



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



Generación de herramientas para el estudio de DRK362: Una posible proteína quinasa de papa (*Solanum tuberosum*).



Valeria Martínez Moreno

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal.
Licenciatura en Ciencias Biológicas,
profundización en Biología Molecular.
Tesina de grado, diciembre 2009.
Tutor: Dr. Marcos Montesano.

Resumen

Las plantas deben convivir con una variedad de organismos, los cuales pueden ser benéficos, neutrales o patógenos. Cuando las plantas perciben los organismos con los que convive activan inmediatamente mecanismos de señalización para manifestar respuestas adaptativas. Una vez que se establece la interacción entre una planta y un patógeno, el resultado de la misma puede ser la resistencia vegetal o el desarrollo de enfermedad.

Solanum tuberosum es un cultivo de gran importancia a nivel mundial como alimento, con una producción anual cercana a 300 millones de toneladas ocupa el cuarto lugar en volumen en la producción de cultivos mundial. Las plantas de papa se encuentran bajo el ataque de una amplia variedad de organismos patógenos que causan enfermedades, las cuales ocasionan pérdidas anuales en la producción de aproximadamente 21.8%. Esto ha llevado en los países en desarrollo al uso de cantidades considerables de pesticidas los cuales son nocivos para el ambiente y los seres humanos. De aquí, la necesidad de desarrollar nuevas estrategias sustentables para el control de enfermedades, para lo cual es fundamental el estudio de las interacciones planta-patógeno y de las bases moleculares que a estas conciernen.

En el presente trabajo se analiza el gen de la planta de papa que denominamos *Drk362* y se generan herramientas para su estudio. Se pudo establecer la secuencia codificante completa de *Drk362* y los análisis bioinformáticos indican que el mismo codificaría una posible serina/treonina quinasa con una probable señal de localización nuclear. La comparación de secuencias de DRK362 con otras quinasas vegetales, resultados preliminares y los análisis bibliográficos, sugieren que DRK362 estaría involucrada en respuestas de defensa vegetal. Se han generado construcciones para sobreexpresar y silenciar DRK362, las cuales permitirán modular la expresión de este gen en planta. Tales líneas vegetales podrán ser utilizadas para la realización de estudios de genómica funcional.

Índice

Índice.....	1
Abreviaturas.....	2
Introducción.....	3
Interacciones planta-patógeno.....	3
Rol de las proteínas quinasas en la defensa vegetal.....	9
El cultivo de papa y su importancia.....	10
Resultados previos.....	10
Objetivos.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
Materiales y métodos.....	12
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	12
Amplificación de los insertos mediante PCR.....	12
Análisis de los productos de PCR y cuantificación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	13
Purificación de los productos de PCR.....	14
Digestiones.....	14
Extracción de los fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa.....	15
Ligaciones.....	15
Clonado de la construcción de silenciamiento.....	15
Transformación de cepas de <i>E.coli</i> con las distintas construcciones.....	16
Purificación de los plásmidos.....	16
Selección de clones positivos.....	17
Secuenciación y análisis bioinformático.....	17
Transformación de plantas de papa mediada por <i>A.tumefaciens</i>	18
Resultados y discusión.....	20
Secuenciación completa del ADNc <i>Drk362</i> y análisis bioinformático.....	20
Generación de la construcción génica para la sobreexpresión de <i>Drk362</i> en papa (<i>S.tuberosum</i>).....	23
Transformación de plantas de papa mediada por <i>A. tumefaciens</i>	27
Generación de la construcción génica para el silenciamiento de <i>Drk362</i> en papa (<i>S.tuberosum</i>).....	29
Conclusiones y perspectivas futuras.....	34
Bibliografía.....	36
Agradecimientos.....	39

Abreviaturas

ABA.....	ácido abscísico
ADN.....	ácido desoxirribonucleico
ADNc.....	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN.....	ácido ribonucleico
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
EDTA.....	ácido etilendiaminotetracético
ETI.....	<i>Effector-triggered immunity</i>
ETS.....	<i>Effector-triggered susceptibility</i>
HR.....	<i>Hypersensitive response</i>
MAMPs.....	<i>Molecular-associated molecular patterns</i>
MAPK.....	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAMPs.....	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPR.....	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTI.....	<i>Pathogen-triggered immunity</i>
PVY.....	<i>potato virus Y</i>
rpm.....	revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>real time- polymerase chain reaction</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SNRK	<i>sucrose nonfermenting 1 – related protein kinase</i>
SSH.....	<i>suppression subtractive hybridization</i>
T3SS.....	<i>Type 3 secretion system</i>
WAPK	<i>wound- and ABA-induced protein kinase</i>
WIPK	<i>wound-induced protein kinase</i>

Introducción.

En la naturaleza, las plantas están constantemente expuestas a cambios en el ambiente. Para adaptarse a los mismos necesitan integrar múltiples señales externas, muchas de las cuales perciben un estrés. Las pestes y enfermedades ocasionadas por el contacto con una amplia variedad de organismos patógenos como bacterias, virus, hongos y nemátodos son los principales factores de las pérdidas en la producción. Las condiciones para que estas enfermedades ocurran se ven incrementadas por la práctica de la agricultura que se basa en los monocultivos ya que estos poseen una biodiversidad genética más reducida. La estrategia más utilizada para evitar enfermedades en monocultivos es la aplicación de productos químicos tóxicos, los cuales causan importantes daños en el medio ambiente así como en seres humanos. En vista de ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para combatir los factores de estrés biótico, incluyendo programas de mejoramiento genético y generación de cultivos transgénicos resistentes a los patógenos, entre otras. Para la generación de tales estrategias es fundamental el estudio de las interacciones planta-patógeno y de las bases moleculares que a estas conciernen.

Interacciones planta-patógeno

Las plantas deben convivir con una variedad de organismos, los cuales pueden ser benéficos, neutrales o patógenos. Cuando las plantas perciben los organismos con los que convive activan inmediatamente mecanismos de señalización para manifestar respuestas adaptativas. Una vez que se establece la interacción entre una planta y un patógeno, el resultado de la misma puede ser la resistencia por parte de la planta o el desarrollo de enfermedad.

Para explicar la interacción entre plantas y patógenos Harold H. Flor propuso el modelo gen-para-gen basándose en la presencia o ausencia de genes dominantes de resistencia en la planta (genes R) y genes de avirulencia en el patógeno (genes Avr). Estos genes son la base de la resistencia, generalmente conduciendo a la respuesta hipersensible. Según este modelo se establece o no enfermedad dependiendo de la existencia y el reconocimiento de la proteína codificada por el gen dominante R de la planta y la proteína codificada por el gen dominante Avr del patógeno (Flor, 1971). De existir y reconocerse mutuamente dichas proteínas, la interacción se denomina incompatible, no estableciéndose la enfermedad. Mientras que si no existe por lo menos alguno de los genes dominantes complementarios, la enfermedad puede desarrollarse, y la interacción pasa a llamarse compatible (Tabla 1). Luego del mencionado reconocimiento, se desencadena una cascada de transducción de señales que conduce al establecimiento de respuestas de defensa (Staskawicz et al. 1995).

Las proteínas codificadas por los genes R actúan mayoritariamente como receptores directos o indirectos de las proteínas Avr (Staskawicz et al. 1995). Los genes R y sus homólogos generalmente se clasifican dentro de las siguientes clases, según motivos estructurales comunes (Martin et al, 2003; Hammond y Jones, 1997): genes con sitios de unión a nucleótidos (NBS), proteínas serina/treonina quinasa; por ejemplo, el gen Pto de tomate, proteínas con dominio de interacción proteica con repetidos ricos en leucina (LRR); por ejemplo gen cf9 de tomate, genes con homología amino-terminal a genes tipo Toll y receptores de interleuquina 1 (TIR: Toll/IL-1R-like), un ejemplo de

esta familia es el gen L₆ de la planta de lino y proteínas con domino cremallera de leucina (LZ).

<u>Genes del patógeno</u>	<u>Genes de la Planta</u>	
	R	r
Avr	Incompatible, respuesta hipersensible.	Compatible, no resistencia, progresión de enfermedad.
avr	Compatible, no resistencia, progresión de enfermedad.	Compatible, no resistencia, progresión de enfermedad.

Tabla 1: Interacción gen-por-gen entre genes de resistencia de la planta (R) y genes de avirulencia del patógeno (Avr).

Las respuestas de defensa vegetal por lo tanto son controladas directa o indirectamente, por los genes de la planta hospedera y por la interacción con el patógeno. Por lo tanto, la resistencia frente a los mismos puede ser clasificada según el número de genes que estén involucrados. La resistencia a enfermedad que es controlada genéticamente por uno, pocos, o muchos genes, se denomina resistencia real y puede dividirse en dos grupos: **resistencia parcial o poligénica** y **resistencia gen R o monogénica** (Agrios, 2005).

Todas las plantas presentan un cierto nivel de resistencia de amplio espectro frente a cada uno de sus patógenos. Esta resistencia es la denominada parcial o **poligénica**, ya que es controlada por varios genes. Los genes involucrados en este tipo de resistencia controlan varios pasos de procesos fisiológicos en la planta, que conducen a los mecanismos de desarrollo de defensas vegetales. La resistencia poligénica generalmente retarda el desarrollo y la expansión del patógeno.

La resistencia **monogénica**, por otro lado, está controlada por uno o unos pocos genes. Los genes que participan en esta resistencia son los denominados genes R, los cuales han sido descritos previamente. Estos genes son fundamentales en la percepción del patógeno y participan en la expresión de la defensa inducible. La resistencia monogénica es también conocida como resistencia raza-específica, ya que la misma se desarrolla frente a determinadas razas de un patógeno (que contengan el gen Avr específico), mientras que para otras razas del mismo patógeno la planta es susceptible. Este tipo de resistencia tiende a neutralizar y eliminar el patógeno, y se ve generalmente asociada a el desarrollo de una respuesta hipersensible (HR) (Agrios, 2005).

Los mecanismos de defensa desarrollados por las plantas frente a patógenos combinan varias estrategias, las cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos: **defensas constitutivas** y **defensas inducibles**.

Las **defensas constitutivas** involucran barreras estructurales y químicas preexistentes en la planta, y son la primer defensa con la que se encuentra el patógeno antes de invadir la misma. Los diversos patógenos han desarrollado diferentes vías específicas para invadir la planta. Algunos penetran directamente a través de las capas de tejidos superficiales utilizando presión mecánica y/o ataque enzimático, otros lo hacen a través de aberturas naturales como estomas y lenticelas, mientras que otro grupo

solo pueden invadir tejidos vegetales que han sido previamente heridos. En general, las plantas cuentan con barreras físicas y químicas constitutivas para impedir dichas invasiones. La superficie vegetal, la cual el patógeno debe penetrar para causar la infección, es uno de los primeros obstáculos. La misma posee estructuras de defensa para evitar la infección que están presentes incluso antes del primer contacto con el patógeno. Estas estructuras incluyen la cantidad y calidad de la cera y la cutícula que recubren las células epidérmicas vegetales, constituyendo una barrera física contra el organismo invasor. La cera sobre la superficie de hojas y frutos forma una capa hidrofóbica que evita la adsorción de agua restringiendo la penetración de patógenos. Una cutícula gruesa aumenta la resistencia frente a aquellos patógenos que invaden su huésped únicamente por penetración directa. Muchos patógenos que ingresan a través de estomas pueden forzar su entrada si éstos se encuentran cerrados, mientras que algunos patógenos, como la roya del trigo, sólo pueden ingresar sólo cuando los estomas están abiertos. De esta manera, algunas plantas se tornan resistentes a ciertos patógenos dependiendo de la apertura de los estomas durante el día y el momento en el cual germinen los patógenos (Agrios, 2005).

Por otro lado, las plantas producen constitutivamente una serie de metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden actuar como componentes antimicrobianos. Tal es el caso de las saponinas que son moléculas alcaloides glicosiladas con actividad antifúngica. Algunas plantas, como el tomate y la caña de azúcar, secretan compuestos tóxicos sobre sus hojas que inhiben la germinación de esporas de los hongos del género *Botrytis* y *Cercospora*. En los tejidos jóvenes de frutas, hojas y semillas, se encuentran a altas concentraciones, compuestos fenólicos, taninos y algunos compuestos grasos que han sido involucrados con la resistencia vegetal a microorganismos patogénicos. (Agrios, 2005).

Las defensas inducibles son aquellas que se generan una vez que el patógeno ha sido percibido por la planta. Estas comprenden el sistema inmune de la planta y pueden ser divididas en dos grandes ramas: inmunidad inducida por PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), o PTI, e inmunidad inducida por efector, o ETI (Jones & Dangl, 2006).

La primer línea de respuesta inmune de la planta, PTI, es inducida luego de la percepción y el reconocimiento de patógenos a través de patrones moleculares asociados a estos (PAMPs), como la flagelina, lipopolisacáridos, factores de elongación, así como la quitina de los hongos, entre otros. Habitualmente estos patrones moleculares son llamados elicitores. Se define como elicitador todo aquel compuesto capaz de inducir una respuesta de defensa en la planta. Los elicitores son característicos de microorganismos patogénicos y pueden clasificarse en dos grupos, elicitores generales y elicitores “raza específicos” (Sheen et al., 2007; Montesano et al., 2003). Los PAMPs son reconocidos, a través de epítopes conservados específicos, por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en la superficie celular vegetal. La especificidad de los PRR está enfocada en dichos dominios altamente conservados de los PAMPs que son funcionalmente importantes para el patógeno (He & Boller, 2009). Por ejemplo, el receptor FLS2 (*Flagelin sensitive 2*) de *Arabidopsis* percibe directamente la flagelina bacteriana a través de un epítipo conservado de 22 aminoácidos, flg 22, en su extremo N Terminal (Ali & Reddy, 2008).

El genoma vegetal codifica varios tipos de receptores, los cuales han sido clasificados en base a sus características estructurales en diferentes categorías, incluyendo los receptores tipo quinasa (RLK) y receptores tipo proteína (RLP). Todos los RLKs vegetales relacionados con la percepción de elicitores son serina/treonina quininas y pueden ser clasificados en diferentes categorías de acuerdo a las

características estructurales de los dominios extracelulares. Estas categorías son: (1) los que contienen dominios ricos en leucina o LRRs, por ejemplo Xa21 de arroz, (2) los que contienen motivos tipo lectina, por ejemplo *AthLecRK1* de *Arabidopsis*, (3) aquellos que exhiben similitud a proteínas PR tipo thaumatina, como PR5K de *Arabidopsis*, (4) los que exhiben similitud a proteínas PR tipo quitinasa, por ejemplo CHRK1 de tabaco, (5) los que contienen repetidos tipo EGF (*epidermal growth factor*), por ejemplo WAK1 de *Arabidopsis*, (6) aquellos que no poseen homología con motivos conocidos, como LRK10 de trigo y (7) los que presentan un nuevo motivo bimodular de cisteínas, como StPRKs de papa (Montesano et al., 2003). Otros receptores de PAMPs para ciertas proteínas fúngicas y fragmentos de quitina, han sido identificados como receptores de superficie celular sin dominio quinasa, estos son los denominados RLPs, compuestos solo por un dominio extracelular anclado a membrana (Ron & Avni, 2004).

La activación de los receptores por PAMPs converge en un limitado número de vías de señalización que conducen a respuestas de defensa tales como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), cambios en los niveles de Ca^{2+} , inducción de genes relacionados a defensa, producción de fitoalexina, deposición de calosa en la pared celular y eventualmente una rápida muerte celular programada localizada conocida como respuesta hipersensible (HR). La principal vía de señalización y la más conservada evolutivamente es la cascada de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs) la cual traduce estímulos extracelulares en respuesta intracelulares (Sheen et al.2007) (Figura 1).

La coevolución entre plantas y patógenos ha llevado a que estos desarrollen algunos mecanismos para suprimir la PTI. Bacterias fitopatógenas, como *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Erwinia*, han evolucionado el sistema de secreción tipo III (T3SS) para amortiguar la defensa vegetal y ser exitosas en la infección. Este sistema es ampliamente conservado y permite la secreción y translocación de efectores a través de las membranas celulares de la bacteria y el hospedero (Mudgett et al., 2009). Los efectores son proteínas producidas por el patógeno que alteran a la célula vegetal o su ambiente, causando enfermedad o disparando la defensa. Los efectores de tipo III entran directamente al citoplasma de la célula hospedera y tienen como blanco diferentes procesos celulares. Las proteínas codificadas por los genes R pueden ser activados directamente por los efectores de tipo III o pueden ser activados indirectamente por el reconocimiento de proteínas del hospedero que son blancos o han sido modificadas por dichos efectores. Esto último es consistente con la hipótesis guarda que predice que una proteína R activa la resistencia cuando interactúa con otra proteína de la planta (proteína guarda) que ha sido modificada por el patógeno en su intento de crear un ambiente favorable para la colonización (Van der Biezen & Jones, 1998). Muchas proteínas Avr son efectores de tipo III; AvrPto y AvrPtoB de *P. syringae pv. tomato* han sido identificados como potentes supresores de PTI inhibiendo pasos tempranos en la célula vegetal previos a la cascada de MAPK (Sheen et al.2007). Otra estrategia que han desarrollado las bacterias fitopatógenas es la producción de moléculas efectoras pequeñas que imitan hormonas vegetales. Por ejemplo, retomando a *P. syringae*, algunas cepas de esta bacteria producen coronatina, un compuesto químico relacionado estructuralmente al ácido jasmónico y que dispara los mismos procesos celulares suprimiendo la defensa mediada por ácido salicílico frente a patógenos biotrofos y estimulando la apertura de estomas para permitir que las bacterias ganen acceso al apoplasto (Agrios, 2005).

Para sobrevivir, las plantas han desarrollado un segundo frente de defensa, la denominada inmunidad inducida por efector (ETI), que permite percibir los efectores que inhiben la PTI a través de receptores adicionales (He & Boller, 2009) (Figura 1). La

ETI es una defensa más rápida y fuerte que la PTI, que a menudo culmina en una rápida muerte celular programada conocida como respuesta hipersensible (HR). La respuesta hipersensible se piensa que retarda el crecimiento del patógeno y evita su expansión, esta respuesta es localizada restringiéndose al punto de infección (Cullis, 2004).

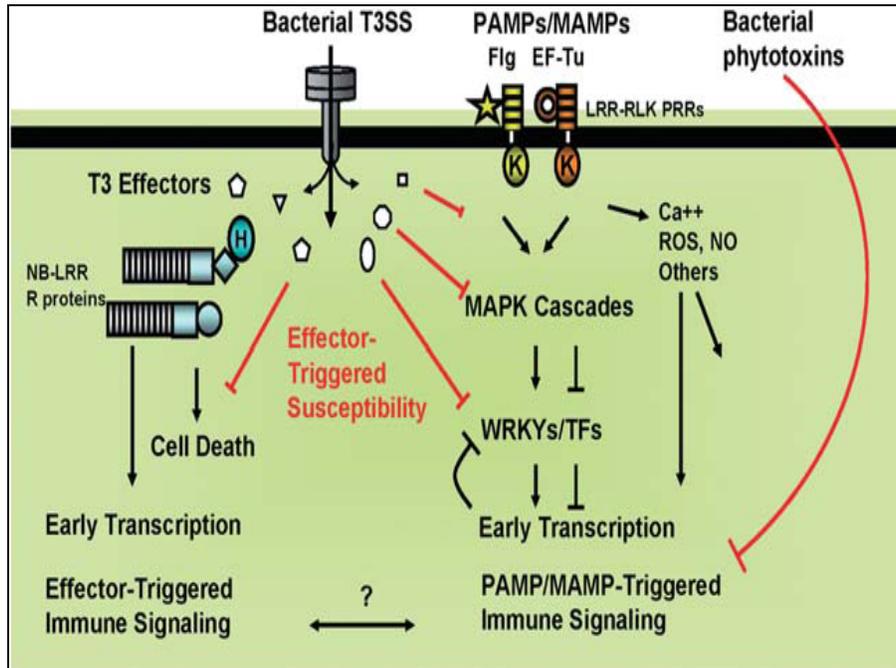


Figura 1. Interacción planta patógeno. La planta reconoce los PAMPs a través de receptores de superficie celular y es activada la primera línea de respuesta de defensa. La señalización inmune disparada es convergente e incluye la activación de la cascada de MAPKs y la transcripción temprana de genes de defensa. Otros eventos de señalización tempranos son los cambios en los niveles de calcio y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO). Las plantas codifican proteínas intracelulares de resistencia para contrarrestar los factores específicos de virulencia del patógeno, y ponen en funcionamiento la segunda línea de defensa denominada inmunidad inducida por efector, ETI (adaptado de Sheen et al., 2007)

En resumen, el sistema inmune de la planta puede ser representado por el modelo “zigzag” propuesto por Jones & Dangl (2006) (Figura 2). Este modelo está dividido en cuatro fases. En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por PRRs, resultando en la inmunidad inducida por PAMPs (PTI), la cual puede evitar futuras infecciones. En fase 2, patógenos exitosos confieren efectores que contribuyen con su virulencia y pueden interferir con la PTI. Esto resulta en una susceptibilidad inducida por efector (ETS). En la fase 3, un efector específico es reconocido por una proteína NB-LRR resultando en la inmunidad inducida por receptor. La ETI resulta en la resistencia a la enfermedad y frecuentemente en una respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección. Por último, en fase 4, la selección natural lleva al patógeno a desarrollar nuevas estrategias para

evitar la ETI, ya sea excluyendo o diversificando el gen del efector reconocido o adquiriendo nuevos efectores que suprimen ETI.

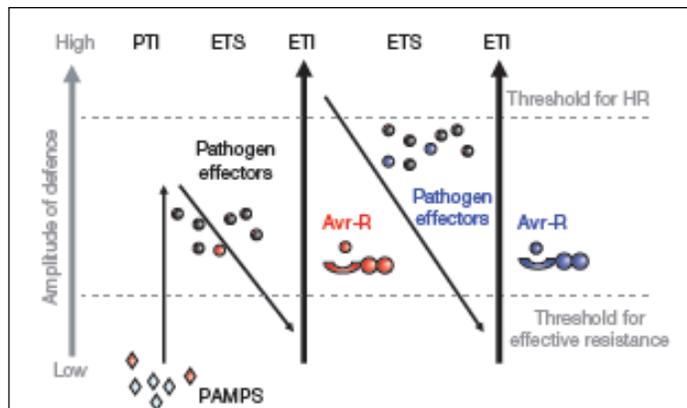


Figura 2. Modelo “zigzag”, el cual ilustra el rendimiento cuantitativo del sistema inmune de la planta, en donde la amplitud de la resistencia o de la susceptibilidad es proporcional a PTI-ETS+ETI (Jones & Dangl, 2006)

La radiación evolutiva de las especies de plantas angiospermas ha sido acompañada probablemente por eventos aislados de coevolución de patógenos, particularmente de aquellos biótrofos obligados adaptados al hospedero. La mayoría de las plantas exhiben resistencia a enfermedad contra un gran número de organismos potencialmente patógenos. Esta resistencia se denomina *non-host* y provee una resistencia efectiva, de amplio espectro y durable contra los patógenos en todos los miembros de una especie de planta (Kang et al., 2003). La resistencia *non-host* puede ser mediada por al menos dos mecanismos. En el primer mecanismo, un efector puede ser inefectivo sobre un potencialmente nuevo, pero evolutivamente divergente, hospedero fallando por tanto en la supresión de PTI y en el crecimiento del mismo. Por otro lado, uno o más de los efectores del posible patógeno puede ser reconocido por un repertorio de proteínas R de la planta distinto al de sus hospederos coadaptados, resultando en ETI (Jones & Dangl, 2006).

La resistencia *non host* es clasificada en dos tipos, denominados tipo I y tipo II. La resistencia *non host* de tipo I no produce síntomas visibles, mientras que la del tipo II está siempre asociada con la respuesta hipersensible (HR). El tipo de respuesta activada es especie dependiente, tanto de la planta como del patógeno, es decir que una especie de planta presenta resistencia del tipo I frente a determinados patógenos y del tipo II frente a otros, del mismo modo una especie de patógeno puede disparar ambos tipos de resistencia en especies de plantas distintas.

Algunos componentes implicados inicialmente en las reacciones de defensa de las plantas, y que recientemente han sido implicados en la resistencia *non host*, son las proteínas quinazas inducidas por herida (WIPK) y las inducidas por ácido salicílico (SIPK). Esto fue demostrado en *Nicotiana benthamina* en la cual el silenciamiento de WIPK y SIPK compromete la resistencia *non host* frente a *Pseudomonas cichorii* (Mysore & Ryu, 2004). Del mismo modo, algunos genes han sido identificados e involucrados en la resistencia *non host*. Un ejemplo es el gen NHO1 de *Arabidopsis* el

cual codifica una quinasa necesaria en la resistencia contra ciertos patógenos, como *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae* (Kang et al, 2003).

Rol de las proteínas quinasas en la defensa vegetal.

En plantas han sido reportadas dos clases de proteínas quinasas activadas por estrés, las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y las proteínas quinasas calcio-dependientes (CDPKs) (Ludwig et al. 2005).

Como se mencionó anteriormente, entre las vías de señalización relacionadas a la defensa la más conservada son las cascadas MAPKs. La activación de ésta es una respuesta convergente e inmediatamente temprana en la inmunidad inducida por PAMPs. Dicha cascada generalmente comprende tres proteínas quinasas que actúan secuencialmente: una MAP quinasa de quinasa de quinasa (MAP-KKK), una MAPK quinasa de quinasa (MAPKK) y una MAPK, las cuales traducen señales extracelulares a través de receptores en un amplio rango de respuestas intracelulares, induciendo así cambios masivos en la transcripción y confiriendo resistencia a múltiples patógenos. Esto sugiere la importancia de la señalización de las cascadas MAPK en la inmunidad innata de la planta. (Sheen et al., 2007)

Dentro de las quinasas vegetales mejores caracterizadas se encuentran las proteínas SIPK (proteín-quinasa inducida por ácido salicílico) y WIPK (proteína quinasa inducida por heridas) de tabaco. SIPK es activada frente a una variedad de estreses bióticos y abióticos, incluyendo estrés osmótico, salino, herida, y tratamiento con elicitores tanto bacterianos como fúngicos no específicos de especie. La activación de SIPK en respuesta al estrés abiótico es transiente, mientras que se genera una activación prolongada como resultado de elicitores bióticos capaces de inducir HR. SIPK es quizás un punto convergente para varios estímulos diferentes y la duración de su activación juega un rol importante en el tipo de proceso que es mediado. WIPK, también participa en la señalización de defensa. Si bien WIPK es activada por mucho de los mismos estímulos que SIPK, esta se diferencia en que su activación es típicamente menor. Al contrario de SIPK, la activación de WIPK por si sola no es suficiente para inducir muerte celular, lo que probablemente indica que si bien estas dos MAPKs son activadas al mismo tiempo, influyen en distintos procesos cuesta abajo (Ren et al., 2006). La activación dual de estas quinasas no es sorprendente en vista que se ha descubierto que ambas son activadas por la misma MAPKK, denominada NtMEK2. La expresión de una forma constitutivamente activa de NtMEK2 induce muerte celular, la cual es precedida por la activación de SIPK y WIPK, y la inducción de genes asociados con la respuesta de defensa (Yang et al., 2001).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica al menos 20 MAPKs, 10 MAPKKs y más de 60 MAPKKKs. MPK6 y MPK3, ortólogas de SIPK y WIPK, son rápidamente activadas por múltiples MAMPs, incluyendo elicitores bacterianos, flg22, HrpZ, Ef-Tu, elicitores de oomicetes, Pep13, NPP1 y β glucano, y elicitores fúngicos, quitina y ergosterol (Sheen et al., 2007). La cascada MAPK que integran comprende las quinasas MEKK1 y MKK4/5, que proveen funciones redundantes cuesta abajo del receptor de flagelina FLS2 y cuesta arriba de WRKY y otros factores de transcripción. La activación de esta cascada confiere resistencia tanto a patógenos bacterianos como a fúngicos (Pedley et al., 2004).

En tomate la quinasa Pto media la resistencia a la enfermedad de la mancha bacteriana (*bacterial speck*) activando la resistencia del hospedero luego del reconocimiento de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que expresen las proteínas AvrPto o AvrPtoB. Dos MAPKs, LeMPK2 y LeMPK3, son activadas en las hojas de una forma Pto-específica. Ambas quinastas están reguladas por LeMAPKKK α , una proteína que se ha demostrado esta implicada en la inmunidad mediada por Pto, induciendo muerte celular en hojas. Posterior a esta se han identificado dos cascadas MAPKs. Una de estas vías comprende las quinastas LeMCK2 y LeMPK1/LeMPK2 (Pedley et al., 2004).

El cultivo de papa y su importancia

La papa (*Solanum tuberosum*) es una planta dicotiledónea de la familia Solanáceas (Figura 3) que en la actualidad tiene una gran importancia como cultivo alimenticio, con una producción anual cercana a 300 millones de toneladas, ocupando el cuarto lugar en volumen en la producción de cultivos a nivel mundial. Se destaca cualitativamente por su alto contenido en proteínas, vitaminas, minerales y por su aporte de oligoelementos esenciales.



Figura 3: *S. tuberosum*. Planta de papa.

En Uruguay, la producción de papa es relativamente reciente, con datos que indican su comienzo en 1914. Actualmente se siembran entorno a las 9000 hectáreas de papa anualmente. Comparado a los estándares regionales el promedio de producción en nuestro país es bajo, mostrando diferencias significativas entre los tipos de productores. Los pequeños productores (aquellos que cultivan menos de 10 hectáreas) producen más del 40% de la producción total, con un rendimiento de 4 toneladas por hectáreas. Los grandes productores (con más de 50 hectáreas) producen aproximadamente el 25% del total, con rendimientos más altos de 15 toneladas por hectáreas. El 35% restante son producidas por aquellos productores que no clasifican en estas categorías (Atlas Mundial de la Papa, <http://research.cip.cgiar.org>).

Las plantas de papa se encuentran bajo el ataque de una amplia variedad de organismos que causan enfermedades, entre estos se encuentran bacterias, virus, hongos y nemátodos. Las pérdidas anuales en la producción de papa por enfermedades promedian el 21.8%, lo que ha llevado en los países en desarrollo al uso de cantidades considerables de pesticidas. En vista de ello, se han desarrollado, y se busca un mayor desarrollo, de otras estrategias para enfrentar los factores bióticos de estrés, que consisten en: programas de mejoramiento genético convencional de los cultivares, generación de cultivos transgénicos resistentes a patógenos y el desarrollo de controles biológicos de las enfermedades (CIP, 2009).

Resultados previos.

En trabajos previos, realizados en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Instituto de Química Biológica, Fac. de Ciencias), se estudiaron las bases moleculares de la interacción entre el potyvirus PVY y la planta *Solanum tuberosum*. El abordaje seguido fue la búsqueda de diferencias a nivel transcricional entre plantas con

resistencia y plantas con susceptibilidad a PVY frente a la inoculación con dicho virus. Se caracterizó una biblioteca de ADNc previamente generada por la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH). Por medio de análisis de *Northern* inverso esta biblioteca mostró estar formada mayoritariamente por genes de media a baja expresión, siendo este nivel de expresión en el cual se esperan encontrar genes reguladores de la resistencia. En base al nivel de hibridación mostrado, fueron seleccionados clones para su secuenciación. Esto permitió identificar secuencias pertenecientes a genes homólogos en otras plantas, a partir de lo cual se pudieron inferir posibles funciones de estos en el contexto de la interacción planta-patógeno. Uno de dichos genes, el cual hemos denominados *Drk362*, presentó similitud de secuencia con quininas de otras plantas, tales como quininas de la planta de tabaco activadas por estrés y heridas. Este análisis requiere de un estudio más detallado ya que si bien se había realizado un estudio preliminar de la secuencia del gen, dicha secuencia conservaba una región de conflicto sin secuenciar.

El análisis preliminar de la expresión de este gen sugirió que el mismo es inducido por heridas y muestra una expresión diferencial en plantas caracterizadas por desarrollar una respuesta de hipersensibilidad a PVY. Plantas de papa tratadas con factores de virulencia secretados por *E.c. carotovora* (principalmente enzimas que degradan la pared celular vegetal, EDPCV) inducen la expresión del gen *Drk362* a las 6 horas post tratamiento (único tiempo analizado preliminarmente). El tratamiento de plantas con ácido salicílico también induce la expresión temprana de *Drk362* a las 6 horas de realizado el tratamiento (Bentancor M.; 2006). Estos resultados preliminares sugieren que *Drk362* sería un componente que participa en las respuestas de defensa de papa inducidas por estrés biótico.

La generación de herramientas para la realización de estudios de genómica funcional, como la construcción de líneas transgénicas de papa tanto para obtener la sobreexpresión como el silenciamiento del gen de esta quinasa, permitirá posteriormente analizar sus respuestas frente a condiciones de estrés, como la exposición a patógenos, a fin de evaluar el aporte del gen *Drk362* por sí mismo en la potencial resistencia vegetal.

Objetivos

Objetivo general.

El objetivo general a largo plazo es el de caracterizar funcionalmente al gen *Drk362*, con especial énfasis en su posible rol en la respuesta de defensa de las plantas de papa, frente a la infección con patógenos.

Objetivos específicos.

- Secuenciación completa del ADNc del gen *Drk362* y análisis bioinformático.
- Generación de una construcción génica para la sobreexpresión del gen *Drk362* en papa.
- Generación de una construcción génica para el silenciamiento del gen *Drk362* en papa.

Además de los objetivos presentados se llevó a cabo la transformación de plantas de papa (*S. tuberosum*), mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, con la construcción para la sobreexpresión del gen *Drk362*. En el marco de la tesis, se incluyen tales resultados.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizada fueron TOP10 (Invitrogen Co., USA) y XL1-Blue (Stratagene Co, USA), cuyos genotipos comprenden:

XL1-Blue: endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺).

TOP10: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻.

Las bacterias se cultivaron toda la noche en agitador a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) líquido (10g/l Triptona, 5g/l Extracto de Levadura, 10g/l Cloruro de Sodio) o fueron estriadas en medio LB sólido (LB líquido, 15g/l Agar) dejándose en estufa bajo las mismas condiciones. En cada caso los medios fueron suplementados con los antibióticos correspondientes a las distintas construcciones. Las cepas conteniendo las construcciones deseadas se almacenaron en glicerol 40% (Ausubel et al., 2002) a -80°C.

Amplificación de los insertos mediante PCR

Para la construcción génica de sobreexpresión se diseñaron cebadores para la amplificación del ADNc completo del gen *Drk362*. Dichos cebadores, que contienen sitios de restricción para el posterior clonado del producto de PCR, son detallados a continuación:

pS362fw (sentido): 5'AATT**CCCGGG**ATAGAATGGAGGAAAAATAT 3'
SmaI

pS362rev (antisentido): 5'AATT**GAGCTC**CATCCTCAGACATAAACAGC 3'
SacI

En la amplificación se obtiene un fragmento de aproximadamente 1035pb que contiene la secuencia codificante de *Drk362*, dicho fragmento fue denominado S362 (Sense *Drk362*).

Para la construcción génica de silenciamiento, fue seleccionado un fragmento de 250pb correspondientes a *Drk362*, ya que estudios previos han demostrado que para lograr una alta eficiencia en el silenciamiento de un transgen, es recomendable introducir en un vector de silenciamiento una secuencia de 98 a 853 pb del gen (Wesley et al., 2001). Se corroboró que el fragmento seleccionado no presentase homología a

otras quinasas vegetales conocidas (de las especies *Solanum lycopersicum*, *Oryza japonica*, *Arabidopsis thaliana* y *Physcomitrella patens*), mediante Blast2sequence (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*), para evitar el silenciamiento de genes inespecíficos.

Se diseñaron cebadores para la amplificación del fragmento seleccionado, los cuales contienen sitios de restricción para su clonado:

pAS362fw (sentido):

5'CGTAGAATTCGGTCGCATTTGGCAATTGTTATGAC 3'
EcoRI

pAS362rev (antisentido):

5'AGTAGAATTCCTGCAGCAACCAAGACTTGGAATAAC 3'
EcoRI

En esta amplificación se obtiene un fragmento de 270pb, correspondiente al fragmento seleccionado (250pb) más los sitios de restricción generados por los cebadores, este fragmento ha sido denominado AS362 (*AntiSenseDrk362*).

Se realizaron ambas reacciones de amplificación bajo las mismas condiciones. En cada reacción fue incluido un control negativo. Las condiciones de las reacciones de PCR se observan en la Tabla 2.

	Amplificación S362	Amplificación As362
ADN (dil.1/20 plásmido pT-Adv-DRK362, ~ 15 ng/ µl)	3 µl	3 µl
Buffer High fidelity (Fermentas Internacional Inc.)	5 µl	5 µl
DNTPs (10mM)	1 µl	1 µl
Cebador sentido (10mM)	1 µl (pS362fw)	1 µl (pAS362fw)
Cebador antisentido (10mM)	1 µl (pS362rev)	1 µl (pAS362rev)
enz. Taq	0,5 µl	0,5 µl
enz. High fidelity (Fermentas Internacional Inc.)	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	38 µl	38 µl
Volumen total de la reacción	50 µl	50 µl

Tabla 2: Detalle de las condiciones de amplificación de S362 y As362. Para el control negativo el ADN fue suplantado por igual volumen de agua.

Las reacciones se realizaron en termociclador Multi Gene II (Labnet Internacional Inc., USA), utilizando el siguiente programa “touch-down”: 3 minutos a 94°C; 1 ciclo de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C; 4 ciclos iguales al anterior pero en los cuales la temperatura de alineamiento desciende 1 grado en cada uno; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C; 7 minutos a 72°C; 10 minutos a 16°C (Ausubel et al., 2002).

Análisis de los productos de PCR y cuantificación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X (0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA), teñido con Bromuro de Etidio (0.5µg/ml) según protocolo estándar (Ausubel et al., 2002). Para el análisis y la cuantificación de los productos de PCR, en todos los casos, se cargaron 5µl del producto de PCR mezclados con 1µl de buffer de carga 5X (20%(m/v) Ficoll, 50mM EDTA pH 8, 0.05%(m/v) Bromofenol blue, 0.1%(m/v) Xylenecyanol blue). Se cargaron también 7.5µl de marcador de peso molecular con 2.5µl de buffer de carga. El marcador de peso molecular consiste en ADN genómico del fago Lambda digerido con la endonucleasa PstI. El volumen del mismo cargado comprende 1µl de ADN y la concentración de ADN de cada una de las bandas se puede calcular mediante la ecuación $m_{banda} = (m_{total}/n^{pb_{total}}) * n^{pb_{banda}}$, de esta manera se puede cuantificar de manera aproximada la muestra comparando la intensidad lumínica y tomando en cuenta el número de pares de bases con las bandas del marcador de peso molecular.

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados mediante columna de purificación GenCatchTM PCR Purification Kit (EpochBiolabs, Inc., USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la reacción de PCR se solubilizó en 500µl de buffer PX. La mezcla se colocó sobre membrana de sílica en la columna donde el ADN se adhiere, se centrifugó por 30 segundos a 12000rpm, descartándose el sobrenadante. Posteriormente se realizaron dos lavados, el primero con 500µl de buffer WF y el segundo con 700µl de buffer WS. Por último se colocó la columna en un tubo eppendorf 1.5ml, y se eluyó el ADN con 50µl de H₂O. Todos los buffers utilizados son suministrados en el kit comercial.

Digestiones.

Para realizar la construcción de sobreexpresión fueron digeridos el producto de PCR S362 y el vector de expresión en plantas pROK-2 (Baulcombe et al., 1986) con las enzimas de restricción SmaI y SacI (New England Biolabs Inc., USA), generándose de esta manera los extremos necesarios para la posterior ligación y que confieren direccionalidad al inserto. El volumen final de cada reacción de digestión fue de 20µl, conteniendo aproximadamente 1µg de ADN, 2µl de buffer Neb4 (10X), 1µl de SmaI (10u/µl), 1µl de SacI (10u/µl) y H₂O MQ estéril hasta alcanzar el volumen final. Debido a que SmaI posee actividad enzimática a 27°C, las reacciones de digestión se realizaron en forma secuencial incubándose por 2 horas con dicha enzima a 27°C y adicionándose posteriormente la enzima SacI e incubándose por 2 horas más a 37°C.

Para realizar la construcción de silenciamiento se digirieron el producto de PCR AS362 y el vector de entrada pENTR-2B (Invitrogen Co., USA) con la enzima de restricción EcoRI (Fermentas Internacional Inc., CAN), generándose los extremos cohesivos para la posterior ligación. Cada reacción de ligación consistió de aproximadamente 1µg de ADN, 2µl de buffer EcoRI (10X), 1µl de EcoRI (10u/µl) y H₂O MQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 20µl. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 2 horas. En este caso el vector fue desforilado, de manera de evitar su re-ligado, adicionándose a la mezcla de digestión 1µl de la fosfatasa alcalina FastAP (Invitrogen Co., USA) e incubándose a 37°C por 10 minutos. La reacción de desforilación fue inactivada por shock térmico a 65°C durante 15 minutos.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% a 50mV de cada digestión para separar los fragmentos.

Extracción de los fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa.

Una vez realizadas las electroforesis se escindieron las bandas correspondientes a vectores e insertos. El ADN fue aislado mediante columna de purificación GenCatch™ Gel Extraction (EpochBiolabs Inc., USA), según fabricante. La banda de gel conteniendo el fragmento de ADN de interés fue colocada en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se le adicionó 3 volúmenes de Buffer GEX por cada volumen de gel. Se incubó a 55°C por aproximadamente 10 minutos hasta que el gel estuvo completamente disuelto. La mezcla se cargó en una columna Gel Extraction y se centrifugó durante 30 segundos a 5000rpm. Se descartó el sobrenadante. Posteriormente se realizaron dos lavados con los Buffers WX y WS en volúmenes de 500µl y 700µl, respectivamente. Finalmente se eluyó el ADN en 30µl de H₂O MQ estéril.

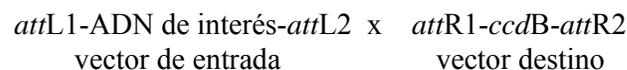
Ligaciones.

Las ligaciones fueron realizadas en relaciones inserto/vector de 3:1, en un volumen final de 20 µl. Para la construcción pROK-2-S362 la reacción de ligación consistió de 5µl (~25ng) del vector pROK-2/SmaI-SacI, 12µl (~42,5ng) del inserto S362/ SmaI-SacI, 2µl de buffer ligasa 10X y 1µl de T4 DNA ligasa (5u/µl) (Fermentas Internacional Inc., CAN). La reacción de ligación para la construcción pENTR-2B-AS362 consistió de 3µl (~60ng) del vector pENTR-2B/EcoRI, 5µl (~18,5ng) del inserto AS362/EcoRI, 2µl de buffer ligasa 10X y 1µl de T4 DNA ligasa (5u/µl) (Fermentas Internacional Inc., CAN).

Las reacciones de ligación fueron incubadas a 4°C durante 16 horas (O.N.).

Clonado de la construcción de silenciamiento.

Para la obtención de la construcción de silenciamiento se utilizó el sistema de clonado Gateway® (Invitrogen Co., USA). Este sistema se basa en las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago Lambda, proporcionando un método rápido y altamente eficiente para mover secuencias de ADN entre múltiples sistemas de vectores. La tecnología Gateway® se puede representar de la siguiente manera:



Los sitios *att* son secuencias homólogas en ambos vectores, de entrada y destino, entre las que ocurre la recombinación. La reacción de recombinación *attL* x *attR* es catalizada por la clonasa LR (Invitrogen Co., USA). Tanto los vectores de destino como los de entrada contienen el gen *ccdB*, el cual es letal en la mayoría de las cepas de *E. coli*. Estos vectores vacíos son por lo tanto seleccionados luego de su transformación en las células *E. coli*. Esta selección negativa combinada con la selección positiva debido a la resistencia de un antibiótico, asegura que las colonias resultantes contengan el plásmido que hayan incorporado exitosamente el gen en estudio.

Una vez clonado el ADN de interés, AS362, en el vector de entrada pENTR-2B dicho ADN quedó flanqueado por regiones *attL* (sitios de recombinación). Posteriormente, mediante recombinación, el fragmento de ADN fue introducido en el vector de silenciamiento destino pJawohl17-RNAi, el cual contiene regiones *attR* para dicha recombinación en dos orientaciones (sentido y antisentido). Esto permite la inserción del inserto en ambos sentidos de manera de favorecer la formación de la estructura en horquilla para el silenciamiento. Se utilizó la clonasa LR (Invitrogen Co., USA) para catalizar el paso de recombinación entre los dos vectores; la reacción consistió de: 1µl (~150ng) del clon de entrada pENTR-2B-AS362, 2µl (~300ng) del vector destino pJawohl17-RNAi, 2µl de buffer clonasa LR 5X, 2µl de clonasa LR y 1µ de buffer TE (Tris-EDTA; pH 8.0). La reacción de recombinación fue incubada a 25°C O.N.; para detener la reacción se adicionó 1µl de solución de proteinasa K (Invitrogen Co., USA) y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

La construcción obtenida es la correspondiente al silenciamiento génico de *Drk362* y fue denominada pJawohl17-AS362.

Transformación de cepas de *E. coli* con las distintas construcciones.

Se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* XL1-Blue con las reacciones de ligación pROK-2-S362 y pENTR-2B-AS362. Para cada transformación se descongelaron manteniéndose en hielo 100µl de células competentes. Se adicionaron 10µl de cada reacción de ligación a distintas alícuotas de células XL1-Blue. Se incubaron por 30 minutos en hielo y posteriormente se realizó shock térmico a 42°C por 45 segundos. Inmediatamente se incubaron por otros 5 minutos en hielo. Luego se agregaron 200µl de medio LB, se incubó a 37°C durante 2 horas con agitación. Cada transformación se plaqueó en placas de Petri conteniendo LB sólido adicionado con kanamicina (Km; 30µg/ml). Se dejó toda la noche en estufa a 37°C (Ausubel et al., 2002).

Para la construcción pJawohl17-AS362 el procedimiento de transformación fue el mismo con las siguientes variantes: se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* TOP-10 (mostraron mayor eficiencia de transformación para el sistema Gateway® en trabajos previos en el laboratorio); la transformación fue plaqueada en medio LB sólido con ampicilina (Amp; 50µg/ml).

Para analizar las colonias transformantes se estrieron 8 colonias de cada transformación en medio LB-Km sólido o LB-Amp sólido, según construcción. Se incubaron las estrías toda la noche en estufa a 37°C. De colonias aisladas se realizaron cultivos líquidos en 5ml de LB adicionado con el antibiótico correspondiente, los cuales fueron incubados en agitador a 37°C O.N. Se purificaron los plásmidos de cada cultivo para analizarlos mediante restricción y secuenciación a fin de verificar la obtención de las construcciones deseadas.

Purificación de los plásmidos

El protocolo utilizado es una modificación del protocolo del kit comercial de extracción QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se centrifugaron los 5 ml de los cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche en LB-Km o LB-Amp. Se resuspendieron los

pellet bacterianos en 0,3ml de Buffer 1 (50mM Tris-HCl, pH 8; 10mM EDTA; 100µg/ml RNasa). Se agregaron 0,3ml de Buffer 2 (200mM NaOH, 1% SDS), se mezcló invirtiendo los tubos 4 o 5 veces y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0,3ml de buffer 3 (3,0M Acetato de Potasio, pH 5,5). Se mezcló invirtiendo los tubos 4 o 5 veces y se incubaron 5 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 12000rpm durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes.

Se precipitó el ADN con 0,7 volúmenes de isopropanol centrifugándose a 12000rpm durante 20 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y los pellet fueron lavados con 1ml de etanol 70% (centrifugado a 12000rpm durante 5 minutos).

El etanol 70% fue descartado y los pellets se secaron a 42°C. Se resuspendieron los pellet en volúmenes de 30-50µl H₂O MQ estéril y se solubilizaron a 65°C durante 10 minutos.

Selección de clones positivos.

Para la construcción pROK-2-S362 se digirieron los plásmido purificados con las enzimas EcoRI y HindIII (Fermentas Internacional Inc., CAN); ambas enzimas cortan una vez en el vector en las posiciones 6773 y 7918, respectivamente. La reacción de digestión consistió de 5µl de la muestra, 0,5µl de EcoRI (10u/µl), 0,5µl de SmaI (10u/µl), 2µl de buffer R (10X) y H₂O MQ estéril hasta alcanzar un volumen final de reacción de 20µl.

La verificación de la construcción de silenciamiento se realizó mediante restricción, así como por PCR. En primera instancia, la construcción pENTR-2B-AS362 fue digerida con la enzima EcoRI, dicha reacción se realizó en iguales condiciones a la reacción de digestión descrita anteriormente para el vector y el inserto (véase el apartado “Digestiones”). La construcción pJawohl17-AS362 fue digerida con la enzima NcoI (Fermentas Internacional Inc., CAN) que corta una vez en el inserto, como no se conoce el mapa de restricción del vector pJawohl17-RNAi ya que se trata de un vector modificado, el mismo sin inserto también fue digerido para comparar los distintos patrones de restricción. Las reacciones consistieron de 5µl de la muestra, 1µl de NcoI (10u/µl), 2µl de buffer Tango (10X) y H₂O MQ estéril hasta alcanzar un volumen final de reacción de 20µl. Las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 2 horas y luego se corrieron en gel de agarosa 1% para separar los fragmentos. También se realizó PCR utilizando como molde una dilución 1/50 del plásmido, en idénticas condiciones a las reacción de PCR realizada para la amplificación del inserto AS362 (Tabla 2, apartado “Amplificación de los insertos mediante PCR”).

Se seleccionó un clon positivo para cada construcción y se almacenaron en gliceroles 40% (Ausubel et al., 2002) a -80°C.

Secuenciación y análisis bioinformático.

Se determinó la secuencia completa del ADNc *Drk362* mediante secuenciación, para lo cual fue diseñado un cebador interno a la misma:

pDRK362 seq2: 5'CATTGTCAGGTTTAAAGAGGTCTT 3'

Se enviaron a secuenciar también las construcciones PROK-2-S362 y pJawohl17-AS362. Para la primera se secuenció con los cebadores p35S, el cual hibrida con el promotor 35S presente en el vector, pAS362rev, utilizado para la construcción de

silenciamiento pero que permite una mayor resolución de la secuencia, pDRK362 seq2 y pS362rev, los cuales hibridan con el inserto (*Drk362*). Para la secuenciación de la construcción pJawohl17-AS362 se utilizó el cebador p35S.

Para las mencionadas secuenciaciones se utilizó el servicio de la Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, el cual cuenta con un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems, Invitrogen Co., USA). Se enviaron aproximadamente 500ng de ADN de cada muestra y 10 μ M de cada cebador. Las secuencias obtenidas se analizaron en los programas BioEdit versión 5.0.6 y vector NTI 11.0.0

Para el análisis bioinformático las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa SeqMan 2, en el cual se determinó una secuencia consenso y la secuencia codificante del gen *Drk362*. Se realizó búsqueda de secuencias homologas a la secuencia codificante *Drk362* mediante Blast frente a los bancos de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y del PlantGDB (www.plantgdb.org/).

La secuencia aminoacídica codificada por el gen fue deducida mediante Psort (<http://www.psort.org/>). En el mismo sitio se analizaron también posibles dominios de localización subcelular. Por otro lado, se estudiaron posibles motivos de la proteína predicha DRK362 en la base de datos y plataforma de búsqueda específica para quinasas de plantas disponible en el sitio PlantsP (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>).

Se realizó búsqueda de secuencias proteicas homologas a la secuencia proteica predicha mediante BlastP frente al banco de datos del NCBI.

De los Blast realizados, tanto para el gen como para la proteína, se seleccionaron las secuencias más representativas. Las mismas fueron alineadas mediante ClustalW v1.4 empleado con el programa Bioedit v7.0.1. El análisis estadístico de la similitud e identidad entre secuencias fue realizado mediante el programa GeneDoc.

Transformación de plantas de papa mediada por *A. tumefaciens*.

Con la construcción pROK-2-S362 se realizó transformación *in planta* mediada por la bacteria *A. tumefaciens*. En primera instancia, se transformaron células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* C58C1 conteniendo el plásmido Ti pGV3850 (Deblaere et al, 1985). Se agregaron 5 μ l (~80ng) de mini prep pROK-2-S362 sobre 100 μ l de células congeladas. Se incubó a 37°C durante 5 minutos. Se adicionó 1ml de medio YEP líquido (10g/l Bacto-triptona, 10g/l Extracto de Levadura, 5g/l Cloruro de Sodio) y se incubó en agitador (50 rpm) a 28°C durante 4 horas. Se centrifugaron las bacterias a 12000rpm durante 2 minutos. El pellet bacteriano fue resuspendido en 100 μ l de medio YEP líquido. De esta resuspensión se plaquearon 50 μ l en medio YEP sólido conteniendo los antibióticos Carbenicilina (Cb, 100 μ g/ml) y Rifampicina (Rf, 100 μ g/ml), para la selección de la cepa bacteriana y Kanamicina (Km, 50 μ g/ml) para selección de la construcción. Se incubó toda la noche a 28°C.

De las colonias crecidas en placa se realizaron estrías en medio YEP Rf-Cb-Km sólido. Se incubó nuevamente a 28°C O.N. De colonias aisladas a partir de las estrías se realizaron cultivos líquidos en 10 ml de medio YEP-Cb-Km, se incubaron a 28°C durante toda la noche con agitación (50 rpm). Se purificaron plásmidos según el protocolo descrito más arriba (véase “Purificación de plásmidos”, Materiales y métodos). Se seleccionó un clon positivo para la transformación mediante PCR realizada a partir de una dilución 1/50 del plásmido y utilizando los cebadores pS362fw y pS362rev (las condiciones de PCR han sido descritas previamente en el apartado “Amplificación de los insertos mediante PCR”, Materiales y métodos).

Para la transformación *in planta* se utilizaron plantas del cultivar *S. tuberosum* de crecidas aproximadamente 6 semanas en medio Murashige-Skoog-3 (Murashige y Skoog, 1962), con un fotoperíodo de 16 horas luz, un flujo lumínico de $150-200 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ y a una temperatura de 20 °C. Se generaron explantes de internodos de 4 a 6mm y se realizó un corte longitudinal en cada uno de ellos. También se cortaron hojas escindiéndose los bordes. Se precultivaron los explantes en medio CIM1 (medio inductor de callos, MS sales 4,71g/l, Sacarosa 30g/l, MES 0,5g/l, Zeatine riboside 0,8mg/ml, 2,4-D (auxina) 2mg/ml, Agar 8,5g/l) por 24 horas en condiciones de 16 horas de fotoperíodo ($100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a 22°C. Al mismo tiempo, se comenzó un cultivo de *Agrobacterium* transformante en 5ml de medio YEP-Cb-Km el cual se incubó en agitación a 28°C durante 16 horas. Se realizó una dilución 1/10 de este cultivo con medio MS 3 % liquido (MS sales 4,71g/l, Sacarosa 30g/l, MES 0,5g/l) y se colocó en placa de Petri. Se incubaron los explantes en la solución bacteriana durante 30 minutos sin luz directa. Luego, los explantes fueron secados en papel de filtro estéril y se colocaron nuevamente en medio CIM1. Se cocultivaron los explantes por 3 días en condiciones de poca luz.

Se lavaron los explantes dos veces en medio MS 3% con Claforan (Cf, 500mg/l) por 40 minutos cada vez. Se secaron en papel de filtro estéril y se transfirieron a medio CIM2 (medio selectivo inductor de callos, MS sales 4,71g/l, Sacarosa 30g/l, MES 0,5g/l, Zeatine riboside 0,8mg/ml, 2,4-D (auxina) 2mg/ml, Agar 8,5g/l, Claforan 500mg/l, Kanamicina 50mg/l). Se incubó en condiciones de 16 horas de fotoperíodo ($100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a 22°C, hasta el buen desarrollo de cayos.

Resultados y Discusión

Secuenciación completa del ADNc *Drk362* y análisis bioinformático.

Se obtuvo el ADNc completo de *Drk362* con una longitud total de 1088 pb. Su marco abierto de lectura de 1017 pb codifica una proteína de 339 aminoácidos con una masa molecular calculada de 45.26 kDa. Se estableció que la proteína predicha DRK362 posee una señal de localización nuclear (Figura 4).

El análisis de motivos de DRK362 determinó que la misma posee características representativas de proteínas quinasas, principalmente un dominio serina/treonina quinasa, un sitio de unión a ATP y residuos TxY habitualmente fosforilados por MAPKs. Esta proteína posee además aminoácidos invariantes entre diferentes quinasas (Montesano et al., 2001). También fueron localizados en la secuencia 6 residuos de cisteína conservados en las distintas quinasas, lo que implicaría un rol importante en el plegamiento y funcionalidad de dichas proteínas (Figura 5).

En la búsqueda de secuencias homologas a *Drk362* se llegó a una secuencia de *Solanum tuberosum* en la base de datos PlantGDB, denominada 1-PUT-157^a (*Solanum tuberosum*-56516) que corresponde a un ensamblaje de distintas secuencias de ARNm disponibles en GenBank (PUT: *PlantGDB-assembled unique transcripts*). Este ensamblaje “codificaría” para una proteína hipotética similar a la quinasa SAPK8 de *Oryza sativa* la cual es inducida frente a estrés osmótico (Kobayashi et al., 2004) y ha sido denominada como *SAPK8-like serin/treonin kinase* (de aquí en más la llamaremos St-SAPK8-like por comodidad). St-SAPK8-like no presenta referencias ni datos específicos que acrediten que sea una proteína real o que exista un gen que la codifique. De cualquier modo, esta hipotética proteína ha sido utilizada para análisis comparativos con DRK362 (Figura 5), donde se observa una similitud del 73% entre las mismas (Tabla 3). Dada la baja similitud y que no estamos en condiciones de afirmar que St-SAPK8-like sea una proteína real, esta no puede ser tomada en mayor consideración.

Por otro lado, la comparación de DRK362 con otras proteínas quinasas conocidas de plantas (Figura 5) mostró similitudes significativas a tres diferentes proteínas quinasas de *Nicotiana tabacum*, PRK11-C1, WAPK (Lee et al., 1998) y PRK11-C5, con porcentajes de similitud de 95% para las dos primeras y de 94% para la tercera (Tabla 3). PRK11-C1, es una proteína quinasa cuya expresión es inducida por ABA (una hormona vegetal responsable de varias respuestas frente al estrés hídrico y heridas), mientras que WAPK es una serina/treonina quinasa del subtipo SNRK2 (*Sucrose nonfermenting1-related protein kinase 2*), inducida por heridas, ácido abscísico y metiljasmonato (Lee et al., 1998). También se observa similitud de DRK362 a una hipotética serina/treonina quinasa predicha de *Vitis vinifera*, a SAPK3 una serina/treonina quinasa del *Ricinus communis* y a la proteína SAPK3 de *Oryza sativa* cv. *Japonica* (Tabla 3). La quinasa SAPK3 de arroz es activada por estrés hiperosmótico y por ABA (Kobayashi et al., 2004).

```

ATTCGCCCTTAGCTCGAGGTGTGTGATTTTGGATTGGATAGA ATG GAG GAA AAA
M E E K

TAT GAG CTT TTG AAG GAA CTT GGT GCT GGG AAT TTT GGA GTA GCA
Y E L L K E L G A G N F G V A

AGG TTA GTT AAG GAT AAG AAG ACA AAG GAG CTT TTA GCT GTC AAA
R L V K D K K T K E L L A V K

TAT ATA GAA AGA GGG AAA AAG ATT GAT GAG AAT GTG CAG AGA GAA
Y I E R G K K I D E N V Q R E

ATT ATA AAT CAT AGA TCG TTG AGA CAT CCG AAC ATT GTC AGG TTT
I I N H R S L R H P N I V R F

AAA GAG GTC CTG GTT ACT CCG TCG CAT TTG GCA ATT GTT ATG GAG
K E V L V T P S H L A I V M E

TAT GCA GCA GGT GGA GAA CTT TTT GGT AGA ATA TGC AGT GCT GGC
Y A A G G E L F G R I C S A G

AGA TTT AGT GAA GAT GAG GCT CGT TTC TTC CAA CAG CTT ATA
R F S E D E A R F F F Q Q L I

TCC GGT GTC AGC TAC TGT CAT ACC ATG GAA ATT TGT CAC AGG GAC
S G V S Y C H T M E I C H R D

TTG AAA CTG GAA AAC ACT CTT ATT GAT GGA AGT CCT TCG CCA CGT
L K L E N T L I D G S P S P R

CTA AAA ATA TGT GAT TTT GGT TAT TCC AAG TCT GGT TTG CTG CAT
L K I C D F G Y S K S G L L H

TCA CAA CCA AAG TCG ACT GTG GGA ACT CCT GCT TAC ATT GCG CCG
S Q P K S T V G T P A Y I A P

GTC CTG TCA CGA AAG GAA TAT GAT GGG AAG ATC GCA GAC GTG TGG
V L S R K E Y D G K I A D V W

TCA TGT GGA GTG ACA CTA TAT GTA ATG TTA GTA GGA GCA TAC CCT
S C G V T L Y V M L V G A Y P

TTT GAG GAT CCT GAA GAT CCG AAG AAC TTC AGG AAA ACC ATT GGG
F E D P E D P K N F R K T I G

AGA ATA ATG AGT GCC CAA CAC TCC ATA CCC GAT TAT GTA CGA ATC
R I M S A Q H S I P D Y V R I

ACA CCA GAT TGC AAG AAC CTC CTT TCG CGA ATC TTT GTT GCA AAT
T P D C K N L L S R I F V A N

CCC TCT AAG AGG ATC ACT ATT CCT GAG ATA AAG AAA CAT CCT TGG
P S K R I T I P E I K K H P W

TTC TTA AAG AAT CTA CCA AAA GAA CTG ATG GAT GTT GAG CAC GCG
F L K N L P K E L M D V E H A

AAA TTC GAA GAA TCT TCA GAG CAA CTA CAA CAA AGT GTT GAA GAA
K F E E S S E Q L Q Q S V E E

ATC ATG AAG ATG ATA CAA GAA GCT AAA ATA CCT GGA GTA GTG TCA
I M K M I Q E A K I P G V V S

AAA TCT GAT GGG AAA GAC CCT GCA GGG ACA ACA GAA CAA GAT GAT
K S D G K D P A G T T E Q D D

TTA GAG GAA GAC CTC GAA TCG GAA ATT GAC AGC AGC AAT GAC TTT
L E E D L E S E I D S S N D F

GCT GTT TAT GTC TGA GGATGAAATTTCTACAAAGGG
A V Y V *

```

Figura 4: Secuencia completa del ADNc de *Drk362* y secuencia aminoacídica deducida. En la secuencia nucleotídica se representa en letras negras la región codificante y en naranja las regiones no transcritas UTRs (*Untranslated Regions*). En la proteína se representa en letras rojas e itálicas la señal de localización nuclear.

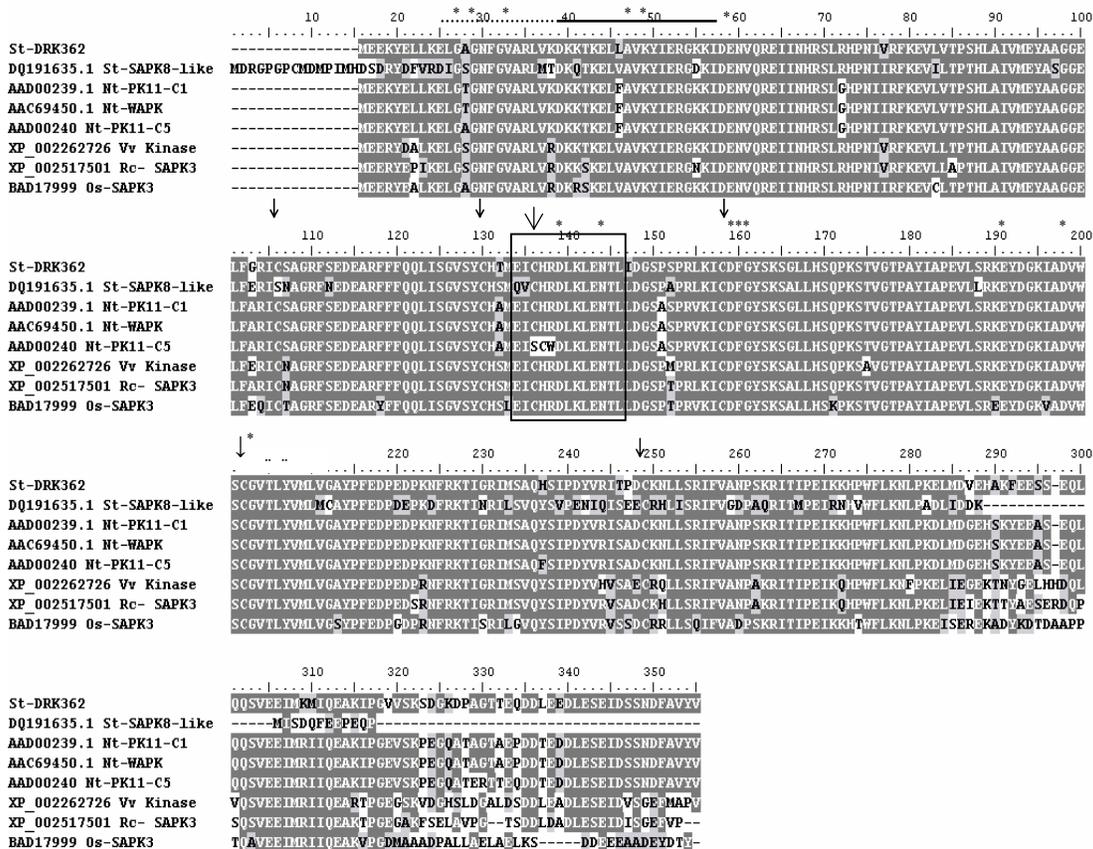


Figura 5: Alineamiento de la secuencia proteica predicha de DRK362 y proteínas similares obtenidas de bases de datos. La secuencia aminoacídica deducida DRK362 fue alineada con St-SAPK8-like *serin/treonin kinase*, una secuencia ensamblada a partir de ADnc de distintos ARNm provenientes de *Solanum tuberosum* (bases de datos PlantDGB); Nt-PK11-C1, Nt-WAPK y Nt-PK11-C5 proteínas quinasas de *Nicotiana tabacum* inducidas por diferentes estreses; Vv-Kinase una hipotética serina/treonina quinasa de *Vitis vinifera*; Rc-SAPK3 una serina/treonina quinasa SAPK3 del *Ricinus communis* y Os-SAPK3 SAPK3 de *Oryza sativa* cv. *Japonica*. Los números de acceso correspondientes se representan en la figura. Aminoácidos idénticos se encuentran sombreados en gris oscuro y aminoácidos similares en gris claro. Las líneas en las secuencias representan espacios introducidos para mejorar el alineamiento. Regiones funcionalmente importantes han sido indicadas de la siguiente manera: *, aminoácidos invariantes dentro de las proteínas quinasas (Montesano et al., 2001); ↓, residuos de cisteína; ↕, treonina (T) y tirosina (Y) dos residuos normalmente fosforilados por la activación de MAPKs; —, sitio de unión a ATP; □, sitio activo de serina/treonina quinasa; —, señal de localización nuclear (paquete de programas de Prosite). El alineamiento fue realizado mediante Clustal W v.1.4.

DRK 362				
	Aminoácidos idénticos	Aminoácidos similares	Gap	Número de accesoión
St-SAPK8-like	59%	73%	19%	DQ191635.1
Nt-PK11-C1	91%	95%	0%	AAD00239.1
Nt-WAPK	91%	95%	0%	AAC69450.1
Nt-PK11-C5	90%	94%	0%	AAD00240
Vv-Kinase	81%	89%	0%	XP_002262726
Rc-SAPK3	80%	89%	1%	XP_002517501
Os-SAPK3	73%	87%	2%	BAD17999

Tabla 3: Porcentajes de identidad y similitud calculados a partir de la comparación de la secuencia de DRK362 con varias secuencias aminoacídicas correspondientes a diferentes proteínas quinasas. Gap corresponde al porcentaje de espacios introducidos para mejora el alineamiento.

Generación de la construcción génica para la sobreexpresión de *Drk362* en papa (*S. tuberosum*).

Para la generación de la construcción de sobreexpresión se amplificó la secuencia codificante completa del gen *Drk362* mediante PCR con los cebadores pS362fw y pS362rv. Se obtuvo el fragmento S362 en el cual fueron introducidos los sitios de restricción *SmaI* y *SacI* que facilitan el clonado y le dan direccionalidad al inserto en el vector pROK-2. La amplificación fue específica y el fragmento amplificado fue del tamaño esperado, ~ 1035pb (Figura 6A). El fragmento S362 y el vector pROK-2 fueron digeridos con las endonucleasas *SmaI* y *SacI* y se separaron en gel de agarosa 1% (Figura 6B). Se escindieron las bandas correspondientes al fragmento y al vector linearizado (11501pb). Las mismas fueron purificadas. Posteriormente, se realizó la ligación pROK-2- S362, generándose así la construcción deseada (Figura 7).

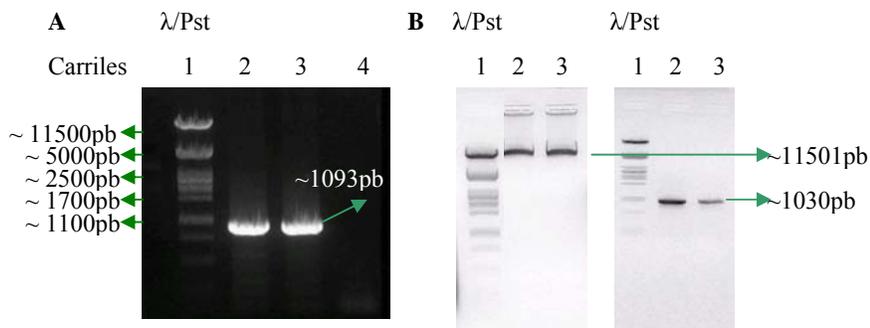


Figura 6: Análisis del producto de PCR y ensayos de restricción en gel de agarosa 1%. A) Productos de PCR: Carril 1, marcador de peso molecular λ /PstI. Carriles 2 y 3, producto de PCR S362. Carril 4, control – (sin ADN molde). B) Digestión del vector y el inserto con *SmaI* y *SacI*. A la izquierda: Carril 1, marcador de peso molecular λ /PstI. Carriles 2 y 3, pROK-2 digerido. A la derecha: Carril 1, marcador de peso molecular λ /PstI. Carriles 2 y 3 S362 digerido.

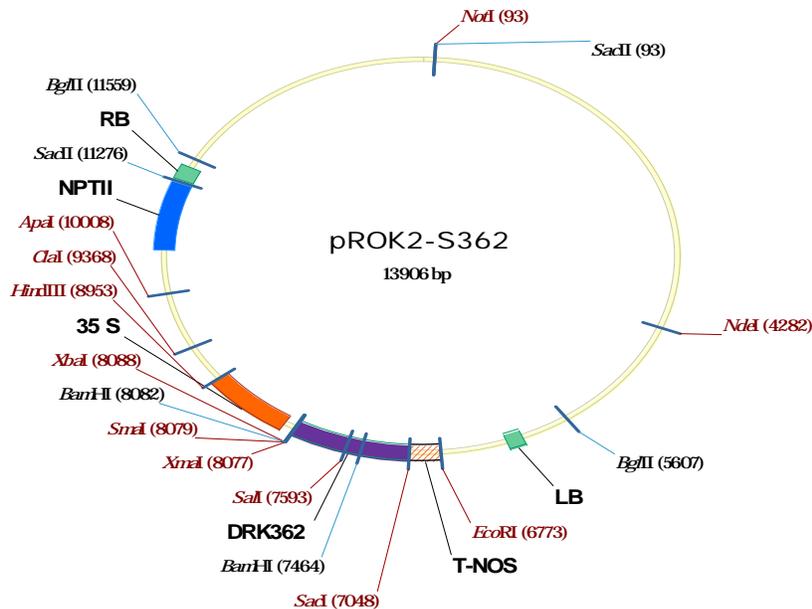


Figura 7: Detalle de la construcción pROK-2- S362.

La construcción de sobreexpresión fue utilizada para transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Se obtuvieron colonias resistentes a kanamicina (resistencia expresada por el gen NptII del vector); se estriaron 8 colonias en placas de Petri con LB-Km sólido para el análisis posterior. Se extrajo ADN plasmídico a partir de las colonias estriadas para verificar la presencia del inserto mediante ensayo de restricción. Las digestiones se realizaron con dos de los clones estriados con las enzimas EcoRI y HindIII, las cuales cortan en la construcción pROK-2-S362 en las posiciones 6773 y 8953 (posición inicial 7918+1035pb del inserto), respectivamente. En la Figura 8 se observa el ensayo de restricción apreciándose en los Carriles 2 y 3 el fragmento esperado de aproximadamente 2180 pb y una banda mayor de aproximadamente 11726 pb. Podemos deducir que se habría obtenido la construcción deseada pero para una mayor confirmación la misma fue enviada a secuenciar con los cebadores detallados previamente (ver Materiales y Métodos).

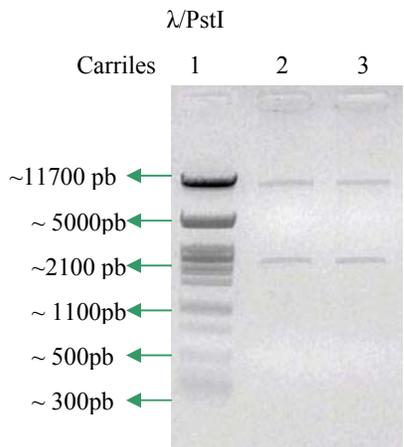


Figura 8: Ensayo de restricción para selección de clones transformantes pROK-2-S362. Carril 1: marcador de peso molecular λ /PstI. Carriles 2 y 3: ADN plasmídico pROK-2-S362 digerido con EcoRI y HindIII.

```

DRK362      (1) -----
pROK2-362  (54) TCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAAAACACGGGGACTCTAGA

DRK362      (1) -----ATGGAGGAAAAATATGAGCTTTTGAAGGAACCTG
pROK2-362  (104) GGATCCCCGGGATAGATGGAGGAAAAATATGAGCTTTTGAAGGAACCTG

DRK362      (35) GTGCTGGGAATTTTGGAGTAGCAAGGTTAGTTAAGGATAAGAAGACAAAG
pROK2-362  (154) GTGCTGGGAATTTTGGAGTAGCAAGGTTAGTTAAGGATAAGAAGACAAAG

DRK362      (85) GAGCTTTTAGCTGTCAAATATATAGAAAAGGGGAAAAAGATTGATGAGAA
pROK2-362  (204) GAGCTTTTAGCTGTCAAATATATAGAAAAGGGGAAAAAGATTGATGAGAA

DRK362      (135) TGTGCAGAGAGAAATATAAATCATAGATCGTTGAGACATCCGAACATTG
pROK2-362  (254) TGTGCAGAGAGAAATATAAATCATAGATCGTTGAGACATCCGAACATTG

DRK362      (185) TCAGGTTTAAAGAGTCTCGTTACTCCGTCGCATTTGGCAATTGTTATG
pROK2-362  (304) TCAGGTTTAAAGAGTCTCGTTACTCCGTCGCATTTGGCAATTGTTATG

DRK362      (235) GAGTATGCAGCAGGTGGAGAACTTTTGGTGAATATGCAGTGTGGCAG
pROK2-362  (354) GAGTATGCAGCAGGTGGAGAACTTTTGGTGAATATGCAGTGTGGCAG

DRK362      (285) ATTTAGTGAAGATGAGGCTCGTTTCTTCTTCCAACAGCTTATATCCGGTG
pROK2-362  (404) ATTTAGTGAAGATGAGGCTCGTTTCTTCTTCCAACAGCTTATATCCGGTG

DRK362      (335) TCAGCTACTGTGCATACCATGGAAATTTGTACAGGGACTTGAAAACGGAA
pROK2-362  (454) TCAGCTACTGTGCATACCATGGAAATTTGTACAGGGACTTGAAAACGGAA

DRK362      (385) AACACTCTTATGTGGAAGTCCCTCGCCACGCTTAAAAATATGTGATTT
pROK2-362  (504) AACACTCTTATGTGGAAGTCCCTCGCCACGCTTAAAAATATGTGATTT

DRK362      (435) TGGTTATCCAAAGTCTGGTTTGTGTCATTCAACAACAAAGTCGACTGTGG
pROK2-362  (554) TGGTTATCCAAAGTCTGGTTTGTGTCATTCAACAACAAAGTCGACTGTGG

DRK362      (485) GAACTCCTGCTTACATTGCGCCTGAGTCTGTACAGAAAGGAATATGAT
pROK2-362  (604) GAACTCCTGCTTACATTGCGCCTGAGTCTGTACAGAAAGGAATATGAT

DRK362      (535) GGGAAAGATCGCAGACGTGTGGTCATGTGGAGTGACACTATATGTAATGTT
pROK2-362  (654) GGGAAAGATCGCAGACGTGTGGTCATGTGGAGTGACACTATATGTAATGTT

DRK362      (585) AGTAGGAGCATACCCTTTGAGGATCCTGAAGATCGAAGAACTTCAGGA
pROK2-362  (704) AGTAGGAGCATACCCTTTGAGGATCCTGAAGATCGAAGAACTTCAGGA

DRK362      (635) AAACCATGGGAGAATAATGAGTGCCCAACACTCCATACCCGATTATGTA
pROK2-362  (754) AAACCATGGGAGAATAATGAGTGCCCAACACTCCATACCCGATTATGTA

DRK362      (685) CGAATCACACCAGATTGCAAGAACCTCCTTTCCGCAATCTTGTGTGAAA
pROK2-362  (804) CGAATCACACCAGATTGCAAGAACCTCCTTTCCGCAATCTTGTGTGAAA

DRK362      (735) TCCCTCTAAGAGGATCACTATTCTGAGATAAAGAAACATCCTTGGTTCT
pROK2-362  (854) TCCCTCTAAGAGGATCACTATTCTGAGATAAAGAAACATCCTTGGTTCT

DRK362      (785) TAAAGAATCTACCAAAAGAACTGATGGATGTTGAGCACCGGAAATTCGAA
pROK2-362  (904) TAAAGAATCTACCAAAAGAACTGATGGATGTTGAGCACCGGAAATTCGAA

DRK362      (835) GAATCTTCAGAGCAACTACAACAAAGTGTGAAGAAATCATGAAGATGAT
pROK2-362  (954) GAATCTTCAGAGCAACTACAACAAAGTGTGAAGAAATCATGAAGATGAT

DRK362      (885) ACAAGAAGCTAAAAACCTGGAGTAGTGTCAAATCTGATGGGAAAGACC
pROK2-362  (1004) ACAAGAAGCTAAAAACCTGGAGTAGTGTCAAATCTGATGGGAAAGACC

DRK362      (935) CTGCAGGGACAACAGAACAGATGATTAGAGGAAAGACCTCGAATCGGAA
pROK2-362  (1054) CTGCAGGGACAACAGAACAGATGATTAGAGGAAAGACCTCGAATCGGAA

DRK362      (985) ATTGACAGCAGCAATGACTTGTCTGTTATGTTCTGA
pROK2-362  (1081) -----

```

Figura 9: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de pROK-2-S362 y *Drk362*. Los nucleótidos idénticos se resaltan en gris, los nucleótidos que varían se resaltan en celeste en la secuencia de *Drk362* y en blanco en la secuencia de pROK-2-S362. En la misma también se observa subrayada la secuencia de la construcción correspondiente al vector pROK-2 y resaltado en celeste al final la secuencia de *Drk362* que no fue deducida en la secuenciación de la construcción.

En el alineamiento se observa un alto índice de identidad de la secuencia nucleotídica correspondiente al inserto de pROK-2-S362 con *Drk362*. Sin embargo se observa que la secuencia de pROK-2-S362 no abarca la totalidad del inserto por lo que se debería diseñar un cebador que hibride con el vector dentro de la secuencia terminadora TNOS en orientación antisentido que permita obtener la secuencia del extremo 3' faltante del inserto. Además, se observa variación en 3 nucleótidos en las posiciones 128, 303 y 888 relativas a *Drk362*. Se analizó la implicancia de estos 3 cambios de nucleótidos. En primer lugar, se analizaron las zonas que contienen los 3 nucleótidos variantes para conocer si existía algún sitio de restricción que pudiera ser utilizado para complementar la determinación de la secuencia. No se observó sitio de restricción para enzimas que reconocen secuencias de 6-8 bases. Por otro lado, se realizó la traducción de la secuencia del inserto y la secuencia aminoacídica deducida fue alineada con DRK362 (datos no mostrados). En este caso se observa el cambio de dos aminoácidos: ácido aspártico (D; aminoácido ácido) por glicina (G; aminoácido polar) y glutamina (Q; aminoácido básico) por histidina (H; aminoácido polar) en las posiciones 43 y 246 de las proteínas, respectivamente. Estos cambios son debidos a los cambios en los nucleótidos de las posiciones 128 y 888 respectivamente. Los mismos no afectan la señal de localización nuclear ni los aminoácidos invariantes para quinasas. Para el caso del nucleótido en la posición 303 no se produce una variación de aminoácidos ya que este cae en la tercera posición del codón produciendo un cambio sinónimo entre los codones GTT y GCC, ambos codifican para el aminoácido alanina (A) en la posición 101 de la proteína.

En conclusión, la construcción de sobreexpresión pROK-2-S362 aparentemente se habría obtenido de manera adecuada, conteniendo la secuencia codificante del gen *Drk362* bajo el control del promotor 35S para su correcta expresión *in planta*. No obstante es necesario secuenciar nuevamente la región sin deducir para asegurar que no existan modificaciones en la misma que pudieran afectar la expresión del gen.

Transformación de plantas de papa mediada por *A. tumefaciens*.

Una vez obtenida la construcción pROK-2-S362 la misma fue utilizada para la transformación de plantas de papa mediada por la bacteria *A. tumefaciens*. En primera instancia, se transformaron células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* C58C1-Ti pGV3850 (Deblaere et al, 1985). Dicha transformación fue seleccionada en medio YEP Rf-Cb-Km sólido. Se obtuvieron dos colonias resistentes, las cuales fueron estriadas nuevamente en medio YEP Rf-Cb-Km sólido. A partir de las estrias se realizaron cultivos líquidos en medio YEP-Cb-Km y se purificaron plásmidos para su análisis.

El análisis de clones positivos para la transformación fue realizado mediante PCR (Materiales y Métodos). Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa 1% (Figura 10). Para ambos clones analizados se obtuvo el fragmento de 1035pb correspondiente a la secuencia codificante *Drk362*, sugiriendo que ambos clones contienen el inserto para sobreexpresión deseado. De estas colonias se realizaron gliceroles para su stock.

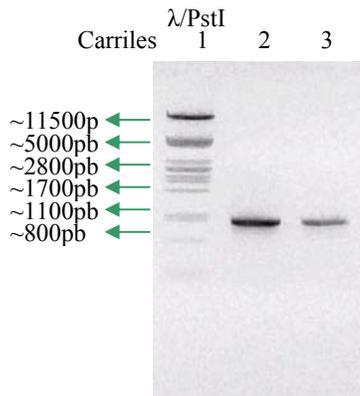


Figura 10: Análisis mediante PCR para la selección de colonias transformantes de *A.tumefaciens*. Carril 1: marcador de peso molecular λ PstI. Carriles 2 y 3: productos de PCR realizada a partir de ADN plasmídico.

Para transformar papa (*S. tuberosum*) se utilizaron explantes de internodos que fueron precultivados en medio inductor callos CIM1 (Figura 11 A). Éstos fueron inoculados con un cultivo de *Agrobacterium* transformadas con la construcción pROK-2-S362. Se cocultivaron los explantes y las bacterias en medio inductor m de callos (CIM1) durante tres días en condiciones de poca luz a fin de disminuir las defensas vegetales de los explantes y por tanto facilitar la infección por la bacteria. Una vez transcurrido este tiempo, fue eliminado el exceso de *Agrobacterium* de los explantes mediante lavados con medio MS 3% y Claforan y fueron transferidos a medio selectivo inductor de cayos (CIM2). Este medio contiene Claforan para restringir el desarrollo de la bacteria y Kanamicina para la selección de los explantes transformantes. En el medio CIM 2, los explantes deben ser cultivados hasta el buen desarrollo de cayos (aproximadamente un mes). En el marco de esta tesis se ha llegado hasta la observación de cayos dos semana después de la transferencia a dicho medio (Figura 11 B). Se espera que los cayos se sigan desarrollando de manera adecuada para posteriormente se transferidos a medio inductor de brotes (SIM) y finalmente a medio inductor de raíces (RIM), para el desarrollo de plántulas transgénicas que sobreexpresen el gen *Drk362*.

A **Día 1**
Etapa previa a la infección.



B **Día 15**
Etapa de regeneración.



Figura 11: Transformación de papa con la construcción de sobreexpresión pROK-2-S362, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A) Cultivos de los explantes en medio CIM1, previo a la inoculación con las bacterias transformantes. B) Cultivo de los explantes en medio CIM2, dos semanas después de la infección con las bacterias transformantes. Ya se observa el desarrollo de cayos.

Generación de la construcción génica para el silenciamiento de *Drk362* en papa (*S. tuberosum*).

Con el objetivo de generar la construcción para el silenciamiento del gen *Drk362* en planta, se seleccionó un fragmento del mismo de 250 pb considerándose este un tamaño adecuado en base a la bibliografía (Wesley et al., 2001). Se excluyó la secuencia de localización nuclear y se corroboró que el fragmento seleccionado no presentase homología con otras quinasas vegetales, específicamente de *Solanum lycopersicum*, *Oryzia japonica*, *Physcomitrella patens*, y *Arabidopsis thaliana* (Blast2sequence), a modo de evitar el silenciamiento de genes inespecíficos.

El fragmento, denominado AS362, fue amplificado mediante PCR. La amplificación fue específica y se obtuvo el fragmento de 250 pb como era esperado (Figura 12 A). En dicho fragmento fueron introducidos sitios de restricción para EcoRI en ambos extremos, 5' y 3'. Tanto el fragmento AS362 como el vector pENTR-2B, fueron digeridos con la endonucleasa EcoRI y los fragmentos fueron separados en gel de agarosa 1% (Figura 12 B). Se escindieron las bandas correspondientes al fragmento y al vector, que en este caso libera un fragmento de 300 pb correspondiente al gen letal *ccdB*. Con los fragmentos purificados se realizó la ligación pENTR-2B-AS362, para la obtención de la construcción de “entrada” (Figura 13).

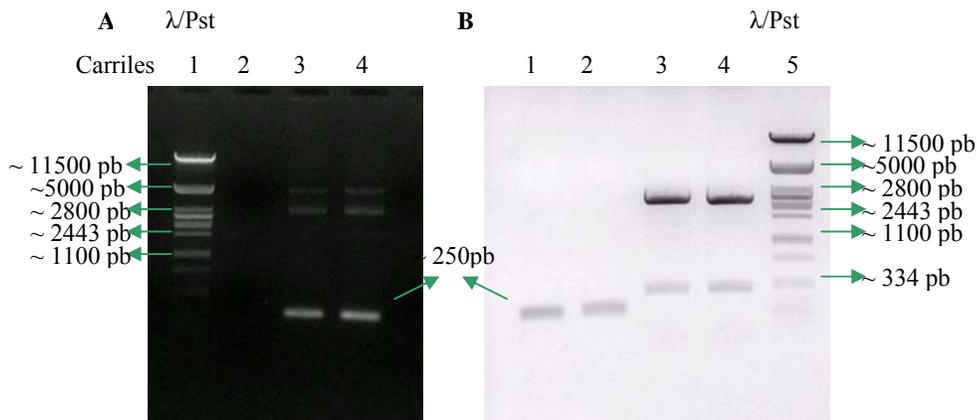


Figura 12: Análisis del producto de PCR y ensayos de restricción en gel de agarosa 1%. A) Productos de PCR: Carril 1, marcador de peso molecular λ /PstI. Carril 2 control – (sin ADN molde). Carriles 3 y 4, productos de PCR AS362. B) Digestión del vector y el inserto con EcoRI: Carriles 1 y 2, AS362 digerido. Carriles 3 y 4, pENTR-2B digerido, se observa banda correspondiente al gen letal *ccdB*. Carril 5, marcador de peso molecular λ /PstI.

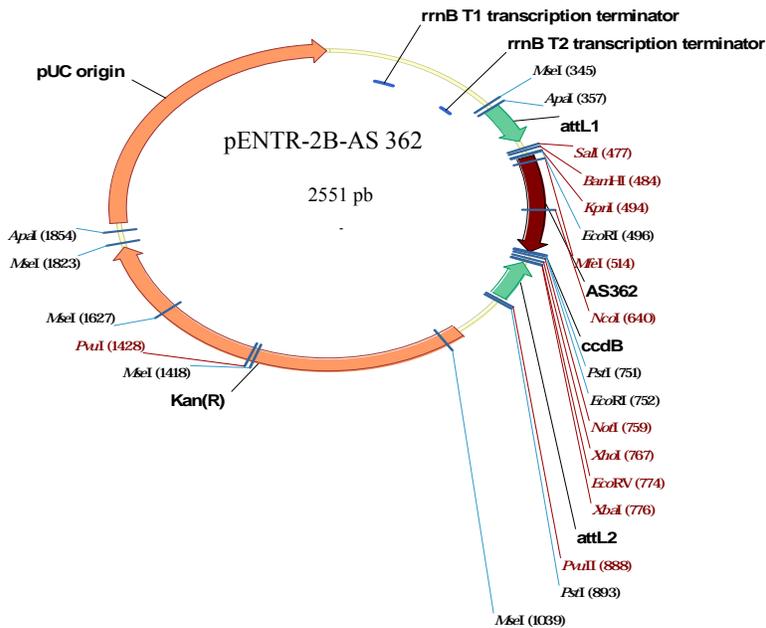


Figura 13: Detalle de la construcción pENTR-2B-AS362. En verde se observan las regiones de recombinación *attL* necesarias para el posterior clonado del fragmento AS362 en el vector de silenciamiento en planta.

La construcción pENTR-2B-AS362 fue utilizada para transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue. La transformación fue seleccionada en medio LB-Km sólido. Se obtuvieron colonias resistentes a kanamicina (resistencia aportada por el vector). De estas fueron estriadas 8 colonias en placas de Petri con LB-Km sólido para ser analizadas posteriormente. Se obtuvo ADN plasmídico de 6 de las colonias estriadas. Para verificar la presencia del inserto se realizó ensayo de restricción con la enzima EcoRI, esperándose liberar el fragmento clonado. En la Figura 14 se observa dicho ensayo en donde se puede ver en los Carriles 2 y 6 la presencia del inserto AS362 (banda tenue de 250pb) y una banda mayor correspondiente a el vector (banda de aproximadamente 2300pb). En los carriles 3, 4 5, y 7 se observa el vector vacío, presentándose en la forma lineal (digerida), circular y súper enrollado. Por la tanto, la construcción pENTR-2B-AS362 fue obtenida en las colonias transformantes correspondientes a los Carriles 2 y 6. De las mismas se realizaron gliceroles para su stock.

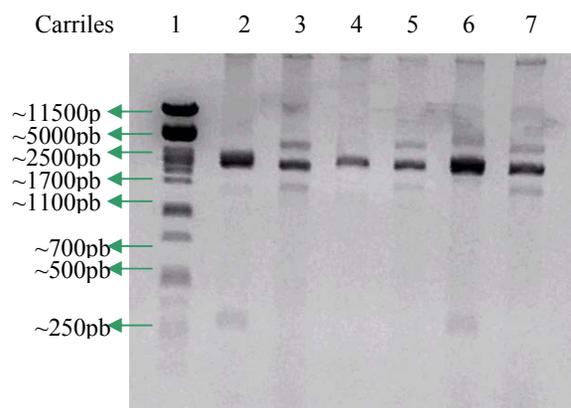


Figura 14: Análisis por restricción para la selección de clones positivos para la construcción pENTR-2B-AS362: Carril 1, marcador de peso molecular λ /PstI. Carriles 2 al 7, ADN plasmídico, obtenido a partir de distintas colonias transformante, digerido con EcoRI. Se observa presencia de inserto en los Carriles 2 y 6.

Una vez clonado el fragmento AS362 en el vector de entrada pENTR-2B dicho ADN quedó flanqueado por los sitios de recombinación *attL*. Posteriormente, mediante recombinación, el fragmento de ADN fue introducido dos veces en el vector destino de silenciamiento en planta pJawohl17-RNAi, el cual contiene regiones *attR* para dicha recombinación. Este vector permite clonar el fragmento del gen a silenciar en 2 orientaciones, sentido y antisentido, separados entre sí por una secuencia de 287 pb correspondiente a un intrón del gen *AtWRKY* (*Arabidopsis thaliana*) (Figura 15 A). De tal forma se genera un transcripto que contiene secuencias auto-complementarias favoreciendo la formación de una estructura en horquilla. Este diseño se basa en varios estudios que indican que para lograr una alta eficiencia en el silenciamiento de un transgen, es recomendable la formación de esta estructura conteniendo una secuencia de 98 a 853 pb del gen a silenciar (Wesley et al., 2001). Se utilizó la clonasa LR (Invitrogen Co., USA) para catalizar el paso de recombinación entre la construcción de entrada pENTR-2B-AS362 y el vector destino pJawohl17-RNAi, obteniéndose la construcción de silenciamiento pJawohl17-AS362 (Figura 15 B).

Con esta construcción se transformaron células de la cepa TOP 10 de *E. coli*, las mismas fueron plaqueadas en medio LB-Amp sólido. Se obtuvieron colonias resistentes y se estriaron 4 de estas colonias en LB-Amp. Se obtuvo ADN plasmídico a partir de las colonias estriadas para su análisis. Debido a que el vector pJawohl17-RNAi es un vector modificado, del cual no tenemos acceso a su secuencia completa, fue realizado un esquema posible del mismo basado en la secuencias conocidas del vector pJawohlh-18-RNAi y de los elementos que lo componen, a fin de poder idear un ensayo de restricción para la verificación de la presencia del inserto (Figura 15). Se analizaron las colonias transformantes mediante restricción con la enzima NcoI que corta una vez en el inserto, digiriéndose ADN plasmídico de dos de los clones estriados y ADN correspondiente a pJawohlh-17-RNAi sin inserto, a fin de comparar los distintos patrones de restricción. También fueron analizados los 4 clones mediante PCR a partir del ADN plasmídico

bajo las mismas condiciones que se han descrito en el apartado “Amplificación de los insertos mediante PCR” (Materiales y Métodos) (Figura 16).

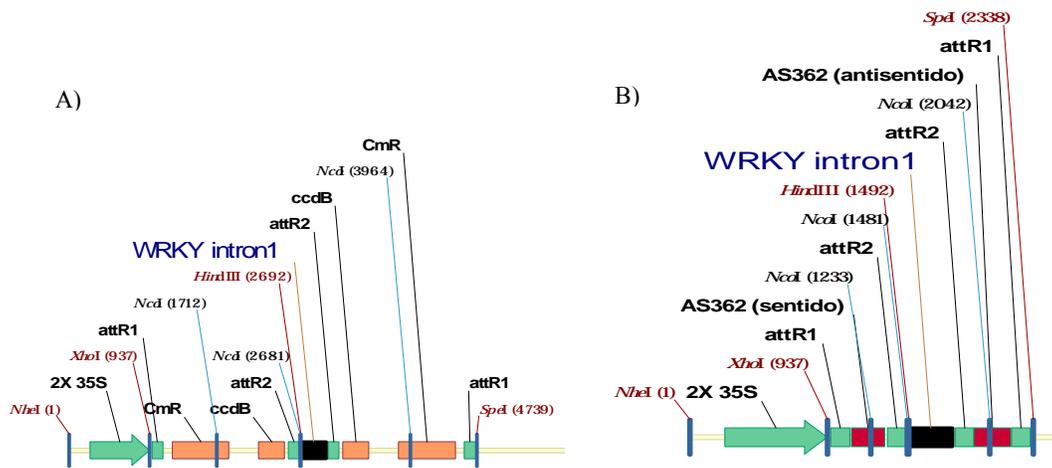


Figura 15: A) Esquema del vector pJawohl-17-RNAi donde se observa los sitios de recombinación y el promotor de expresión en planta 35S. Los sitios de restricción fueron deducidos a partir de datos obtenidos del vector de tipo Gateway pJawohl-18-RNAi y la secuencia de los elementos conocidos. B) Esquema de la construcción pJawohl-17-AS362, luego de la recombinación conteniendo el inserto en orientaciones sentido y antisentido.

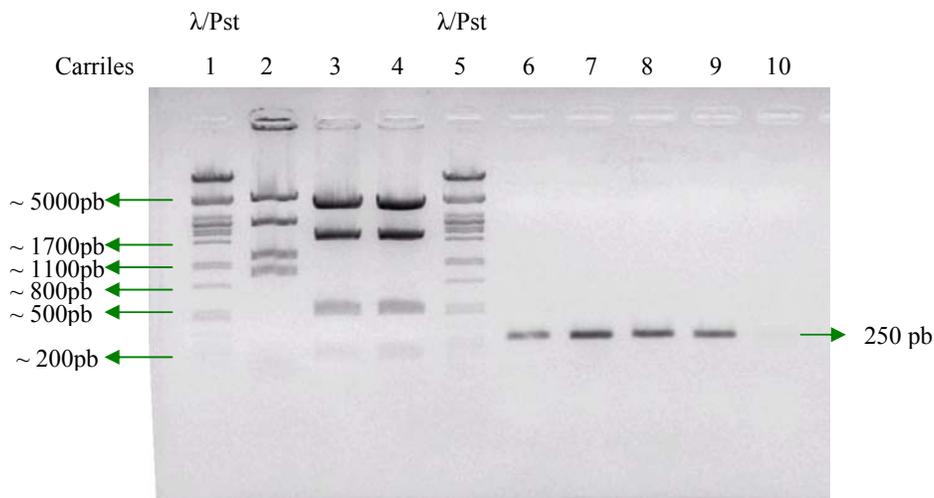


Figura 16: Análisis de clones positivos para la transformación con pJawohl17-AS362. Carriles 1 y 5, marcador de peso molecular λ /PstI. Carril 2, vector pJawohl-17-RNAi digerido con la endonucleasa NcoI. Carriles 3 y 4, ADN plasmídico de distintos clones transformantes digerido con NcoI. Carriles 6 al 9, productos de PCR a partir del ADN plasmídico obtenido de las cuatro colonias transformantes estriadas. Carril 10, control negativo para la técnica de PCR (sin ADN molde).

En la figura 16 se puede observar que el análisis mediante PCR confirma la presencia del inserto AS362 en la construcción, sin embargo este análisis no discrimina si el inserto se encuentra clonado en ambas orientaciones (Carriles 6 al 10). En la misma figura también se observa que los clones analizados por restricción (Carriles 3 y 4) presentan un patrón de fragmentos distintos al del vector vacío (Carril 2) digerido con la misma enzima (NcoI). Según el diagrama deducido para el vector pJawohl-17-RNAi (Figura 15 A), una vez digerido el mismo con la endonucleasa NcoI se espera obtener fragmentos de restricción de aproximadamente 988 pb, 1272 pb y 7179 pb (tamaño total del vector de 9439 pb). Los dos primeros fragmentos se observan en la figura mientras que no se observa el fragmento de 7179pb, sin embargo se ven dos bandas de aproximadamente 5000 pb y 2200 pb que sumadas dan el tamaño esperado, por lo que deducimos que la enzima NcoI debe cortar una vez más dentro de dicho fragmento. Si observamos el esquema de la construcción pJawohl-17-AS362 (Figura 15 B), vemos que luego de la recombinación son extraídos 1450 pb entre cada región *att* que comprenden al gen letal *ccdB* y sustituidos por 250 pb del inserto, y el tamaño total de la construcción pasa a ser entonces de aproximadamente 7039 pb. Este cambio modifica el patrón de restricción de NcoI ya que son extraídos dos sitios de restricción contenidos en el gen letal y son sustituidos por dos sitios contenidos en los fragmentos AS362 insertados. Por lo tanto para la construcción pJawohl-17-AS362 se espera obtener fragmentos de restricción con la endonucleasa NcoI de aproximadamente 250 pb, 600 pb, 4500 pb y 1600 pb, dicho patrón es observado en la Figura 16 (Carriles 2 al 4).

Para confirmar que la obtención de la construcción de silenciamiento es la adecuada, se envió a secuenciar la misma con el cebador p35S el cual hibrida con el promotor de expresión. La secuencia obtenida se observa en la Figura 17, donde se puede ver la secuencia correspondiente al inserto subrayada. La secuencia subsiguiente a la misma corresponde al vector, más precisamente al intrón AtWRKY (representada en *itálicas*). Debido a la baja resolución del servicio de secuenciación no se pudo llegar a confirmar la presencia del segundo inserto (AS362 en orientación antisentido).

En conclusión, teniendo en cuenta estos resultados y el sistema de clonación utilizado, aparentemente el inserto AS362 se habría clonado en orientaciones sentido y antisentido. Así mismo, para reconfirmar y asegurar que el inserto se encuentra de manera precisa para el silenciamiento del gen se ha diseñado un cebador interno al intrón en orientación sentido a modo de poder secuenciar el segundo inserto.

```

NNNNNNNTTTCATTGGNNNNNNNCNNAAGANGATCCACCTGANGATCACAAGTTTGTACAAAAAAGC
AGGCTGGCGCCGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCGAATTCCGTCGCATTTGGCAATTGTTAT
GGAGTATGCAGCAGGTGGAGAACTTTTTGGTAGAATATGCAGTGCTGGCAGATTTAGTGAAGATGAG
GCTCGTTTCTTCTCCAACAGCTTATATCCGGTGTCTAGCTACTGTCATACCNTGGAAATTTGTCACAG
GGACTTGAACCTGGAAAACTCTTATTGATGGAAGTCCTTCGCCACGTCTAAAAATATGTGATTTG
GTTATTCCAAGTCTGGTTTGTCTGCAGAAATTCGGCGCGCACTCNAGATATCTAGACCCANCTTCTGTGAC
AAAGTGGTGATAANCCAGTCCCGGGCGATGAATTCCTGTGGTTGGAGAAGCTANAACCTGCAAAACAATCCC
AAGAATTGTTCAGACTTCNAGAAAAAGAGACAAATAGCANNAACATANTTNAAGAAAAGAGTCGAGAGTTGA
CTCTAAANAGTCTTTCTCTCNTTTGAAAANCGTTGACNCNNTAANCNTTATNNACTTCCCNATCNVNN
ANTNNTTNTNNAANATGTTTANANNNNNNNGNATNCANT

```

Figura 17: Secuencia obtenida a partir de ADN plasmídico de colonias transformadas con la construcción pJawohl17-AS362 en formato FASTA. En letras subrayadas se representa la secuencia correspondiente al inserto AS362 y en letras *itálicas* la secuencia correspondiente al intrón vegetal AtWRKY perteneciente al vector.

Conclusiones y perspectivas futuras

Se pudo establecer la secuencia codificante completa del gen *Drk362*. Mediante análisis bioinformático se determinó que el mismo codifica una posible serina/treonina quinasa de 339 aminoácidos conteniendo un sitio de localización nuclear (DRK362).

En la búsqueda de secuencias homologas a *Drk362* fue hallada una secuencia perteneciente a *Solanum tuberosum* denominada *SAPK8-like serin/treonin kinase*. Dicha secuencia corresponde a un ensamblaje bioinformático de distintos ARNm realizado en la base de datos PlantGDB de las que no se obtiene mayor detalle de su obtención. Por lo tanto no se puede asegurar que esta secuencia exista y que codifique para una proteína real. Tomando en cuenta esto, la baja similitud de DRK362 con la hipotética proteína codificada por *SAPK8-like serin/treonin kinase* en comparación con otras quinasa vegetales y que no existen datos bioquímicos ni funcionales de esta última, no se puede obtener mayores conclusiones al respecto.

Los estudios de similitud de DRK 362 con otras quinasa vegetales y los análisis bibliográficos sugieren que esta posible proteína quinasa estaría involucrada en vías de respuestas de defensa vegetal, siendo necesario confirmar los patrones de expresión del gen y un análisis funcional de la misma. Para el análisis funcional de DRK362 y su detección en planta, se sugiere la generación de anticuerpos policlonales mediante su expresión en un sistema recombinante. Dichos anticuerpos servirán como herramienta para la detección de la proteína, ya sea en ensayos de Western blot como de inmunohistoquímica en material vegetal. Que DRK362 posea una región de localización nuclear puede significar que la misma esté implicada en vías de regulación a nivel de este compartimento. Para establecer si esto es así o si está dirigida a algún otro compartimento, se debería determinar su localización subcelular para lo cual se sugiere la transformación de protoplastos con una construcción que exprese la proteína fusionada a GFP (*Green fluorescent protein*).

La construcción de sobreexpresión pROK-2-S362 fue aparentemente obtenida dado que los análisis de restricción muestran bandas de tamaño esperados. La secuenciación de la misma, si bien debe ser mejorada, indica que el gen *Drk362* fue insertado bajo el control del promotor 35S para su correcta expresión *in planta*. El análisis de las diferencias encontradas entre la secuencia del inserto y la secuencia de *Drk362* mostró que las mismas no afectan regiones importantes como la señal de localización nuclear y los aminoácidos invariantes de las proteínas quinasa.

La construcción para el silenciamiento del gen *Drk362*, pJaowhl-17-AS 362, fue aparentemente obtenida de manera adecuada en base a los patrones de restricción analizados y a la secuenciación de la misma. No obstante se necesita una mejor secuenciación de la construcción que abarque a el segundo inserto, para esto ya se ha diseñado un cebador interno al intrón *AtWRKY*.

Con la construcción de sobreexpresión fueron transformadas plantas de papa (*Solanum tuberosum*). En el mencionado proceso de transformación se llegó hasta la inducción de callos, siendo los pasos a seguir la inducción de brotes y raíces hasta la obtención de plántulas transformantes que sobreexpresen el gen *Drk362*.

En el marco de este trabajo se han generado una serie de herramientas que permitirán a futuro la generación de líneas transgénicas de papa, tanto para la sobreexpresión como para el silenciamiento del gen *Drk362*, lo cual es fundamental para la realización de estudios de genómica funcional. Estas líneas vegetales permitirán analizar sus respuestas frente a condiciones de estrés, como por ejemplo tratamientos con filtrado de cultivo (conteniendo distintos elicitores bacterianos), ácido salicílico, metiljasmonato y ABA. Estas repuestas podrán ser analizadas a nivel histológico como molecular, ya sea mediante Western blot, inmuno- histoquímica y/o RT-PCR, y permitirán dilucidar el posible rol de esta quinasa en las respuestas de defensa vegetal.

Bibliografía.

- Agrios GN.** (2004). "Plant Pathology". Ed.5. Academia Press, San Diego, CA. ISBN 0-12-044565-4.
- Ali GS & Reddy ASN.** (2008) "PAMP-tiggered immunity. Early events in the activation of FLAGELIN SENSITIVE2". *Plant Signaling & Behaviour* **3** (6): 423-426.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Smith J, Seidman J, Struhi K.** (2002) "Currents protocols in Molecular Biology". John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-50338-X.
- Baulcombe DC, Saunders GR, Bevan MW, Mayo MA, Harrison BD.** (1986) "Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants". *Nature* **321**: 446-449.
- Bentancor M, Vidal S.** (2006) "Búsqueda de genes involucrados en la respuesta frente a PVY en *Solanum tuberosum*". Trabajo especial II; Licenciatura en Bioquímica; Fac. Ciencias.
- Cullis CA.** (2004) "Plant genomics and proteomics". John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-37314-1.
- Dangl JL & Jones JDG.** (2006) "The plant immune system". *Nature* **444**: 323-329.
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Devoeck F, Schell J, van Montagu M, Leemans J.** (1985) "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants". *Nucleic Acids Res* **13**: 4777-4788.
- Flor HH** (1971) "Currents status of gene-for-gene". *Annv. Rev. Phytopatol.* **9**: 275-296.
- Hammond-Kosack KE & Jones JDG** (1997) "Plants disease resistance genes". *Plant Physiol.* **48**: 575-607.
- He SY & Boller T** (2009) "Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens". *Science* **324**: 742-744.
- Kang L, Zhou JM, He SY, Thilmoney R, Tang X, Xiao F, Zhao T, Li J.** (2003) "Interplay of *Arabidopsis* nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence". *PNAS* **100** (6): 3519-3524.
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T.** (2004) "Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid". *Plant Cell* **16**: 1163-1177.
- Lee SH, Lee MH, Chung WI, Liu JR.** (1998) "WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate". *Mol. Gen. Genet.* **259**: 516-522

- Ludwig A, Romeos T, Jones J, Pasternak C, Hirsch O, Remark G, Felix G, Suitor H.** (2005) "Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinases and MAPKs signalling controls stress responses in plants". *PNAS* **102** (30): 10736-10741.
- Montesano M, Broader G, Palma T.** (2003) "Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants". *Mol. Plant. Pathol.* **4** (1): 73-79.
- Montesano M, Koiv V, Mäe A, Palva T** (2001). "Novel receptor-like protein kinases induced by *Erwinia carotovora* and short oligogalacturonides in potato". *Mol. Plant Pathol.* **2**(6):339-346.
- Mudgett MB, Kim J, Li X, Roden JA, Taylor KW, Aakre CD, Su B, Lalonde S, Kirik A, Chen Y, Baranage G, McLane H, Martin G.** (2009) "*Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-Triggered immunity and interacts with tomato atypical receptor-like kinase and TFT1". *Plant cell* **21**: 1305-1323.
- Murashige T, Skoog F** (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Mysore KS & Ryu C-M.** (2004) "Nonhost resistance: how much do we know". *TRENDS in Plant Sc.* **9** (2): 97-104.
- Pedley KF, Martin GB.** (2004) "Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato". *J. Biol. Chem.* **279**: 49229-49235.
- Ren D, Liu Y, Li GJ, Yang KY, Zhang S.** (2006) "Activation of Ntf4, a Tobacco Mitogen-Activated Protein Kinase, during Plant Defense Response and its involvement in Hypersensitive Response-Like Cell Death". *Plant Physiol.* **141**: 1482-1493
- Ron M & Avni A.** (2004) "The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato". *Plant cell* **16**: 1604-1615.
- Sheen J, Cho Y, Yoo S.** (2007) "Arabidopsis mesophyll protoplast: a versatile cell system for transient gene expression analysis". *Nature protocols* **2**: 1565-1572.
- Sheen J, Shan L, He P.** (2007) "Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions". *Cell. Microbiol.* **9** (6): 1385-1396.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG.** (1995) "Molecular genetics of plant disease resistance". *Science* **268**, 661-667
- Van der Biezen EA & Jones JDG** (1998) "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept". *Trends in Biochem. Sc.* **12**: 454-456.
- Wesley V, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Wetherhouse**

PM. (2001) "Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants". *Plant J* **27**: 581-590.

Yang K-L, Liu Y, Zhang S. (2001) "Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco". *PNAS* **98** (2): 741-746.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Ana, Cecilia, Marcel, Alexandra, AnaP y Juan Pablo, por enseñarme casi todo lo que sé, aconsejarme y apoyarme, y sobre todo hacer las horas de trabajo muy amenas. En especial agradecer a Rosario por orientarme estos últimos meses, ser una gran guía y por la paciencia. Un gran agradecimiento a Sabina por su generosidad y su buena disposición siempre para ayudarme, por ser un ejemplo en lo profesional y en lo humano. Agradecer a Marcos por su tutoría y darme la oportunidad. Todos, a su modo, han forjado el comienzo de mi carrera y construyeron los pilares para que me pueda seguir desarrollando.

Agradecer al Dr. Omar Borsani por facilitarme el vector pJawohl-17-RNAi.

Un agradecimiento especial a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, ya que esta tesis fue realizada en el marco de la beca de Iniciación a la Investigación (BE_INI_2008_322).

En lo personal, agradecer a mis padres por la educación que me brindaron, por darme la oportunidad de elegir qué estudiar aún sin entenderlo, darme los medios sin cuestionarme. A mis hermanas Daniela, Mónica, Cecilia y Eliana les agradezco lo que soy, un poco de cada una porque de cada una he aprendido, por su amor y estar conmigo siempre. También le quiero agradecer a mis sobrinos Gonza, Gime, Pipy y Lucia (que viene en camino) por la alegría que me dan y me darán. Mi familia ha forjado mi persona de lo que me puedo sentir orgullosa.

A mis amigas y compañeras de carrera Flor y Pilu, agradecerles por su amistad, las jornadas de estudio y el aguante.

Por último, pero no menos especial, agradecer a Buhbuh porque de un tiempo a esta parte se ha convertido en la felicidad y la fortaleza de cada uno de mis días y por hacerme creer que absolutamente todo vale la pena. A él va éste y cada uno de mis logros de ahora en más.