

Identificación de una secuencia parcial del gen *NPR1* en *Persea americana* var hass “palto”

Identification of a partial gene sequence in *Persea americana* var *NPR1* hass “palto”

Fátima Zavala de la Cruz¹, Fiorela H. Lujan Gonzales²,
Luis A. Villegas Sánchez³

Recibido: 15 de noviembre de 2015

Aceptado: 30 de noviembre de 2015

Resumen

El gen *NPR1*, denominado también NIM1 (non-inducible immunity 1), codifica una proteína involucrada en Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), resistencia de amplio espectro, en plantas que sobreexpresan una batería de genes (*PR*) relacionadas a patogénesis. *NPR1* es un regulador en la ruta de transducción de señales que inducen el SAR. Investigaciones respecto al secuenciamiento de regiones de este gen en cultivo de palto son nulos. Por tal motivo, se identificó una secuencia parcial del gen *NPR1* de *Persea americana* var hass “palto”. Para el efecto, se extrajo el ADN de hojas tiernas de 43 individuos, se determinó la calidad de éste mediante espectrofotometría y electroforesis, se realizó la amplificación del ADN utilizando el juego de primers *NPR1*-R1, *NPR1*-L2 y 18S, se secuenciaron los fragmentos amplificados y finalmente se comparó con la de otras especies mediante el análisis en BLAST. Los resultados mostraron una

calidad del ADN comprendida entre un valor de 1.4 y 2.6 (A260/A280), siendo 25 muestras las que presentaron valores comprendidos en el rango óptimo de 1.7 a 2.0 con bandas electroforéticas definidas. Con respecto a la amplificación del ADN por PCR, se observó amplificación en 31 muestras y 12 no amplificaron. La ausencia de amplificación probablemente sería por lisis ineficiente debido a la elevada concentración de polisacáridos en la muestra o por posibles alteraciones en la secuencia nucleotídica en la región de anillamiento de los primers. En referencia al secuenciamiento, se logró determinar una región parcial del gen *NPR1* constituida por 420 pb con 100% de similitud con especies vegetales de importancia económica.

Palabras clave: *Persea americana* var. Hass, gen *NPR1*, región parcial.

Abstract

The *NPR1* gene, also called NIM1 (non-inducible immunity1), encodes a protein involved in Systemic acquired resistance (SAR) as a broad-spectrum resistance in plants and which is associated with the upregulation of a battery of pathogenesis-related (*PR*) genes. *NPR1* is a key regulator in the signal transduction pathway that leads to SAR. Molecular researches in sequencing of *NPR1* gen on avocado are null. In this survey a partial sequence of *NPR1* gen from *Persea americana* “avocado” var Hass was identified. DNA from young leaves of 43 plant individuals was extracted and its quality was performed by optical spectrophotometer and horizontal agarose gel electrophoresis. In addition, DNA ampli-

fication using *NPR1*-R1, L2 and 18S-*NPR1* primers was sequenced and the sequenced fragments were compared by BLAST analysis. Results showed that DNA quality values were comprised between 1.4 and 2.6 (A260/A280) from which 25 samples had optimal DNA quality values ranging from 1.7 to 2.0 by contrasting with conspicuous electrophoresis bands. Gene amplification was observed in 31 samples and no amplification in 12. Absence of amplification is probably due to inefficient cell lysis and increased concentrations of polysaccharides in the plant samples, although alterations concerning nucleotide sequences in regions of primers annealing is not discarding. A partial region of *NPR1* gene of

1. Doctora en Biotecnología y Bioingeniería. Docente de la Universidad Nacional de Trujillo.

2. Blga. Estudiante de posgrado de la Universidad Nacional de Trujillo y miembro del Grupo de Investigación de Genética de Poblaciones.

3. Blgo. Estudiante de posgrado de la Universidad nacional de Trujillo.

420 pb and 100% of similarity with other plants species was determined.

Keywords: *Persea americana* var. Hass, *NPR1* gene, gene partial region

I. INTRODUCCIÓN

Persea americana pertenece a la familia Lauráceas, que comprende más de 50 géneros, originada en México, se extendió hasta Venezuela, Ecuador y Perú^{1, 2}. El palto posee valiosas propiedades alimenticias³ y en el Perú, ha experimentado un gran crecimiento, ya que el año 2010 se produjeron 148,900 tn de los cuales 59,4 mil tn se exportaron, convirtiéndose en uno de los cultivos de importancia económica⁴.

Existen diversas variedades de palto, siendo la más importante la variedad Hass, por su buena calidad frente a otras variedades⁵. Sin embargo, existen limitaciones en la producción, generada por diversos factores tanto bióticos como abióticos. Frente a tales factores se recurre a prácticas de manejo químico, cultural y biológico; sin embargo, estos controles no han sido tan efectivos, por lo que se busca contrarrestar las enfermedades utilizando estrategias que no dañen al medio ambiente y minimicen el control químico⁶.

El ADN es la molécula central, dirige la mayor parte de las actividades fundamentales de la célula; para su aislamiento y purificación es fundamental contar con métodos adecuados que permitan la obtención de ADN de excelente calidad⁷. Las técnicas moleculares, tal como la PCR constituyen herramientas que permiten establecer las relaciones filogenéticas⁸, la identificación de especies⁹, búsqueda o creación de variedades resistentes, identificación de secuencias genéticas involucradas con la resistencia, para posterior selección de individuos resistentes¹⁰. La resistencia es la capacidad para impedir o retrasar el desarrollo de un patógeno, dependiendo de la presencia de barreras y la respuesta activa que induce el patógeno¹¹, por lo que su reconocimiento es el paso inicial en cualquier interacción directa planta-microorganismo. Por ello, la resistencia genética es la herramienta que puede encontrar el hombre para la protección de sus cultivos, debido a que se pueden obtener variedades mejoradas que presenten resistencia más duradera¹². Cada planta contiene cientos de genes R (resistencia) específicos para patógenos. En la década actual, se han podido clonar alrededor de 40 genes R en plantas, utilizando técnicas de clonamiento posicional, mutagénesis y mediante amplificación por PCR de dominios conservados. Dichos genes, codifican proteínas R que presentan alta variabilidad en su especificidad, lo que ha permitido a las plantas defenderse frente a la aparición de nuevas razas de patógenos¹³.

Los fitopatógenos provocan daños económicos en

los cultivos a nivel mundial. Por eso, se ha puesto énfasis a la investigación centrada en la capacidad innata de la planta de resistir la invasión por patógenos¹⁴. La capacidad defensiva es dada por un elicitor específico, por el cual las defensas de la planta son activadas. Las dos formas de resistencia son la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (SIR), las cuales se diferencian en la naturaleza del elicitor y las rutas de regulación^{15, 16}.

La identificación de genes reguladores para defensa en plantas, generó evidencia de que estas usan varios mecanismos de defensa para evadir diferentes patógenos. Estos mecanismos son caracterizados por las moléculas de señalización¹⁷. El SAR es una respuesta de defensa duradera que se induce por infecciones localizadas y que le otorga protección a las plantas contra un amplio espectro de patógenos. El gen *NPR1* (non-expressor of PR1) desempeña un papel fundamental en este tipo de resistencia, controla la expresión de genes que codifican a las PR, responde al Ácido salicílico (AS) y al ataque por patógenos, las plantas de algodón que contienen este gen resultan resistentes a cuatro enfermedades fúngicas causadas por los hongos *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Rhizoctonia solani*, y *Alternaria alternata*, así como al nematodo *Rotylenchulus reniformis*¹⁸. La proteína NPR1 se localiza en el citoplasma, estabilizada por puentes disulfuro, teniendo que ser activada por el AS. El NPR1 se disocia a un estado monomérico al reducirse los puentes disulfuro^{19,20} y es transportado al núcleo donde interacciona con factores de transcripción de la familia TGA/OBF bZIP, estos factores de transcripción se unen específicamente a elementos CIS presentes en los promotores de genes *PR-1* en respuesta al AS^{21,22,23}.

Los factores bZIP participan en procesos relacionados con el desarrollo, procesos fisiológicos, anaerobiosis, el ataque de patógenos, la desecación o las fitohormonas²⁴. El *NPR1*, también llamado NIM1 (non-inducible immunity1) es un gen que codifica para una proteína de 65 Kd que contiene repeticiones de ankyrina, por lo que se ha propuesto que *NPR1* interactuaría a través de estas repeticiones. Los factores TGA estarían reconociendo la secuencia TGACG presente en el promotor de genes de defensa como las PR y glutatión-S-transferasa (GST). Mutantes de *NPR1* en que se ha eliminado el dominio ankyrina, pierden la capacidad de unir algunos TGA, por eso los mutantes *NPR1* de *Arabidopsis* son más susceptibles y algunos no son capaces de activar la expresión de genes de defensa *PR*.

Utilizando silenciamiento génico postranscripcional, mediado por virus (VIGS), se determinó que el *NPR1* es un factor esencial para la ruta de defensa mediada por el receptor N en tabacos resistentes al virus del mosaico tabaco, la sobreexpresión del gen

NPR1, bajo un promotor constitutivo (35S del CaMV) aumenta la resistencia a varios patógenos bacterianos.^{25,26,27} Las PR se acumulan en las células durante y después de una infección siendo resistentes a las proteasas. Algunas de las PR poseen actividades tal como de β -1,3-glucanasas (PR-2) y quitinasas (PR-3), su alta expresión tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen β -1,3 glucano y quitina^{28, 29}. Se ha demostrado que la sobreexpresión de *NPR1* en arroz confiere una mayor resistencia frente a la bacteria *Xanthomonas oryzae pv.oryzae*³⁰. El estudio de la expresión del gen *NPR1* puede conducir a la identificación de nuevos componentes y mecanismos importantes para la activación de la respuesta de defensa de la planta³¹. Por lo tanto, existiendo genes como el *NPR1*, que aún cuando sus productos no poseen una actividad antibiótica directa, codifican para proteínas que participan en la señalización de la respuesta defensiva, regulando etapas de la cascada de señalización^{32,33}; habiendo sido identificado en diferentes especies vegetales, tales como *Capsicum annum*³⁴, *Ipomoea batatas*³⁵, *Musa acuminata*³⁶, *Nicotiana glutinosa*³⁷, *Oriza sativa*³⁸, *Populus trichocarpa*³⁹; excepto en *Persea americana* var hass "palto", por lo que se identificó una secuencia parcial del gen *NPR1* en *Persea americana* var hass "palto", lo que en el futuro facilitará la búsqueda de ejemplares genéticamente resistentes a patógenos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. **MATERIAL BIOLÓGICO:** Correspondió a hojas tiernas de *Persea americana* var hass "palto", que fueron recolectados mediante un muestreo aleatorizado simple del fundo Fruzol de la Empresa Agroindustrial Camposol, ubicado en Virú.
2. **MÉTODOS Y TÉCNICAS**

Diseño de primers degenerados: Se realizó tomando en cuenta las secuencias de los genes de interés *NPR1* publicados en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)⁴⁰ de diferentes especies como *musa acuminata*, *ipomoea batatas*, *capsicum annum*, *nicotiana glutinosa*, *oriza sativa*, *populus trichocarpa*; luego las secuencias se guardaron en formato fasta, para realizar un alineamiento múltiple de éstas en el programa mega 5, posteriormente se identificó las regiones altamente conservadas, las que se llevaron al programa primer 3⁴¹.

Tabla N°1. Iniciadores diseñados mediante el programa primer 3 para amplificar una secuencia parcial del gen NPR1 en *Persea americana* var hass "palto".

Primer	Sentido L(Left) R(Right)	Secuencia 5' - 3'
NPR1-L2	L	AACACGTNAAGAGRATACAYAGRGC
NPR1-R1	R	CYCTTCTTTCWGCTTGCTCYA

Extracción de ADN de hojas de *Persea americana* var hass "palto": El ADN fue extraído de hojas tiernas siguiendo el protocolo de extracción de ADN genómico a pequeña escala (CIP 1997, modificado), para lo cual, se colocó en un mortero agregándole nitrógeno líquido y macerándose; luego fueron colocados en un microtubo y se agregó 750 μ l Buffer de extracción CTAB 2X; y 2 μ l de β -mercaptoetanol luego, se incubó a 65°C durante 1 hora. Se agregó 700 μ l de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo agregándose 75 μ l CTAB 10X. Se agregó 700 μ l de cloroformo alcohol isoamílico, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min, se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo; luego se agregó 500 μ l de isopropanol y se incubó a -20°C durante 1 hora. Se decantó el isopropanol. El ADN fue precipitado con 400 μ l de etanol al 70%, se volvió a centrifugar, se eliminó el etanol, se secó el pellet y el ADN fue resuspendido en 50 μ l de buffer TE (10:1) y fue tratado con 1 μ l de ARNasa e Incubado a 37°C en un termostato durante 1 hora.

Determinación de la calidad y cuantificación del ADN de *Persea americana* var hass "palto"

Cuantificación de ADN total: Se realizó mediante el espectrofotómetro con el cual se transfirió 2µl de ADN a un microtubo y se añadió 98 µl de T.E, luego se agregó 100 µl de T.E como una solución blanco a una de las celdas del espectrofotómetro y 100 µl de la muestra a la otra celda y así se determinó la absorbancia de cada muestra.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Preparación de Gel Agarosa 1%: Se pesó 1.2gr de agarosa en una balanza analítica y luego fueron diluidos en 120 ml de TAE. Se llevó al microondas por 1.5 minutos. Se dejó enfriar 20 minutos a T° ambiente. Se agregó 6µl de bromuro de etidio, se homogenizó y se vertió el contenido en un molde. Se dejó solidificar por 30 minutos aproximadamente.

Visualización de bandas electroforéticas: Se tomó 5 µl de ADN genómico y 1µl de 6X DNA Loading-Dye, luego se cargó al gel de agarosa. El corrido electroforético se realizó en cámaras horizontales a 80V durante 30 minutos, se utilizó como tampón de corrida una solución TAE 1X, y se observó en el transiluminador.

Amplificación de la secuencia parcial del gen NPR1 de *Persea americana* var *hass* “palto” por reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se utilizaron primers degenerados NPR1-R1; NPR1-L2; se trabajó en un volumen de 50 µl para cada reacción. Este consistió en mezclar 5 µl de PCR buffer [10X/µl], 6 µl de MgCl2 [25 mM/µl], 1 µl de dNTPs mix [10 mM/µl], 1 µl de primer forward [30 pM/µl], 1 µl de primer reverse [30 pM/µl], 34.75 µl de agua ultra pura, 0.25 µl de taq DNA polimerasa [5 U/µl] y 1µl de ADN; en efecto, se siguió el mismo procedimiento para 18S (control interno), control negativo. La amplificación se realizó en un termociclador y las condiciones del programa fueron 95 °C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 40 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos seguido de una extensión de 72°C por 9 minutos, finalmente a 4°C.

Electroforesis de la secuencia parcial del gen *NPR1*: Se realizó en un gel de agarosa al 1,5% en un buffer TAE 1X corrido a 80 voltios durante 45 minutos. Se utilizó marcador de peso molecular (100 pb) al igual que controles positivos (18S) y negativos. Estos geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV y documentados mediante un fotodocumentador Biorad® Modelo Universal Hood I

Preparación de la muestra para la secuenciación: Los productos obtenidos de la amplificación fueron diluidos en agua ultrapura a una concentración de 1/10, 1/6; luego, fueron enviados para el secuenciamiento respectivo, a la compañía MacroGen Corp, en Maryland, E.U.A. Los resultados fueron remitidos vía correo electrónico en formato pdf. La lectura y análisis de las secuencias se realizaron con los programas Blast Nucleotide and National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla N°2: Valores de pureza de ADN extraídas de hojas de *Persea americana* var *hass* “palto” obtenidos por espectrofotometría expresadas en la razón de absorbancia 260/280

Muestra	Ratio	Muestra	Ratio
1	2.17	23	2.17
2	2.40	24	1.96
3	2.52	25	1.81
4	2.52	26	1.93
5	1.40	27	1.90
6	1.60	28	1.88
7	2.29	29	1.99

8	2.26	30	1.98
9	2.20	31	1.97
10	2.66	32	1.85
11	2.00	33	1.86
12	2.00	34	2.00
13	1.98	35	2.43
14	1.86	36	2.00
15	1.89	37	1.63
16	1.97	38	1.75
17	1.60	39	1.95
18	1.66	40	1.83
19	2.57	41	1.86
20	2.40	42	1.86
21	2.33	43	1.93
22	1.65		

Los resultados obtenidos realizados a cada una de las muestras de ADN extraída se muestran en la tabla 2, donde la calidad del ADN estuvo comprendida entre un valor 1.4 y 2.6 (A260/A280). Siendo los individuos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31. 32, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43 los que presentaron valores comprendidos en el rango óptimo de 1.7 a 2.0, lo que reflejaría el buen estado de pureza del ADN, libre de contaminantes celulares⁴³. Pero los individuos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 19, 20, 21, 23 y 35 presentan valores superiores a 2.0, lo que significaría que hay ARN disperso; en tanto las muestras de los individuos 5, 6, 18 y 22 presentan valores inferiores a 1.7; lo

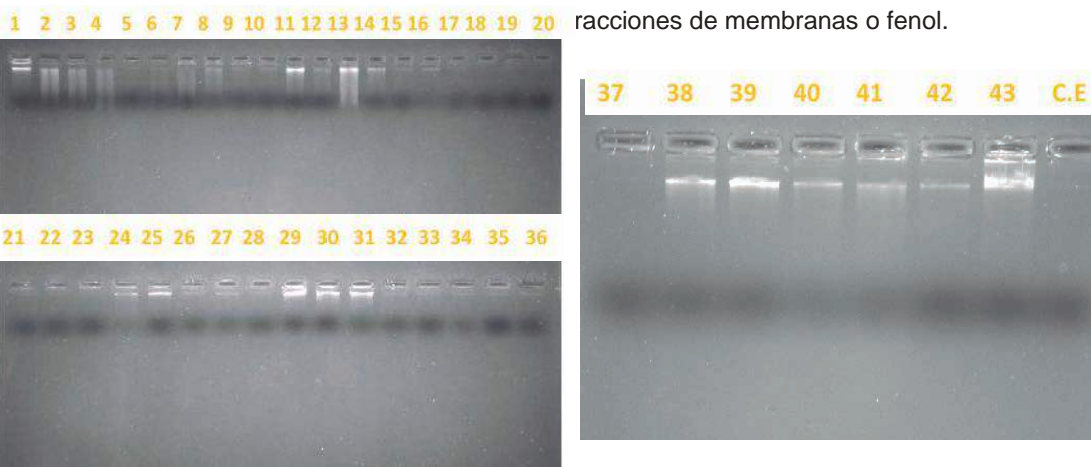


Figura N°1: Calidad de ADN extraído de hojas *Persea americana* var hass "palto" de 43 muestras mediante la técnica de electroforesis en de gel agarosa al 1%. C.E= control de extracción

Se observa el patrón de bandas de ADN de 43 muestras de hojas de *Persea americana* var hass "palto" separados por electroforesis, en donde se muestran bandas definidas, con ausencia de degradación, en los individuos 1, 11, 13, 14, 24, 25, 27, 29, 30, 31, 38, 39, 40, 41, 42 y 43; así también, bandas tenues de los individuos 2,3,4, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 26, 28, 32, 33, 34, 35, 36 y ausencia de bandas en los individuos 5, 6, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 37. Las bandas electroforéticas de ADN con mayor intensidad así como los tenues, está directamente relacionado con la calidad, pues, a mayor tamaño de banda y definición en el gel, entonces la calidad del ADN extraído es mayor; bandas de tamaño pequeño y difuminadas en el gel indican mala calidad del ADN y un alto grado de degradación⁴⁴; lo que se debería a factores que afectan la calidad del ADN como las variaciones del pH, temperatura, actividades nucleasas, errores en la etapa de lisis y en la remoción de contaminantes^{45,46}; es por ello, que diversos autores han resaltado la importancia de la selección de un método adecuado de extracción del ADN para obtener resultados confiables⁴⁷.

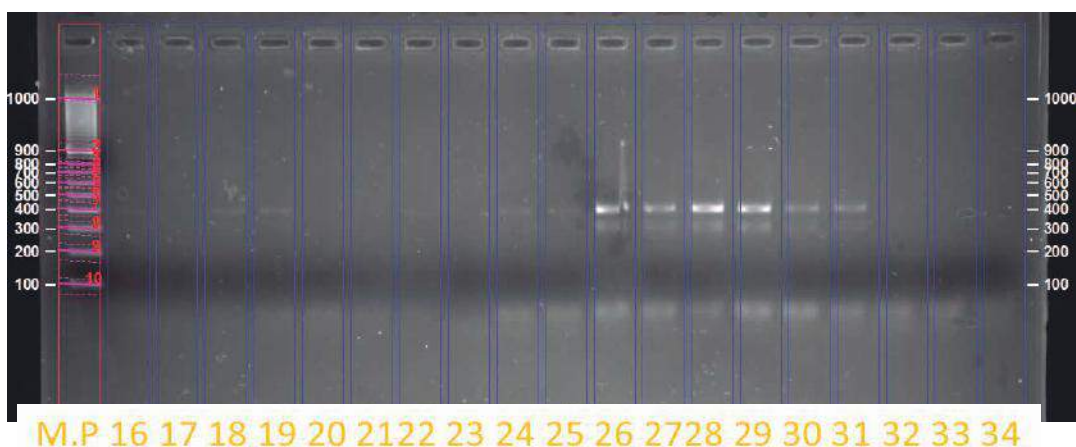
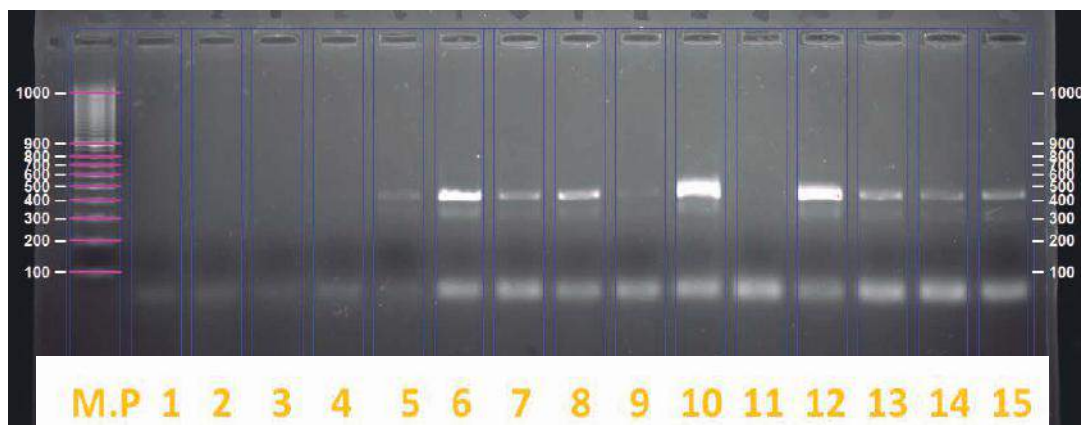


Figura N°2: Amplificación de ADN por PCR con el primer NPR1-R1 , NPR1-L2 y el control interno 18S en un gel de agarosa al 1.5% , MP (marcador de peso molecular 100pb), C.E (control de extracción) , C.N (control negativo) .

Se muestran las bandas electroforéticas de la amplificación del ADN por PCR obtenidas con los juegos de primers NPR1-R1, NPR1-L2 y 18S donde se observa que hubo amplificación del ADN de 31 individuos, de los cuales los individuos 1, 3, 4, 7, 9, 10, 24, 28, 35 y 36 mostraron bandas tenues. También se observó que no amplificó ninguno de los controles negativos. El tamaño de los fragmentos obtenidos estuvo en el rango de 355 y 450 pb. La amplificación de la secuencia parcial del gen NPR1 en *Persea americana* var hass "palto" está determinado por factores como la temperatura de hibridación y el número de ciclos. A elevadas temperaturas se disminuye la estabilidad de la hibridación entre el ADN molde y el primer; en cambio, a bajas temperaturas, ambas moléculas se alinean de manera más estable, pero permite hibridar secuencias que no sean complementarias, lo que proporcionará amplificaciones inespecíficas.⁴⁸ En consecuencia, para evitar resultados negativos debido a inhibiciones de la reacción de amplificación o degradación de la muestra, se introduce un juego de primers 18S que es el gen de la unidad ribosomal 18S que amplifica una región de ADN que está presente en todos los individuos⁴⁹. También se emplean controles negativos, como el control de extracción, que permite evaluar eficiencia en la extracción de ADN y el control de PCR, que, en este estudio, muestra ausencia de bandas en el gel de agarosa, lo que indica la ausencia de contaminación⁵⁰. En la amplificación del ADN por PCR con el juego de primers NPR1-R1, NPR1-L2, mostrado en la figura 2, se observa que las muestras de los individuos 1, 3, 4, 7, 9, 10, 28, 35 y 36 presentan una amplificación disminuida evidenciado por bandas electroforéticas tenues, esto se debería a diversos factores como a la baja estabilidad del ADN, lisis insuficiente de los tejidos, desnaturalización del ADN polimerasa o quelación de los iones magnesio requeridos en la reacción⁵¹. Por otro lado, están los contaminantes procedentes del propio proceso de extracción de ADN que pueden llegar a inhibir las reacciones de PCR.

De otro lado, las bandas electroforéticas bien definidas, con mayor grosor e intensidad de las muestras de los individuos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 40, 41, 42 y 43 (figura 2) evidencian una buena amplificación del ADN la que está relacionada a condiciones adecuadas de los componentes del master mix y a una buena extracción de ADN. Es por ello que la calidad y cantidad de ADN son condiciones indispensables para garantizar la correcta amplificación de la secuencia parcial del gen *NPR1*⁵². La no amplificación del ADN de los individuos 5, 6, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, y 37 que se evidencia por la ausencia de bandas electroforéticas (figura 2) se debería a la falta de material genético por errores en el proceso de la extracción de ADN (figura 1) como es una probable lisis ineficiente debido a la elevada concentración de polisacáridos de la muestra⁵³. La no amplificación del ADN de los individuos 2, 8 y 30 que se evidencia por la ausencia de bandas electroforéticas (figura 2), a pesar de tener material genético (figura 1), probablemente se debería a alteraciones de la secuencia nucleotídica en la región flanqueada por los primers usados en la identificación de la secuencia parcial del gen *NPR1*, lo que conllevaría a la ausencia de anillamiento específico con una consecuente ausencia de amplificación de ADN. Estas alteraciones o mutaciones afectarían a la capacidad inherente de la planta a la resistencia a patógenos, tal como se demostró en *Arabidopsis* en el que se identificó un gen *NPR1* mutante incapaz de activar la expresión de genes de defensa *PR* haciendo a las plantas más susceptibles a patógenos²

```

ACACGTGAAGAGGATACACAGGGCTCTTGATTCTGATGATGTCGAACTATTGAGGATG
TTGCTGAAGGAGGCACCAATTACTTTGGACGATGCATATGCACTGCACTATGCAGTGG
CATATTGTGACTCAAAAGTTACCGCAGAATTCTAGATATCGGGCTTGCTGACGTTAAT
CATAAAAATCCTAGGGGATACACCGTACTCCACTTAGCTGCTATGAGGAGAGACCCTA
AAATCATTGTGTCTCTTCTAACAAAGGGGGCTCGGCCATCGGAGCGCACCTCAGATGG
AAGGAATGCACTTCAAATATCCAAGAGGCTCACCAAGTTTGC GGATTACTACACGCCTA

```

Figura N°3: Secuencia parcial del gen NPR1 en *Persea americana* var *hass* “palto” constituido de 420 pb

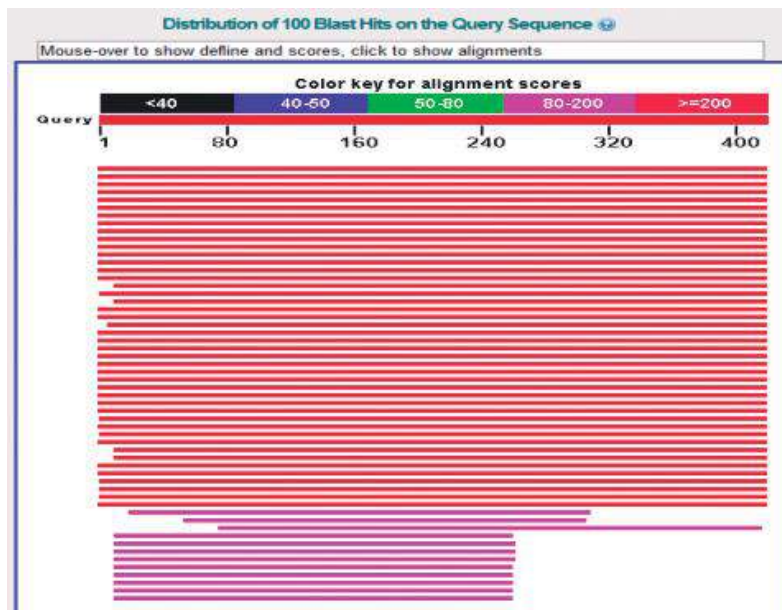


Figura N°4: Similitud de la secuencia parcial del gen *NPR1* de *Persea americana* var *hass* “palto” con los genes *NPR1* de diferentes especies de plantas mediante el análisis del programa Bioinformático BLAST.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_003564809.1	PREDICTED: Brachypodium distachyon regulatory protein NPR1-like	329	329	100%	1e-87	77%	G
XM_002281439.2	PREDICTED: Vitis vinifera regulatory protein NPR1-like (LOC10025	325	325	100%	1e-86	77%	U G M
AM479603.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X072	325	325	100%	1e-86	77%	
AK0272106.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1033BE07, HTC in leaf	320	320	100%	6e-85	77%	U
NM_001247629.1	Solanum lycopersicum non-inducible immunity 1 (NIM1), mRNA >g	320	320	100%	6e-85	77%	U
DQ837210.1	Nicotiana tabacum NPR1 mRNA, complete cds	316	316	100%	7e-84	77%	U
EF441289.1	Nicotiana attenuata NPR1 mRNA, complete cds	307	307	100%	4e-81	76%	
AM900559.1	Capsicum chinense partial mRNA for NPR1 protein	302	302	100%	2e-79	76%	
DQ648785.1	Capsicum annuum NPR1 (NPR1) mRNA, complete cds	302	302	100%	2e-79	76%	U
HM117159.1	Theobroma cacao non-expressor of PR1 (NPR1) gene, complete c	293	293	100%	8e-77	75%	
FJ042876.1	Nicotiana glutinosa nonexpressor of PR gene, partial cds	289	289	100%	1e-75	75%	
EU139477.1	Nicotiana glutinosa NPR1 mRNA, complete cds	289	289	100%	1e-75	75%	
AF480488.1	Nicotiana tabacum NPR1 mRNA, complete cds	289	289	100%	1e-75	75%	U
AY530242.1	Carica papaya NPR1 (NPR1) gene, exons 1, 2 and partial cds	280	280	100%	5e-73	75%	
AY548108.1	Carica papaya NPR1 (NPR1) mRNA, partial cds	280	280	100%	5e-73	75%	U
BT066780.1	Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFB0054D21 mRNA, complet	275	275	97%	2e-71	75%	U
NM_001158635.1	Zea mays LOC100285744 (umc1814), mRNA ->gb EU973673.1 Ze	271	271	97%	3e-70	75%	U G
AM050559.1	Hordeum vulgare NH1 gene for NPR1-like 1 protein, exons 1-4	268	268	99%	3e-69	75%	
XM_002514081.1	Ricinus communis Regulatory protein NPR1, putative, mRNA	266	266	100%	1e-68	74%	G
XM_002454966.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	266	266	98%	1e-68	74%	U G
HM921169.1	Oryza sativa Japonica Group cultivar Dongjin putative NPR1-like p	262	262	100%	1e-67	74%	U
DQ450948.1	Oryza sativa (japonica cultivar-group) ankyrin-repeat protein (NP	262	262	100%	1e-67	74%	G
DQ450947.1	Oryza sativa (japonica cultivar-group) ankyrin-repeat protein (NP	262	262	100%	1e-67	74%	U G
NM_001048821.1	Oryza sativa Japonica Group Os01g0194300 (Os01g0194300) mRN	262	262	100%	1e-67	74%	U G
DQ925843.1	Musa acuminata NPR1-like protein (NPR1A) mRNA, complete cds	262	262	100%	1e-67	74%	
AK120715.1	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023002C09, full insert s	262	262	100%	1e-67	74%	U G
AP002537.2	Oryza sativa Japonica Group genomic DNA, chromosome 1, PAC c	262	262	100%	1e-67	74%	
AP002746.2	Oryza sativa Japonica Group genomic DNA, chromosome 1, PAC c	262	262	100%	1e-67	74%	
GU722160.1	Oryza sativa Indica Group cultivar Gui99 ankyrin-repeat protein (I	259	259	100%	2e-66	74%	U
GU722159.1	Oryza sativa Indica Group cultivar Gui99 ankyrin-repeat protein (I	259	259	100%	2e-66	74%	
F0190039.1	Ipomoea batatas regulatory protein NPR1 (NPR1) mRNA, complete	259	259	100%	2e-66	74%	
AY923985.1	Oryza sativa (indica cultivar-group) NPR1-like 1 mRNA, complete	259	259	100%	2e-66	74%	U

La secuenciación de los productos de PCR tiene por objetivo identificar diferencias en la cadena de oligonucleótidos que permita distinguir la especie en estudio, lo que requiere la utilización de programas bioinformáticos, necesarios para la secuenciación de los fragmentos generados por el juego de primers NPR1-R1, NPR1-L2 considerados en este estudio. Dicha secuenciación permitió identificar la secuencia parcial del gen *NPR1* en *Persea americana* var *hass* “palto”, la que se encuentra constituida por 420 pb (figura 3) y que comparativamente es menor al tamaño completamente secuenciados de genes *NPR1* en *Vitis vinifera* (1989 pb)⁵⁴, *Brachypodium distachyon* (1752 pb)⁵⁵, *Nicotiana tabacum* (2027 pb)⁵⁶, *Nicotiana glutinosa* (1935 pb)³⁷, *Nicotiana attenuata* (1767

pb)⁵⁷, *Capsicum annum* (2191 pb)³⁴, *Theobroma cacao* (4880 pb)⁵⁸ y *Oriza sativa* (4279 pb)³⁸. Cuando se comparó esta secuencia parcial del gen *NPR1* en *Persea americana* var hass "palto" con secuencias de otras especies, mediante el programa bioinformático BLAST, se observó la similitud en un 100% con *Vitis vinifera*, *Brachipodium tabacum*, *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annum*, *Nicotiana glutinosa*, *Carica papaya*, *Theobroma cacao*, *Oriza sativa* (figura 4), Por lo tanto las bandas (amplicones) observados realmente correspondieron a la secuencia parcial del gen NPR159.

IV. CONCLUSIONES

La secuencia parcial del gen *NPR1* de *Persea americana* var hass "palto" consta de 420 pb utilizando el juego primers NPR1-R1, NPR1- L2.

La secuencia parcial del gen *NPR1* de *Persea americana* var hass "palto" muestra similitud con los genes *NPR1* de diferentes especies vegetales

V. AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Dra. Zulita Prieto Lara, docente principal de la Facultad de Ciencias Biológicas por haber facilitado las instalaciones del Laboratorio de Genética y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, para el desarrollo de la presente investigación.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tenorio, M. Manual para el cultivo del Palto. CIDAB-SB379.A9-T4m Perú: INICTEL –UNI; 2007.
2. Cronquist, Arthur. Botánica Básica, Editorial Continental. México; 1978.p. 256
3. Vidal Fernández, J. Efecto de factores Físico Químicos sobre la actividad microbiana de la rizósfera del Aguacatero (*Persea americana* Mill) para el control de *Phytophthora cinnamomi* (Rands). [Tesis Doctoral]. México: Universidad de Colima; 2002.
4. Maza y Silipú, S. Estudio de palta en el Perú y el Mundo, Ministerio de Agricultura; 2008 S/E.
5. Sánchez Pérez, J. Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* mill. var. *drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* rands. [Tesis Doctoral]. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH); 2007.
6. Tamayo, J. Enfermedades del Aguacate. Politécnica No. 4 Medellín, mayo- julio de 2007, pp. 51-70.
7. Aguilar Rivera, X. Optimización del protocolo de extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* Instituto tecnológico de Costa Rica-Corporación Bananera Nacional S.A, 2006.
8. Mauricio, J. y Herrera, C. Filogenia bacteriana mediante el análisis del RRNA 16S. Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
9. Llano, G.; E. Álvarez; J. Muñoz; M. Fregene. Identificación de genes análogos de resistencia a enfermedades en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y su relación con la resistencia a tres especies de *phytophthora*. Colombia, Acta Agronómica Vol. 53, N°1 (2004)
10. Rivas, F. Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans* [Tesis Pre-grado]. España: Madrid Escuela politécnica del ejército, 2010.
11. Bernaola, L. Caracterización molecular de la resistencia al tizón tardío en *Solanum paucissec-*

- tum ochoa* (Solanaceae) mediante el uso de la técnica NBS y marcadores para loci candidatos. [Tesis Pregrado]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos; 2008.
12. Colon, L.; Budding, D.; Keizer, P.; Pieters, M. Components of resistance to late blight *P. infestans* in eight South American species. *European Journal of Plant Pathology*; 1995 101:441-456. Kluwer Academic Publisher. Printed in the Netherlands.
 13. Stange, C.; Briceño, E. ; Latorre, B. ; Johnson, P. Interacción planta-patógeno Ediciones Universidad de la Serena, Chile capitulo XIII 2007.
 14. Federspiel, N.; Lammers, A. ; Liu, L.; Bates, S.; Westerlund, C.; Fitch, J. Inventors; Agrinomics LLC. Generation of plants with improved pathogen resistance and drought tolerance. US patenten 7834241. 2010 Nov 16.
 15. Simbaqueba, J. Aplicada mapeo de genes candidatos involucrados en inducción de resistencia sistémica y promoción de crecimiento por *Trichoderma koningiopsis* (th003) en tomate. [Tesis Magistral]. Colombia: Unimilitar ; 2009.
 16. Maleck, K.; Levine, A.; Euglem, T.; Morgan, A.; Schmid, J.; Lawton, A; et. al. The Transcriptome of *Arabidopsis thaliana* Systemic Acquired Resistance. *Nature Genetics* 2000; 26:403-10.
 17. Custers, J. General Introduction: Engineering Disease Resistance in Plants. ISBN 2007; 90-8504-567-3
 18. Hui, C. ; Glazebrook, J. ; Clarke, J. ; Volko and Dong. The *Arabidopsis NPR1* Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *Cell Press* 1997 [Jan10; 88. \(1\)](#):57-63.
 19. Moreno, A. Aplicaciones Biotecnológicas del Gen AFP (Antifungal Protein) de *Aspergillus giganteus* para la protección de plantas frente a infección de patógenos. [Tesis Doctoral]. España: IBMB-CSIC 2006.
 20. Kinkewa, M. ; Fan, W. ; Dong, X. Nuclear Localization of NPR1 is required for Activation of PR gene expression. *The plant cell*, vol 12,2339-2350 2000
 21. Riveros, A. Moléculas señalizadoras involucradas en la Resistencia Inducida en plantas. San José, C.R.(IICA); 2010.p.63-73.
 22. Fan, W. and Dong, X. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002; 14, 1377-89.
 23. Rangel, S.; Castro, M. ; Beltrán, Reyes H y García Pineda E. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, Diciembre 2010; 12(2): 90 – 95.
 24. Nieva, B. Aislamiento y caracterización funcional de dos factores de transcripción bZIP de maíz [Tesis Doctoral] España: Universidad de Barcelona División de Ciencias Experimentales y Matemáticas; 2003.
 25. Stange, C. Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso. *Cien. Inv. Agr.* 2006; 33(1): 3-21.
 26. Dong, X. NPR1 all things considered. *Elservier* 2004, 7:547-552.
 27. Jordán, M.; Casaretto, J.; Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile (2006) 16:06 Capítulo XVI.
 28. Madriz, Ordeñana K. Mecanismo de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo

- integrado de plagas 2002; 63:22-32.
29. Zacarés, L. Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae pv.tomate* [Tesis Doctoral]. España: Universidad Politécnica de Valencia; 2008.
 30. Chern, M.; Fitzgerald, HA.; Canlas, PE.; Navarre, DA and Ronald PC. Overexpression of rice NPR1 homolog leads to the constitutive activation of the defense response and hypersensitivity to light. 2005. Mol. Plant Microbe Interact; 2005 jun; 18(6):511-520.
 31. Diqui, Yu. ; Chunhong, Chen. and Zhixiang, Chen. Evidence for an Important Role of WRKY DNA Binding Proteins in the Regulation of *NPR1* Gene Expression. The Plant Cell; 2001 July, Vol. 13, 1527–1539.
 32. Diaz, R.; Tonello, U.; Martinez, G.; Salazar, S.; Chalfoun, N.; Vellicce, G.; and et al. Aproximaciones biotecnológicas para un manejo sustentable del estrés fúngico en la agricultura. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II 2009 parte V.cap8. p.467-480.
 33. Gil, M. Disección genética del mecanismo de resistencia frente a patógenos biótrosos mediado por el gen *CSB3* en *Arabidopsis thaliana* [Tesis Doctoral]. España: Universidad Politécnica de Valencia; 2005.
 34. Luo, H.; Duan, C.; Chen, B.; Tang, J. and Feng, J. Cloning of full length cDNA of pepper CaNPR1 gene, construction of its RNAi expression vector and its transformation for pepper. College of Life Science and Technology, Guangxi University, 75 Xiuling Road, Nanning, Guangxi 530005, P. R. China ,2006.
 35. Chen, G.; Zhou, Y.; and Pan, D. Cloning of full length cDNA of sweet potato NPR1 gene. Academy of Agricultural Sciences, Beijing College of Life Science, Fujian, 2006.
 36. Endah, R.; Beyene, G.; Kiggundu, A.; Van Den Berg, N.; Schluter, U.; Kunert, K. and Chikwamba, R. Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. Plant Physiol Biochem, 2008; 46 (11), 1007-1014.
 37. Zhang, Y. ; Shi, J. ; Liu, JY. ; Zhan, Y. ; Zhang, JD. and Guo, XQ. Identification of a novel NPR1-like gene from *Nicotiana glutinosa* and its role in resistance to fungal, bacterial and viral pathogens. Plant Biol (Stuttg), 2010;12 (1), 23-34
 38. Feng, JX.; Cao, L.; Li, J.; Duan, CJ.; Luo, XM. ; Le, N. et al; Involvement of OsNPR1/NH1 in rice basal resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Plant Pathol. 2011 Eur. J. 131 (2), 221-235.
 39. Tuskan, GA.; Difazio, S.; Jansson, S.; Bohlmann J, Grigoriev, I. Hellsten, U.; and col, The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) Science 2006; 313 (5793), 1596-1604.
 40. National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide; [fecha de acceso 04 de Marzo del 2012]. URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
 41. Primer 3 (v.0.4.0) Pick primers from ADN sequence [fecha de acceso 10 de Marzo del 2012]. URL disponible en :<http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3/>
 42. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), nucleotide blast [Fecha de acceso 12 de Marzo del 2012]. URL disponible en : [URL:http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/)

43. Huescas, Minerva. Comparación de diferentes técnicas de extracción de ADN aplicadas a *Quercus eduardii* Trel. [Tesis Pregrado] México: Universidad Autónoma Chapingo, 2004.
44. Almeida, I.; Gratero, L.; Osorios, G.; Ramis, C.; Bedoya, A.; Figueroa, R.; Molina, S.; Infante, D. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya sp.*) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro* 23(1): 27-34. 2011.
45. Palacios, D. Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN para la detección de transgénicos en alimentos mediante la tecnología PCR [Tesis Magistral] España: Universidad de Burgos 2008.
46. Solano, F.; Márquez, C.; Schuler, I. Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares; *Universitas Scientiarum*, 2009, Vol. 14 N° 1, 16-22.
47. Andreu, L.; Luna, M. ; López, R. ; *Determinación del método de extracción de ADN óptimo para el desarrollo de la técnica RAPD en megagametófitos de Pinus Hartwegii Lindl.* *Foresta Veracruzana* 2003, año/vol.5, número 001 pp.43-48.
48. Chacón, L.; Barrantes, K.; García, C.; Achí, R. Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2010; 30:18-23.
49. Arango, J. Análisis de expresión de los genes de la ruta biosintética de carotenos, y cuantificación de carotenos en hojas y raíces de plantas de yuca a diferentes edades. [Tesis Pregrado] Colombia: Pontificia Universidad Javeriana 2006.
50. Rodríguez, I.; Barrera, H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención, *Ciencia UANL* vol.VII, n° 3, julio-septiembre 2004.
51. Rodríguez, M. Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (Elisa), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en Foie Gras. [Tesis Doctoral] España: Universidad Complutense de Madrid ISBN: 84-669-2689-5. 2004.
52. Bustamante, J. ; Astudillo, M. ; Pazos, A. ; Bravo, L. Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de Biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 16 N.º 2, 2011 83 – 98.
53. Dorado, G. Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) Severo Ochoa, 2010, 14071-Córdoba.
54. Cabezas, V. ; Parcha, C. ; Pineda, J.; Reyes, E. Standardization of a Technique of Genomic Amplification (PCR) for diagnose of Dermatophites, *Ciencia & Trabajo* año 8 N°22 octubre / diciembre 2006 167/171.