1* y *AtAHBP1* en Arabidopsis. Se muestran imágenes de flores y plantas de Arabidopsis en diferentes etapas de desarrollo (5, 10, 18, 21, 24 días) y en diferentes tiempos de exposición (6 y 24 horas). Las imágenes están organizadas en una cuadrícula de 5 filas (edad) y 4 columnas (tiempo). Las columnas están etiquetadas como C (Control) y WT (Wild Type). Las imágenes muestran la expresión de *AtMADS1* (columnas 1 y 2) y *AtAHBP1* (columnas 3 y 4) en las flores y plantas. Las imágenes de flores muestran la expresión de *AtMADS1* y *AtAHBP1* en los pétalos y sépalos. Las imágenes de plantas muestran la expresión de *AtMADS1* y *AtAHBP1* en los tallos y raíces. Las imágenes de flores y plantas de WT muestran una expresión normal de *AtMADS1* y *AtAHBP1*. Las imágenes de flores y plantas de *AtMADS1* y *AtAHBP1* muestran una expresión alterada de *AtMADS1* y *AtAHBP1*.



| Edad (d) | Tiempo (h) |    | C | WT |
|----------|------------|----|---|----|
|          | 6          | 24 |   |    |
| 5        |            |    |   |    |
| 10       |            |    |   |    |
| 18       |            |    |   |    |
| 21       |            |    |   |    |
| 24       |            |    |   |    |



**Figura 5.** Expresión del *pAh-Hfr:GUS-GFP* en *Arabidopsis thaliana*.

La actividad de GUS fue analizada en plantas T3 de distintas edades a 6 y 24 h después de su exposición a los dos tipos de estrés. Cada grupo de plantas identificadas por edades (5, 10, 18, 21, 24) cuenta con su respectivo control proveniente de la línea (C), y su control tipo silvestre (WT). En la parte inferior se encuentran las plantas controles: VV, Vector Vacío; y, C<sup>+</sup>, Control positivo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## VI CONCLUSIONES

En plantas T2, el promotor AhHFR en *Arabidopsis thaliana* se activó tanto por daño mecánico como por herbivoría por larvas de *Manduca sexta*. También se expresó durante todo el desarrollo floral de las plantas, con y sin estrés, en pétalos y anteras. El primer tipo de estrés fue expresado en los bordes del sitio dañado por las larvas, mientras que el daño mecánico ocasionado con pinzas se expresó en los peciolo y meristemas apicales de las plantas.

En los experimentos llevados a cabo con *Arabidopsis* T3, los resultados no mostraron diferencia de expresión de GUS comparado con los controles, indicando que en esta generación la región promotora se mantiene inactiva durante la aplicación de estrés externo. En cambio, sí se activó durante el desarrollo de la inflorescencia, en pétalos y anteras.

Los resultados inesperados obtenidos en T3, hacen necesario realizar un análisis por PCR tiempo real para confirmar la inserción del promotor AhHFR.

## VII PERSPECTIVAS

Las regiones promotoras capaces de responder a estímulos en espacio y tiempo (principalmente de plantas poco domesticadas o silvestres) son muy importantes para su uso en biotecnología, principalmente en el mejoramiento de cultivos agrícolas. En este mismo sentido, es necesario evaluar si la integración al azar del constructo del promotor en eventos de transformación independiente puede resultar en una gran variabilidad de expresión, debido al efecto y pérdida del potencial de regulación mediada por la modificación de la cromatina, patrones de metilación en el ADN, y eventos de recombinación. Lo anterior es indispensable para poder explicar los efectos contrastantes observados en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y en amaranto.

Por otro lado, debido a la ausencia de secuencias homologas del promotor en *Arabidopsis*, sería interesante evaluar, a través de genómica comparativa entre *Arabidopsis* y Amaranto, si existen los factores de transcripción homólogos y determinar cuáles de estos interactúan con las regiones promotoras de este gen en *Arabidopsis* y Amaranto, respectivamente.

## VIII REFERENCIAS

Abeles, F. B., Morgan, P. W., y Saltveit, M. E. (2012). Ethylene in Plant Biology: Second Edition. Ethylene in Plant Biology: Second Edition. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-03226-7>

Acevedo, F. E., Rivera-Vega, L. J., Chung, S. H., Ray, S., y Felton, G. W. (2015). Cues from chewing insects - the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 86. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.029>

Akira, S., Uematsu, S., y Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

Allsopp, P. G., y Cox, M. C. (2002). Sugarcane clones vary in their resistance to sugarcane whitegrubs. *Australian Journal of Agricultural Research*, 53, 1111–1136. <https://doi.org/10.1071/AR02035>

Anderson, J. T., y Mitchell-Olds, T. (2011). Ecological genetics and genomics of plant defences: Evidence and approaches. *Functional Ecology*, 25, 312–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01785.x>

Arnaud, D., y Hwang, I. (2015). A sophisticated network of signaling pathways regulates stomatal defenses to bacterial pathogens. *Molecular Plant*, 8, 566–581. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.012>

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., y Blackshaw, S. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.

Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., y Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>

Baldwin, I. T. (2001). An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology*, 127, 1449–1458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743088>

Baxter, A., Mittler, R., y Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1229–1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>

Bell, R. A., y Joachim, F. G. (1976). Techniques for Rearing Laboratory Colonies of Tobacco Hornworms and Pink Bollworms<sup>1</sup>. *Annals of the Entomological Society of America*, 69, 365–373. <https://doi.org/10.1093/aesa/69.2.365>

Belton, P. S., y Taylor, J. R. N. (2002). *Pseudocereals and Less Common Cereals*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-09544-7>

Benfey, P. N., y Chua, N. H. (1990). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* (New York, N.Y.), 250, 959–966. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.959>

Benková, E., y Hejácíko, J. (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology*, 69, 383–396. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9393-6>

Berg, D. E., Davies, J., Allet, B., y Rochaix, J. D. (1975). Transposition of R factor genes to bacteriophage  $\lambda$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3628–3632. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3628>

Béziat, C., Kleine-Vehn, J., y Feraru, E. (2017). Histochemical Staining of  $\beta$ -Glucuronidase and Its Spatial Quantification. 73–80, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6469-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6469-7_8)

Block, A., Christensen, S. A., Hunter, C. T., y Alborn, H. T. (2018). Herbivore-derived fatty-acid amides elicit reactive oxygen species burst in plants. *Journal of Experimental Botany*, 69, 1235–1245. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx449>

Boege, K., y Marquis, R. J. (2005, August). Facing herbivory as you grow up: The ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.05.001>

Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., y De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 9452–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000675107>

Bonaventure, G. (2012). Perception of insect feeding by plants. *Plant Biology*. 14, 872–880. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00650.x>

Bonaventure, Gustavo, y Baldwin, I. T. (2010). Transduction of wound and herbivory signals in plastids. *Communicative and Integrative Biology*, 3, 313–317. <https://doi.org/10.4161/cib.3.4.11834>

Boursiac, Y., Lérán, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G., y Lacombe, B. (2013). ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science*, 18, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.007>

Brenner, D. M., Baltensperger, D. D., Kulakow, P. A., Lehmann, J. W., Myers, R. L., Slabbert, M. M., y Sleugh, B. B. (2010). Genetic Resources and Breeding of *Amaranthus*. *Plant Breeding Reviews* (pp. 227–285). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470650172.ch7>

Broekgaarden, C., Snoeren, T. A. L., Dicke, M., y Vosman, B. (2011). Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 819–825. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00635.x>

Bruce, T. J. A., Aradottir, G. I., Smart, L. E., Martin, J. L., Caulfield, J. C., Doherty, A., y Pickett, J. A. (2015). The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defence. *Scientific Reports*, 5, 11183. <https://doi.org/10.1038/srep11183>

Bruce, T. J., y Pickett, J. A. (2007). Plant defence signalling induced by biotic attacks. 10, 387-392. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 387-392. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.002>

Cabralles Orona, G. (2017). Análisis de genes de función desconocida de multiples condiciones de estrés. *Cinvestav*.

Cai, X. T., Xu, P., Zhao, P. X., Liu, R., Yu, L. H., y Xiang, C. Bin. (2014). Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nature Communications*, 5, 5833. <https://doi.org/10.1038/ncomms6833>

Chalfie, M., Tu, Y., Ghia Euskirchen, Ward, W. W., y Pracher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for. *Science*, 263, 802–805.

Chandler, J. W. (2009). Auxin as compère in plant hormone crosstalk. *Planta*, 231, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1036-x>

Chen, Y. H., Gols, R., y Benrey, B. (2015). Crop domestication and its impact on naturally selected trophic interactions. *Annual Review of Entomology*, 60, 35–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020601>

Choi, W.-G., Miller, G., Wallace, I., Harper, J., Mittler, R., y Gilroy, S. (2017). Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca<sup>2+</sup>, ROS and electrical signals. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 90, 698–707. <https://doi.org/10.1111/tpj.13492>

Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, y Y., Stacey, G. (2014). Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science*, 343, 290–294. <https://doi.org/10.1126/science.343.6168.290>

Clerkx, E. J. M., Blankestijn-De Vries, H., Ruys, G. J., Groot, S. P. C., y Koornneef, M. (2004). Genetic differences in seed longevity of various Arabidopsis mutants. *Physiologia Plantarum*, 121, 448–461. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00339.x>

Clough, S. J., y Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 16, 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., y Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11, 163 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>

Deihimi, T., Niazi, A., Ebrahimi, M., Kajbaf, K., Fanaee, S., Bakhtiarizadeh, M. R., y Ebrahimie, E. (2012). Finding the undiscovered roles of genes: An approach using mutual ranking of coexpressed genes and promoter architecture-case study: Dual roles of thaumatin like proteins in biotic and abiotic stresses. *SpringerPlus*, 1, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-30>

Dempsey, D. A., y Klessig, D. F. (2012). SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>

Derksen, H., Rampitsch, C., y Daayf, F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 207, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.004>

Dutt, M., Dhekney, S. A., Soriano, L., Kandel, R., y Grosser, J. W. (2014). Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research. Nature*, 1, 14047. Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.47>

El-Maarouf-Bouteau, H., Meimoun, P., Job, C., Job, D., y Bailly, C. (2013). Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00077>

Erb, M., y Reymond, P. (2019). Molecular interactions between plants and insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910>

Figueiredo, A. S. T., Resende, J. T. V., Morales, R. G. F., Gonçalves, A. P. S., y da Silva, P. R. (2013). The role of glandular and non-glandular trichomes in the negative interactions between strawberry cultivars and spider mite. *Arthropod-Plant Interactions*, 7, 53–58. <https://doi.org/10.1007/s11829-012-9218-z>

Gorman, C. M., Moffat, L. F., y Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2, 1044–1051. <https://doi.org/10.1128/mcb.2.9.1044>

Gouhier-Darimont, C., Schmiesing, A., Bonnet, C., Lassueur, S., y Reymond, P. (2013). Signalling of *Arabidopsis thaliana* response to *Pieris brassicae* eggs shares similarities with PAMP-triggered immunity. *Journal of Experimental Botany*, 64, 665–674. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers362>

Graham, J., Hackett, C. A., Smith, K., Karley, A. J., Mitchell, C., Roberts, H., y O'Neill, T. (2014). Genetic and environmental regulation of plant architectural traits and opportunities

for pest control in raspberry. *Annals of Applied Biology*, 165, 318–328. <https://doi.org/10.1111/aab.12134>

Gribble, G. W. (2003). The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere*, 52, 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00207-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00207-8)

Gupta, S., Malviya, N., Kushwaha, H., Nasim, J., Bisht, N. C., Singh, V. K., y Yadav, D. (2015). Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. *Planta*, 241, 549–562. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2239-3>

Halitschke, R., y Baldwin, I. T. (2004). Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23, 238–245. <https://doi.org/10.1007/BF02637264>

Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., y Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation, *Plant Methods*, 2, 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>

Heil, M. (2012). How Plants Sense Wounds: Damaged-Self Recognition Is Based on Plant-Derived Elicitors and Induces Octadecanoid Signaling. *Plos One*, 7, 30537. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0030537>

Heil, M., Ibarra-Laclette, E., Adame-Álvarez, R. M., Martínez, O., Ramirez-Chávez, E., Molina-Torres, J., y Herrera-Estrella, L. (2012). How Plants Sense Wounds: Damaged-Self Recognition Is Based on Plant-Derived Elicitors and Induces Octadecanoid Signaling. *PLoS ONE*, 7, 30537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030537>

Heil, M., y Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*, 13, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.03.005>

Heil, M. (2014). Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist*, 204, 297–306. <https://doi.org/10.1111/nph.12977>

Heil, M., y Land, W. G. (2014). Danger signals – Damaged-self recognition across the tree of life. *Frontiers in Plant Science*, 5, 578. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00578>

Hernandez-Garcia, C. M., y Finer, J. J. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, 217, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>

Hilker, M., y Meiners, T. (2010). How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 85, 267–280. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00100.x>

Hilker, M., y Meiners, T. (2011). Plants and insect eggs: how do they affect each other? *Phytochemistry*, 72, 1612–1623. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.018>

Howe, G. A., y Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>

Huffaker, A., Pearce, G., Veyrat, N., Erb, M., Turlings, T. C. J., Sartor, R.0 y Schmelz, E. A. (2013). Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5707–5712. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214668110>

Ie, E. V, Wang, W., Vinocur, B., y Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>

Ilyas, M., Naqvi, S. M. S., y Mahmood, T. (2016). In silico analysis of transcription factor binding sites in promoters of germin-like protein genes in rice. *Archives of Biological Sciences*, 68, 863–876. <https://doi.org/10.2298/ABS151116076I>

Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387–405. <https://doi.org/10.1007/BF02667740>

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., y Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6, 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>

Johnson, S. N., Young, M. W., y Karley, A. J. (2012). Protected raspberry production alters aphid-plant interactions but not aphid population size. *Agricultural and Forest Entomology*, 14, 217–224. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2011.00561.x>

Kang, S. G., Price, J., Lin, P.-C., Hong, J. C., y Jang, J.-C. (2010). The arabidopsis bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Molecular Plant*, 3, 361–373. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp115>

Kaur, S., Singh, N., y Rana, J. C. (2010). *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus caudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours. *Food Chemistry*, 123, 1227–1234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.091>

Kazan, K. (2013). Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of Botany*, 112, 1655–1665. <https://doi.org/10.1093/aob/mct229>

Kilian, J., Peschke, F., Berendzen, K. W., Harter, K., y Wanke, D. (2012). Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.09.005>

Koenig, C., Bretschneider, A., Heckel, D. G., Grosse-Wilde, E., Hansson, B. S., y Vogel, H. (2015). The plastic response of *Manduca sexta* to host and non-host plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 63, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.06.001>

Kovalchuk, N., Li, M., Wittek, F., Reid, N., Singh, R., Shirley, y N., Lopato, S. (2010). Defensin promoters as potential tools for engineering disease resistance in cereal grains. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 47–64. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00465.x>

Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., y Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 32, 945–957. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1461-y>

Krasensky, J., y Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1593–1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>

Leitner, M., Boland, W., y Mithöfer, A. (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *The New Phytologist*, 167, 597–606. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01426.x>

Li, N., Li, Z., Fu, Q., Zhuang, P., Guo, B., y Li, H. (2013). Agricultural technologies for enhancing the phytoremediation of cadmium-contaminated soil by *amaranthus hypochondriacus* L. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224, 1673. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1673-3>

Lin, Z., Zhong, S., y Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3311–3336. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>

Li, C., Song, X., Li, G., y Wang, P. (2009). Midgut cysteine protease-inhibiting activity in *Trichoplusia ni* protects the peritrophic membrane from degradation by plant cysteine proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.08.008>

Li, G., Bartram, S., Guo, H., Mithöfer, A., Kunert, M., y Boland, W. (2019). SpitWorm, a herbivorous robot: Mechanical leaf wounding with simultaneous application of salivary components. *Plants*, 8, 318. <https://doi.org/10.3390/plants8090318>

Maffei, M., Bossi, S., Spiteller, D., Mithöfer, A., y Boland, W. (2004). Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on Lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiology*, 134, 1752–1762. <https://doi.org/10.1104/pp.103.034165>

Maffei, M. E., Mithöfer, A., Arimura, G.-I., Uchtenhagen, H., Bossi, S., Berteà, C. M., y Boland, W. (2006). Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide. *Plant Physiology*, 140, 1022–1035. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071993>

Maffei, M. E., Mithöfer, A., y Boland, W. (2007). Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in Plant Science*, 12, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.001>

Major, I. T., y Constabel, C. P. (2006). Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *The New Phytologist*, 172, 617–635. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01877.x>

Mallet, J. (2014). Lepidoptera Taxome Project.:<https://www.ucl.ac.uk/taxome/>

Martin, F., y Kamoun, S. (2012). Effectors in plant-microbe interactions. Wiley-Blackwell.

Martin, T., Wöhner, R., Hummel, S., Willmitzer, L., y Frommer, W. B. (1992). The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-274010-7.50008-2>

McLachlan, D. H., Kopischke, M., y Robatzek, S. (2014). Gate control: guard cell regulation by microbial stress. *The New Phytologist*, 203, 1049–1063. <https://doi.org/10.1111/nph.12916>

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282, 662–682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>

Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y., y Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 727–737. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.727>

Mitchell-Olds, T. (2001). *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 693–700. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02291-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02291-1)

Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., y Karley, A. J. (2016). Plant defense against herbivorous pests: Exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1132. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01132>

Mithöfer, A., y Boland, W. (2008). Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology*, 146, 825–831. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113118>

Mizoi, J., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.08.004>

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Maffei, M. E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76, 612–631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>

Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, y V., Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2, 45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>

Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J. M., García-Casado, y G., Solano, R. (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nature Chemical Biology*, 14, 480–488. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0033-4>

Moran, P. J., y Thompson, G. A. (2001). Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology*, 125, 1074–1085. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.1074>

Neilson, E. H., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., y Møller, B. L. (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science*, 18, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>

Nguyen, T. P., Cueff, G., Hegedus, D. D., Rajjou, L., y Bentsink, L. (2015). A role for seed storage proteins in *Arabidopsis* seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, 66, 6399–6413. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv348>

Noguero, M., Atif, R. M., Ochatt, S., y Thompson, R. D. (2013). The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science*, 209, 32-45. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.016>

Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Höhne, M., y Stitt, M. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 49, 463–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02979.x>

Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., y Salamini, F. (2002). AFLP Analysis of a Collection of Tetraploid Wheats Indicates the Origin of Emmer and Hard Wheat Domestication in Southeast Turkey. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 1797–1801. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004002>

Peiffer, M., y Felton, G. W. (2009). Do caterpillars secrete “oral secretions”? *Journal of Chemical Ecology*, 35, 326–335. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9604-x>

Pinheiro, C., y Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62, 869–882. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>

Potenza, C., Aleman, L., y Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40, 1-22. <https://doi.org/10.1079/IVP2003477>

Provart, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., y Mccourt, P. (2016). 50 years of Arabidopsis research: Highlights and future directions. *New Phytologist*, 209, 921–944. <https://doi.org/10.1111/nph.13687>

Puthoff, D. P., Sardesai, N., Subramanyam, S., Nemacheck, J. A., y Williams, C. E. (2005). Hfr-2, a wheat cytolytic toxin-like gene, is up-regulated by virulent Hessian fly larval feeding†. *Molecular Plant Pathology*, 6, 411–423. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00289.x>

Pyati, P., Chellamuthu, A., Gatehouse, A. M. R., Fitches, E., y Gatehouse, J. A. (2012). Insecticidal activity of wheat Hessian fly responsive proteins HFR-1 and HFR-3 towards a non-target wheat pest, cereal aphid (*Sitobion avenae* F.). *Journal of Insect Physiology*, 58, 991–999. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.05.003>

Qia, Z., Verma, R., Gehring, C., Yamaguchi, Y., Zhao, Y., Ryan, C. A., y Berkowitz, G. A. (2010). Ca<sup>2+</sup> signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 21193–21198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000191107>

Rapp, R. A., Haigler, C. H., Flagel, L., Hovav, R. H., Udall, J. A., y Wendel, J. F. (2010). Gene expression in developing fibres of Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) was massively altered by domestication. *BMC Biology*, 8, 139. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-139>

Ray, S. D. (2017). Ca<sup>2+</sup>, The Miracle molecule in plant hormone signaling during Abiotic stress. *Mechanism of plant hormone signaling under stress*, 2, 45–90. <https://doi.org/10.1002/9781118889022.ch21>

Reese, A. T., Ames, G. M., y Wright, J. P. (2016). Variation in plant response to herbivory underscored by functional traits. *PLoS ONE*, 11, e0166714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166714>

Rejeb, I., Pastor, V., y Mauch-Mani, B. (2014). Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants*, 3, 458–475. <https://doi.org/10.3390/plants3040458>

Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., y Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9, 308–345. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>

Robert, C. A. M., Schirmer, S., Barry, J., Wade French, B., Hibbard, B. E., y Gershenzon, J. (2015). Belowground herbivore tolerance involves delayed overcompensatory root regrowth in maize. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 157, 113–120. <https://doi.org/10.1111/eea.12346>

Romeis, T., y Herde, M. (2014). From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.03.002>

Růžicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., y Benková, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19, 2197–2212. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052126>

Salopek-Sondi, B., Pavlović, I., Smolko, A., y Šamec, D. (2017). Auxin as a Mediator of Abiotic Stress Responses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*, 1–36. <https://doi.org/10.1002/9781118889022.ch1>

Santolamazza-Carbone, S., Sotelo, T., Velasco, P., y Cartea, M. E. (2016). Antibiotic properties of the glucosinolates of *Brassica oleracea* var. *acephala* similarly affect generalist and specialist larvae of two lepidopteran pests. *Journal of Pest Science*, 89, 195–206. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0658-y>

Sasidharan, R., y Voesenek, L. A. C. J. (2015). Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. *Plant Physiology*, 169, 3–12. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00387>

Sauter, A., Davies, W. J., y Hartung, W. (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: The fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1991–1997. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.1991>

Sauter, M. (2013). Root responses to flooding. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.03.013>

Schenborn, E., y Groskreutz, D. (1999). Reporter Gene Vectors and Assays, 13, 29-44. <https://doi.org/10.1385/MB:13:1:29>

Scholz, S. S., Vadassery, J., Heyer, M., Reichelt, M., Bender, K. W., Snedden, W. A., y Mithöfer, A. (2014). Mutation of the arabidopsis calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory. *Molecular Plant*, 7, 1712–1726. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu102>

Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., y Nguyen, H. T. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2343–2351. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh276>

Sheshadri, S. A., Nishanth, M. J., Harita, N., Brindha, P., y Bindu, S. (2018). Comparative genome based cis-elements analysis in the 5' upstream and 3' downstream region of cell wall invertase and Phenylalanine ammonia lyase in *Nicotiana benthamiana*. *Computational Biology and Chemistry*, 72, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.11.004>

Sheshadri, S. A., Nishanth, M. J., Harita, N., Brindha, P., y Bindu, S. (2018). Comparative genome based cis-elements analysis in the 5' upstream and 3' downstream region of cell wall invertase and Phenylalanine ammonia lyase in *Nicotiana benthamiana*. *Computational Biology and Chemistry*, 72, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.11.004>

Shiono, K., Ogawa, S., Yamazaki, S., Isoda, H., Fujimura, T., Nakazono, M., y Colmer, T. D. (2011). Contrasting dynamics of radial O<sub>2</sub> -loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. *Annals of Botany*, 107, 89–99. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq221>

Skirycz, A., e Inzé, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.002>

Solovyev, V. V., Shahmuradov, I. A., y Salamov, A. A. (2010). Identification of Promoter Regions and Regulatory Sites. 57–83, [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6_5)

Stout, M. J. (2013). Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. *Insect Science*, 20, 263–272. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12011>

Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Muiño, J. M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., y Kaufmann, K. (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 1560–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112871109>

Strauss, & Agrawal. (1999). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 179–185. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10322530>

Sugliani, M., Rajjou, L., Clercx, E. J. M., Koornneef, M., y Soppe, W. J. J. (2009). Natural modifiers of seed longevity in the *Arabidopsis* mutants abscisic acid insensitive3-5 (*abi3-5*) and leafy cotyledon1-3 (*lec1-3*). *New Phytologist*, 184, 898–908. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03023.x>

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., y Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203, 32-43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>

TAIR. (2019). TAIR - About *Arabidopsis*.: (<https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp#res>)

Takada, T., Iida, K., Awaji, T., Itoh, K., Takahashi, R., Shibui, y A., Tsujimoto, G. (1997). Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnology*, 15, 458–461. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-458>

Takahashi, H., Yamauchi, T., Nakazono, M., Colmer, T. D., Takahashi, H., Yamauchi, y T, Licausi, F. (2015). Low-Oxygen Stress in Plants. *Plant Cell Monographs*, 21, 247-265. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1254-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1254-0_13)

Tamiru, A., Khan, Z. R., & Bruce, T. J. A. (2015). New directions for improving crop resistance to insects by breeding for egg induced defence. *Current Opinion in Insect Science*, 9, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.011>

Tanaka, Y., Fukuchi-Mizutani, M., y Mason, J. G. (2017). Cloned Genes. Reference Module in Life Sciences (pp. 1–11). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.05043-3>

Tripathi, D., Zhang, T., Koo, A. J., Stacey, G., y Tanaka, K. (2018). Extracellular ATP acts on jasmonate signaling to reinforce plant defense. *Plant Physiology*, 176, 511–523. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01477>

Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. y J., Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 361, 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.aat7744>

Van der Weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E., y Baskin, T. I. (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1555–1562. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.350.1555>

Verma, V., Ravindran, P., y Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 86. <http://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>

Vadassery, J., Reichelt, M., Hause, B., Gershenzon, J., Boland, W., y Mithöfer, A. (2012). CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to Spodoptera herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159, 1159–1175. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198150>

Wang, S., y Hazelrigg, T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, 369, 400–403. <https://doi.org/10.1038/369400a0>

Wang, Z., Cao, G., Wang, X., Miao, J., Liu, X., Chen, Z., y Gu., H. (2008). Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports*, 27, 125–135. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0410-z>

Wain, H. M., Bruford, E. A., Lovering, R. C., Lush, M. J., Wright, M. W., y Povey, S. (2002). Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*, 79, 464-470. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6748>

Waterman, J. M., Cazzonelli, C. I., Hartley, S. E., y Johnson, S. N. (2019). Simulated Herbivory: The Key to Disentangling Plant Defence Responses. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.01.008>

Weise, S. (2013). Selecting Homozygous Transformed Plants, 6–10.

Weisingl, K., Schelp, J., y Kahil, G. (1988). Foreign genes in plants: expression, and applications.

White, C., y Eigenbrode, S. D. (2000). Effects of Surface Wax Variation in *Pisum sativum* on Herbivorous and Entomophagous Insects in the Field. *Environmental Entomology*, 29, 773–780. <https://doi.org/10.1603/0046-225x-29.4.773>

Wu, J., Hettenhausen, C., Meldau, S., y Baldwin, I. T. (2007). Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Cell*, 19, 1096–1122. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049353>

Xu, F., Park, M. R., Kitazumi, A., Herath, V., Mohanty, B., Yun, S. J., y de los Reyes, B. G. (2012). Cis-regulatory signatures of orthologous stress-associated bZIP transcription factors from rice, sorghum and *Arabidopsis* based on phylogenetic footprints. *BMC Genomics*, 13, 497. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-497>

Xu, W., Jia, L., Shi, W., Liang, J., Zhou, F., Li, Q., y Zhang, J. (2013). Absciscic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion. *New Phytologist*, 197, 139–150. <https://doi.org/10.1111/nph.12004>

Yi, J., Derynck, M. R., Chen, L., y Dhaubhadel, S. (2010). Differential expression of CHS7 and CHS8 genes in soybean. *Planta*, 231, 741–753. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1079-z>

Yu, C. P., y Li, W. H. (2017). Predicting transcription factor binding sites and their cognate transcription factors using gene expression data. *Methods in Molecular Biology*, 1629, 271–282. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7125-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7125-1_17)

Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., y Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6523–6528. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6523>

# Funcionalidad del promotor Ah-HFR en respuesta a daño mecánico y herbivoría por larvas de Manduca sexta

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

ÍNDICE DE SIMILITUD

## FUENTES PRIMARIAS

|   |                                                                                                                                                                                  |                     |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1 | <a href="https://ouci.dntb.gov.ua">ouci.dntb.gov.ua</a><br>Internet                                                                                                              | 124 palabras — 1 %  |
| 2 | <a href="https://link.springer.com">link.springer.com</a><br>Internet                                                                                                            | 77 palabras — 1 %   |
| 3 | <a href="https://elifesciences.org">elifesciences.org</a><br>Internet                                                                                                            | 60 palabras — 1 %   |
| 4 | Hundacker, Janik. "Responses of <i>Pinus sylvestris</i> to Different Stages of Infestation by the Sawfly <i>Diprion pini</i> .", Freie Universitaet Berlin (Germany)<br>ProQuest | 33 palabras — < 1 % |
| 5 | Dominic Williams, Alison Karley, Avril Britten, Susan McCallum, Julie Graham. "Raspberry plant stress detection using hyperspectral imaging", Plant Direct, 2023<br>Crossref     | 32 palabras — < 1 % |
| 6 | <a href="https://eprints.whiterose.ac.uk">eprints.whiterose.ac.uk</a><br>Internet                                                                                                | 30 palabras — < 1 % |
| 7 | <a href="https://serval.unil.ch">serval.unil.ch</a><br>Internet                                                                                                                  | 29 palabras — < 1 % |
| 8 | <a href="https://dergipark.org.tr">dergipark.org.tr</a><br>Internet                                                                                                              |                     |

28 palabras — < 1%

9 [escholarship.mcgill.ca](https://escholarship.mcgill.ca)  
Internet

28 palabras — < 1%

10 Maria Ladeynova, Darya Kuznetsova, Anna Pecherina, Vladimir Vodeneev. "pH change accompanying long-distance electrical signal controls systemic jasmonate biosynthesis", Journal of Plant Physiology, 2024  
Crossref

27 palabras — < 1%

11 [bioone.org](https://bioone.org)  
Internet

27 palabras — < 1%

12 [faculty.kaust.edu.sa](https://faculty.kaust.edu.sa)  
Internet

27 palabras — < 1%

13 [peerj.com](https://peerj.com)  
Internet

25 palabras — < 1%

14 [oro.open.ac.uk](https://oro.open.ac.uk)  
Internet

23 palabras — < 1%

15 [rusjphysiol.org](https://rusjphysiol.org)  
Internet

21 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS