

Análisis de CRKs en respuestas defensivas de tomate frente a fitpatógenos.

Bruno Rafael Mozzo Muhlethaler.

Orientador: Dr. Marcos Montesano

Laboratorio de Fisiología Vegetal

Tesis para optar por el título de Magíster en Ciencias Biológicas, orientación Biología Celular y Molecular (PEDECIBA).

Índice de contenidos.

	Página
Carátula	1
índice de contenidos	2
índice de abreviaciones	4
Resumen	6
Introducción	7
Interacciones planta-patógeno	7
Evasión de la respuesta de defensa por parte del patógeno	11
Modelo de las interacciones planta patógenos	11
Principales mecanismos de defensa vegetales	12
Inmunidad inducida por efectores (ETI)	13
Efectores	14
Reconocimiento de Efectores: proteínas R	15
Reconocimiento intracelular de efectores: NB-LRRs.	16
Respuestas sistémicas	17
CRKs	19
<i>Solanum lycopersicum</i>	19
<i>Solanum tuberosum</i>	20
Antecedentes	22
Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Resultados y discusión	26
Generación de semillas de tomate	26
Construcción genética <i>PRK2-Cmyc-His6-PROK2</i>	27
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción genética	30
Transformación de tomate con la construcción genética, micropragación y observación fenotípica	31
Análisis de los patrones de expresión proteica en tomate	35
Detección de PRK2 mediante western blot	36
Ensayos de infección de tomate con hongos	38
Búsqueda y análisis bioinformático de CRKs de tomate	39
Análisis a nivel de proteínas	39
Análisis a nivel de ADN y ARN	43
Análisis a nivel de promotores	44
Estudio de las relaciones filogenéticas de los CRKs de tomate	46
Análisis de expresión de CRKs frente a infecciones con <i>Botrytis cinerea</i>	48

Conclusiones finales	50
Materiales y métodos	53
Especies vegetales utilizadas	54
Especies y cepas bacterianas utilizadas	54
Vectores	54
Gliceroles	54
Extracción de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	55
Extracción de ADN plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
Medición de la concentración de ADN	56
Reacciones de PCR de tiempo finalidad	56
Extracciones de productos de PCR	57
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	57
Extracción de bandas en gel de agarosa	58
Ligación de secuencias de ADN para la construcción	58
Transformación genética de bacterias	58
Transformación genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	59
Transformación genética de tomate	59
Extracción de ADN de tomate	60
Secuenciación de ADN	61
Mantenimiento de hongos y realización de ensayos de infección en tomate	61
Extracción de ARN de tomate	61
Retrotranscripción	62
Extracción de muestras proteicas de plantas	62
Medición de las concentraciones proteicas	63
Protocolo para aumentar las concentraciones proteicas	63
Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE	64
Protocolo de Western blot para detección de PRK2	65
PCR cuantitativa	66
Referencias bibliográficas	67

Indice de abreviaciones.

ABA	Acido absísico
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CF	filtrado de cultivo libre de células
chr	cromosoma
CRK	<i>Cistein rich receptor like kinase</i>
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
Et	etileno
HI	hidrofílicas (fracción de proteínas)
HO	hidrofóbicas (fracción de proteínas)
ISR	<i>induced systemic resistance</i>
JA	ácido jasmónico
KAc	acetato de potasio
kD	kiloDalton
LB	medio Luria-Bertani
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
M	molar

MAMP	<i>Microbe Associated Molecular Pattern</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloruro de sodio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD600	densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
pb	pares de bases
Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	peso molecular
PRK	<i>Potato Receptor-like Kinase</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTI	<i>Pathogen-Triggered Immunity</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RLK	<i>Receptor-Like Kinase</i>
SA	ácido salicílico
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	dodecil sulfato sódico
uL	microlitro
uM	micromolar

Resumen.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más consumidas del mundo y, al igual que muchas otras plantas importantes a nivel comercial, es afectada por enfermedades causadas por un gran número de especies patógenas. El genoma de tomate fue completamente secuenciado en el año 2012; El tamaño de su genoma es de alrededor de 900 mega bases las cuales se distribuyen en 12 cromosomas. Tomate posee un 92% de identidad genómica con papa y se han encontrado algunos genes de tomate que codifican para receptores de la familia CRK (cystein rich receptor like kinase) con un alto índice de homología a receptores quinasa de papa, llamados PRKs (Potato receptor like kinase). Los receptores CRKs se han hallado en muchas especies vegetales y se han vinculado a diferentes funciones, especialmente en la defensa de la planta frente a estrés biótico. Por su parte, los 4 genes que codifican para los PRK en papa (*PRK1*, *PRK2*, *PRK3* y *PRK4*) se inducen por el patógeno bacteriano *Pectobacterium carotovorum* subs *carotovorum* (Pcc). Según investigaciones previas el tratamiento de plantas de papa con filtrado de cultivo de Pcc cepa SCC3193 en hojas y tubérculos induce una rápida acumulación de transcritos de PRKs una hora luego del tratamiento y se mantienen elevados hasta las 24 horas luego del tratamiento. Dados los patrones de expresión génica de los PRK los investigadores plantearon la hipótesis de que estos juegan un importante rol en los mecanismos de defensa de *S. tuberosum* frente a infección con Pcc. Mediante ingeniería genética se generaron líneas de plantas de papa capaces de sobreexpresar el receptor PRK2. Las mismas fueron expuestas frente a algunas especies de patógenos de naturaleza fúngica en ensayos de infección y encontraron indicios de que las plantas que sobreexpresan PRK2 poseen una incrementada resistencia frente a importantes patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp* comparado con papa cultivar Bintje. El presente trabajo posee el objetivo de aportar conocimiento original sobre los receptores CRKs en tomate, enfatizando en sus posibles funciones defensivas frente a fitopatógenos. Primeramente se generaron semillas de tomate las cuales constituirían nuestra base de obtención de material biológico en el trabajo. Se realizó una construcción genética la cual consistió en el ADNc de PRK2 en el vector de transformación PROK2, incluyendo en ella los epítopes 6xhis y cMyc y se transformaron plantas de tomate con dicha construcción utilizando a *A. tumefaciens* como mediador. Se confirmó la presencia del cassette modulador 35S-PRK2-6xhis-cMyc en una planta transformada, se analizó su patrón de expresión proteica comparando con plantas sin transformar y se llevó a cabo un ensayo de Western blot detectando una banda proteica que se corresponde en peso molecular con el receptor PRK2. Con esta planta tomate que expresa PRK2 se están realizando hasta ahora ensayos de infecciones con el objetivo de analizar sus mecanismos de defensa frente a patógenos fúngicos. Por otra parte, se han efectuado búsquedas y análisis de nuevos integrantes de la familia CRK en tomate no descritos hasta el momento utilizando a PRK2 como referencia. Se encontraron 16 genes que codifican para receptores y se halló información detallada a nivel de proteínas, ADN y promotores, lo que permitió asociarlos con vías hormonales y funciones biológicas. Por último se diseñaron primers para cada uno de los genes de CRKs hallados en tomate y con ellos se realizaron ensayos de PCR cuantitativa para analizar su expresión en condiciones de infección con *Botrytis cinerea* y comparando con controles negativos. Solo los primers para 4 genes mostraron una eficiencia aceptable y se observó que dos genes son inducidos por la infección con el patógeno. Los resultados sugieren que estos receptores podrían asociarse a funciones de defensa frente a estrés biótico y abiótico, y quizás también en funciones dentro del ciclo de vida de la planta. Este trabajo puede contribuir como punto de partida para el análisis de la familia proteica de los CRKs en tomate .

Introducción.

Las plantas son organismos capaces de convertir la energía solar en energía química que puede ser almacenada en forma de carbohidratos, proteínas, aceites, y por tanto ser utilizada por los organismos heterótrofos. Durante el proceso consumen dióxido de carbono y generan oxígeno, esencial para los animales y otros organismos. En consecuencia, los animales siempre dependen en forma directa o indirecta de las plantas como fuente de energía y de oxígeno para la subsistencia (Agrios 2005). Las plantas ocupan la mayoría de los ecosistemas naturales, desde bosques hasta praderas o ecosistemas acuáticos y gran superficie del territorio fértil es utilizado para la agricultura de manera de producir alimentos para la humanidad.

La práctica de la agricultura tiene sus orígenes en la prehistoria, cuando los hombres comenzaron a cultivar plantas como una manera de procurarse alimento de forma más sencilla y productiva. Para los arqueólogos, la agricultura fue un componente central en los cambios culturales que se asocian a los comienzos del Neolítico. En este sentido, la capacidad de adaptación de las plantas a ser cultivadas fue vital para cambiar el estilo de vida del hombre y pasar de ser un nómada cazador-recolector para construir una sociedad agricultora. La transición a la agricultura fue un proceso con episodios múltiples que comenzó con la recolección de especies salvajes y concluyó con el cultivo de plantas que sufrieron una serie de cambios genéticos y fenotípicos que caracterizan los cultivos domesticados. Desde ese entonces, el hombre ha domesticado diversas especies de plantas y ha seleccionado en ellas, a lo largo de los siglos e incluso milenios, características deseadas como la producción de frutos más grandes, mayor producción de los mismos y menores tiempos de desarrollo, entre otros. En la actualidad se cultivan especies que fueron domesticadas desde hace más de 10000 años en diversos lugares como América Central, Nueva Guinea y la Mesopotamia (Agrios 2005; Brown et al. 2009; Tang et al. 2010). Durante los procesos de domesticación se ha utilizado la selección genética enfocada a la producción y se ha perdido gran parte de la diversidad que estas especies poseían en su forma salvaje. Esta pérdida de diversidad tiene como consecuencia algunas características no deseadas para la agricultura como por ejemplo la mayor susceptibilidad de los cultivos a enfermedades y a cambios ambientales repentinos.

Interacciones planta-Patógeno.

Las plantas son organismos sésiles, incapaces de desplazarse, que conviven en su ambiente con una gran variedad de organismos, los cuales pueden ser benéficos, neutrales o patógenos. Cuando las plantas perciben alguna amenaza, se inician inmediatamente mecanismos de señalización que derivan generalmente en respuestas defensivas. 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 al desarrollo de la enfermedad (Flor 1971).

Las enfermedades que afectan a las plantas dan lugar a grandes pérdidas económicas, que obligan en algunos casos a la utilización de pesticidas y productos químicos tóxicos, generando graves riesgos para los ecosistemas circundantes y la salud humana. Se han descrito aproximadamente unas 11.000 enfermedades en plantas, las cuales son causadas por cerca de 120 géneros de hongos, 30 tipos de virus y 8 géneros de bacterias y algunas decenas de géneros de

nemátodos (Baker et al., 1997; Montesinos et al., 2002) (figura 1). Las pérdidas en la producción mundial de cultivos alimenticios causadas por patógenos, resultan muy difíciles de calcular (Agrios, 2005).

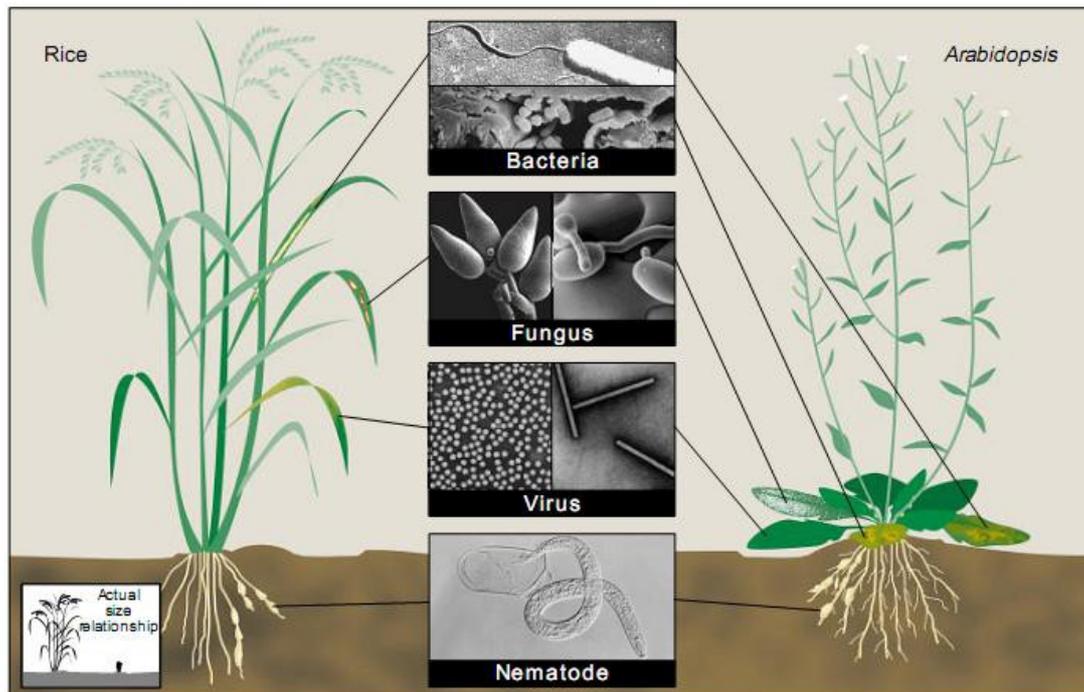


Figura 1. Ilustración de las diferentes clases de patógenos que enferman a las plantas de arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thaliana* y de algunos de los síntomas que los mismos causan. Tomado de Baker et al. (1997).

Respecto a los patógenos, éstos pueden clasificarse en necrótrofos, biótrofos y hemibiótrofos, dependiendo de su ciclo de vida. Dentro de los patógenos necrótrofos se encuentran aquellos en que la célula de la planta muere a causa de la infección, y los mismos se alimentan de los restos de tejidos muertos o necrosados. Generalmente liberan enzimas que degradan la pared celular vegetal y maceran los tejidos (Veronese et al., 2006). Contrariamente, los patógenos biótrofos son aquellos los cuales permiten que la célula de la planta permanezca viva durante la infección y generalmente no producen daño extensivo en ellas. Finalmente, los patógenos hemibiótrofos, son aquellos que en estadios tempranos de la infección se comportan como biotrofos y en estadios tardíos como necrótrofos (Ballaré 2011; Ponce de León y Montesano 2013).

Las respuestas de defensa vegetal pueden ser controladas directa o indirectamente por genes de la planta hospedera y por la interacción con el patógeno. Por tanto, la resistencia frente a los mismos puede ser clasificada según el número de genes involucrados en resistencia monogénica o de gen R (gen de resistencia), que involucra uno o pocos genes; y resistencia poligénica que generalmente es controlada por muchos más genes, varios de ellos relevantes fisiológicamente para la planta (Agrios 2005).

Para explicar la interacción entre plantas y patógenos Harold Flor propuso el modelo gen-a-gen, el cual comprende el reconocimiento de una proteína codificada por un gen de avirulencia dominante (gen Avr) del patógeno, por una proteína complementaria codificada por un gen dominante de resistencia vegetal (R) (Flor 1971). Cuando uno de los genes Avr o el complementario gen R no se expresan, el reconocimiento por parte de la planta no ocurre, la interacción planta patógeno es compatible y la enfermedad suele ser el resultado. Cuando ambos

actores están presentes, Avr y proteína complementaria R, el reconocimiento ocurre resultando en una interacción incompatible y la resistencia por parte de la planta es el resultado. (Flor 1971; Heil and Bostock 2002). Luego del mencionado reconocimiento, se desencadena una cascada de transducción de señales que conduce al establecimiento de respuestas defensivas por parte de la planta (Staskawicz et al., 1995; Ballaré 2011; Ponce de León y Montesano 2013).

Las proteínas codificadas por los genes R podrían actuar como receptores directos o indirectos de las proteínas Avr (Staskawicz et al. 1995, Belkadir 2004). Los genes R y homólogos generalmente se clasifican en cinco clases, según motivos estructurales comunes (Martin et al, 2003): i) genes que codifican para proteínas con sitios de unión a nucleótidos (NBS), ii) proteínas serina/treonina quinasa, iii) proteínas con dominio de interacción proteica con repetidos ricos en leucina (LRR) el cual podría participar en el reconocimiento y señalización del ataque del patógeno, iv) genes con homología amino-terminal a genes tipo Toll y receptores de interleuquina 1 (TIR: Toll/IL-1R-like) y v) proteínas con domino cremallera de leucina (LZ).

La respuesta inmune de la planta puede desencadenarse mediante el reconocimiento de ciertos patrones moleculares: i) propios del patógeno como los PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) por ejemplo la flagelina, y factores de elongación bacteriano Ef-Tu, ii) patrones propios del microorganismo (patógeno) como los MAMPs (*Microbe Associated Molecular Patterns*) por ejemplo lipopolisacáridos bacterianos y quitina fúngica, y iii) patrones producto del daño tisular que la planta libera por la acción directa del patógeno como los DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*) por ejemplo algunos galacturónidos y la sistemina del tomate (van Loon et al., 2006; Holton et al., 2007, Tor et al., 2009; Ferrari et al., 2013). 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" (Montesano et al., 2003; He et al., 2007).

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

Las *defensas constitutivas* involucran barreras estructurales y químicas preexistentes en la planta siendo la primer línea defensiva con la que se encuentra el patógeno antes de invadir la misma (Agrios 2005). En general, las plantas cuentan con barreras físicoquímicas para impedir dichas invasiones. La pared celular a la cual el patógeno debe adherirse y penetrar para causar la infección es uno de los primeros obstáculos. Sobre la misma se encuentran otras estructuras defensivas para evitar la infección. Estas estructuras comprenden la cantidad y calidad de la cera y de la cutícula que recubren las células epidérmicas vegetales. Las mismas forman una capa hidrofóbica, constituyendo a su vez una barrera física contra el organismo invasor (Agrios, 2005).

Por otra parte, 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. Por otro lado, en los tejidos jóvenes de frutas, hojas y semillas, se encuentran a altas concentraciones, compuestos fenólicos, taninos y algunos compuestos grasos 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 pueden ser divididas en las siguientes ramas: inmunidad inducida por PAMPs o MAMPs (*PAMP Triggered Immunity*, PTI) e inmunidad inducida por efector, o ETI (*Effector Triggered Immunity*, ETI) (Dangl y Jones, 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 PAMPs o MAMPs y DAMPs (van Loon et al., 2006). Los PAMPs son reconocidos, a través de epítopes conservados específicos presentes en los mismos, por receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) en la superficie celular vegetal. Dichos dominios altamente conservados de los PAMPs son funcionalmente importantes para el patógeno (Boller y He, 2009).

El genoma vegetal codifica varios tipos de receptores de PAMPs, MAMPs y DAMPs, 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 quinazas y pueden ser clasificados en diferentes categorías de acuerdo a las características estructurales de los dominios extracelulares. Estas categorías son: (1) Xa21 de arroz y SR160 de tomate, contienen dominios ricos en leucina o LRRs y el último es un importante receptor de DAMPs, (2) *AthLecRK1* de *Arabidopsis*, contiene motivos tipo lectina, (3) *PRK5* de *Arabidopsis*, exhibe similitud a proteínas tipo thauamatina, (4) *CHRK1* de tabaco, exhibe similitud a proteínas tipo quitinasa, (5) *WAK1* de *Arabidopsis*, contiene repetidos tipo EGF (*epidermal growth factor*), (6) *LRK10* de trigo, no posee homología con motivos conocidos y (7) *StPRKs* de papa, presentan un motivo bimodular de cisteínas (Montesano et al., 2003; Tor et al., 2009; Monaghan y Zipfel 2012). 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 plasmática. Existen varios ejemplos de esta clase de receptores, entre ellos uno denominado *LeEix* de la planta de tomate que reconoce al PAMP fúngico glucídico xilanasa (Ron & Avni, 2004).

La activación de los receptores por PAMPs converge en un limitado número de vías de señalización que están asociadas a respuestas de defensa tales como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y cambios en los niveles de Ca^{2+} que, en su conjunto, promueven la expresión de genes relacionados con la defensa, producción de fitoalexinas, deposición de calosa en la pared celular y eventualmente una rápida muerte celular programada localizada conocida como respuesta hipersensible (HR) (Chisholm et al., 2006; He et al.2007).

La principal vía de señalización y la más conservada evolutivamente es la cascada de proteínas quinazas activadas por mitógenos (MAPKs) la cual es capaz de traducir estímulos provenientes de señales extracelulares en respuestas intracelulares (He et al.2007). Un esquema simplificado de cómo se relaciona esta vía con los PAMPs se presenta en la figura 2.

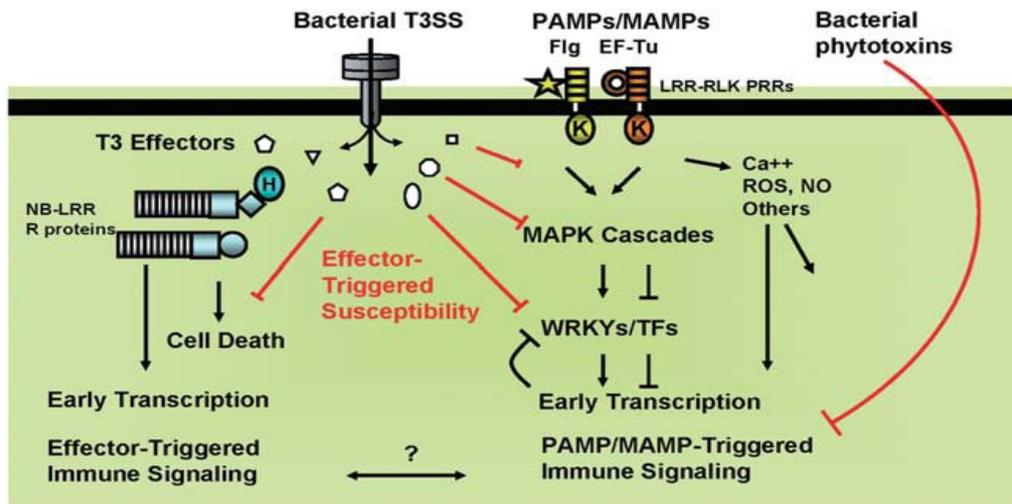


Figura 2. Esquema general de interacciones planta-patógeno. La planta reconoce los PAMPs a través de receptores presentes en la superficie celular y es activada la primera línea de respuesta de defensa (PTI). La señalización de la respuesta defensiva disparada es convergente e incluye la activación de 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). En caso de no eliminar al patógeno con la PTI, se expresan proteínas intracelulares de resistencia para poder detectar los factores específicos de virulencia del patógeno, y se pone en funcionamiento la segunda línea de defensa denominada inmunidad inducida por efector, ETI. Tomado de He et al., (2007).

Evasión de la respuesta de defensa por parte del patógeno.

Muchos patógenos han desarrollado mecanismos mediante los cuales son capaces de evadir o suprimir activamente las respuesta de defensa primaria generadas por el reconocimiento de los PAMPs (Chisholm et al., 2006). Las bacterias fitopatógenas contienen 4 sistemas de secreción, siendo el sistema de secreción tipo III (T3SS) el más estudiado. A través del T3SS la bacteria inyecta múltiples proteínas efectoras (hasta 30 efectores al mismo tiempo) dentro del citoplasma de la célula vegetal (Dangl y Jones, 2006). Los efectores son proteínas producidas por el patógeno que alteran a la célula vegetal o su ambiente, causando enfermedad o disparando la defensa (He y Boller, 2009). Estos entran directamente al citoplasma de la célula hospedera y tienen como blanco diferentes procesos celulares. Muchas proteínas avirulencia (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 (He et al. 2007) (fig. 2). Otra estrategia que han desarrollado las bacterias fitopatógenas es la producción de moléculas efectoras pequeñas que imitan hormonas vegetales. Por ejemplo, en *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 biótrofos y estimulando la apertura de estomas para permitir que las bacterias ganen acceso al apoplasto (Agrios, 2005; Pieterse et al., 2012). Otros efectores han sido identificados posteriormente por su capacidad de ser transportados por el T3SS; los mismos se denominan Hop (Hrp outer protein) en *Pseudomonas*, Xop (*Xanthomonas* outer protein) en *Xanthomonas* o Pop (*Pseudomonas* outer protein, basado en la designación anterior de género) en *Ralstonia* (Alfano and Collmer 2004).

Modelo de las interacciones entre planta y patógeno.

Una vez liberados los efectores dentro de la célula, los mismos son reconocidos por proteínas R activando la segunda línea de defensa conocida como ETI (inmunidad inducida por efector). La respuesta de la ETI es similar a la generada en inmunidad inducida por PAMPs (PTI) pero con mayor intensidad y en algunos casos se observa una respuesta de muerte celular programada (HR) en el sitio de infección (He y Boller, 2009). La respuesta hipersensible es localizada y se piensa que restringe el crecimiento y diseminación del patógeno (Cullis, 2004). La ETI como segundo frente de defensa, es capaz de percibir los efectores que inhiben la PTI a través de receptores adicionales (Boller y He, 2009).

La respuesta inmune de la planta puede ser representado por el modelo “zigzag” propuesto por Dangl y Jones (2006) (Figura 3). Este modelo esta dividido en cuatro fases. En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por PRRs resultando en 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 ETI. La ETI resulta en la resistencia a la enfermedad y frecuentemente en una 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 efector reconocido o adquiriendo nuevos efectores que suprimen ETI.

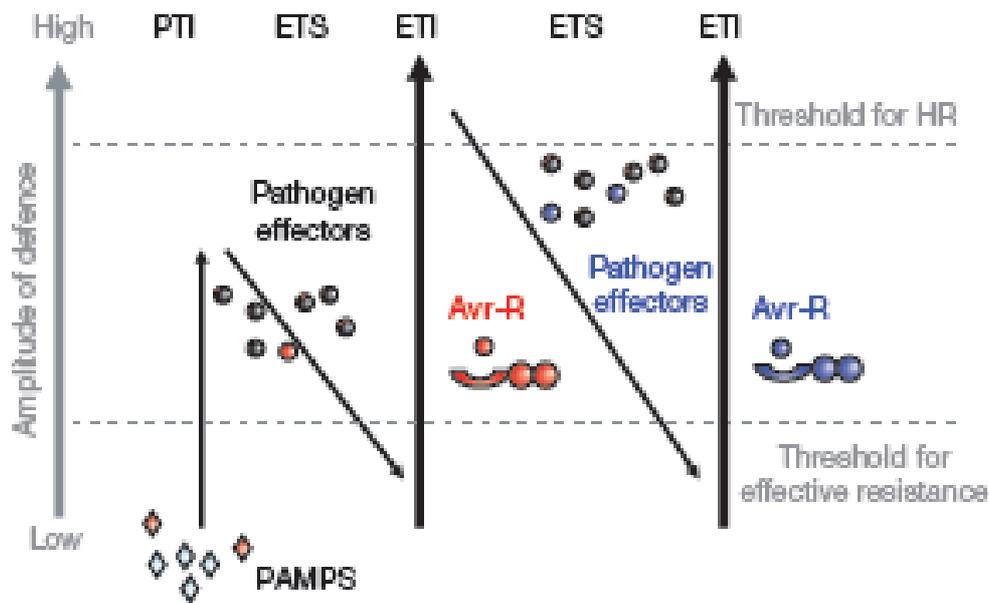


Figura 3. Ilustración de modelo “zigzag”. Se muestra el rendimiento cuantitativo de la respuesta inmune de la planta, en donde la amplitud de la resistencia o de la susceptibilidad es proporcional a (PTI-ETS+ETI). Tomado de Dangl y Jones (2006).

Principales mecanismos de defensa vegetal.

Luego del reconocimiento del patógeno por parte de la planta, se activan diferentes respuestas vegetales para contener al patógeno, algunas de ellas involucran importantes cambios fisiológicos. Una de las respuestas más tempranas frente a dicho reconocimiento es un cambio en

la permeabilidad de la membrana lo que lleva a cambios en los flujos iónicos como ser en el intercambio K^+/H^+ , eflujo de Cl^- y un importante influjo de Ca^{2+} , siendo este último un segundo mensajero clave para numerosos cambios fisiológicos y procesos celulares (White and Broadley, 2003; Jeworutzi et al., 2010). El flujo de iones lleva muchas veces a la alcalinización del medio extracelular (Agrios 2005).

También de manera temprana, los perfiles de expresión génica cambian, se acumulan compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas y se producen ROS y NO. Estos contribuyen a la defensa por poseer acción antimicrobiana, contribuir en el reforzamiento de la pared celular así como también participar en vías de señalamiento para el caso de ROS y por ser mensajero secundario en el caso del NO (Wojtaszek 1997; Torres et al., 2006; Bolwell y Daudi 2009, Pieterse et al., 2012). En etapas tempranas de la respuesta de defensa se producen cambios en los patrones de fosforilación de las proteínas así como la activación de cascadas MAPK (He et al., 2007). Tardíamente se expresan las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRs) las cuales poseen bajo peso molecular con probado efecto deletéreo sobre los patógenos, algunas con actividad glucanasa o quitinasa (capaces de hidrolizar paredes de bacterias y hongos respectivamente). Han sido clasificadas en 17 familias diferentes, aunque no se conoce en profundidad las funciones de algunas. Se pueden encontrar tanto en el apoplasto como en las vacuolas. Aparecen en respuestas locales y sistémicas y su producción aumenta mucho con la respuesta hipersensible (HR) (Cohn et al., 2001; Heil y Bostock, 2002; Edreva 2005; van Loon et al., 2006). Las respuestas locales son aquellas que ocurren o se encuentran restringidas al sitio de infección. Por su parte las respuestas sistémicas ocurren en toda la planta y dependen de señales que parten desde el sitio de infección y llegan a todas las regiones de la planta. Dichas señales inducen la activación de la respuesta sistémica.

Las plantas producen un gran número de hormonas las cuales participan en diversos procesos celulares como el desarrollo y crecimiento, así como en la respuesta de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos. En particular, el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) así como el ácido abscísico (ABA) son hormonas que desempeñan roles de vital importancia en la defensa de la planta contra especies diferentes de patógenos (Mauch-Mani y Mauch 2005; Pieterse et al., 2012).

El SA es acumulado en el sitio de infección, y participa en procesos de señalamiento que desencadenan respuestas de defensa locales así como también sistémicas, observándose un aumento de la expresión en un gran número de proteínas PR entre ellas PR1, PR2 y PR5 (Thomma 1998). El SA es de gran importancia en el establecimiento de SAR (Resistencia Sistémica Adquirida) y su aumento en los tejidos vegetales responde generalmente al ataque por patógenos biótrofos y hemibiótrofos (van Hulten et al., 2006; Bolwell y Daudi, 2009; Pieterse et al., 2012).

El aumento de JA y ET responde al ataque por patógenos necrótrofos e insectos herbívoros; frecuentemente cuando se produce acumulación de JA también se observa acumulación de ET, por lo que en ocasiones se dice que el tipo de respuesta generada es JA/ET dependiente. Una consecuencia de la acumulación de las hormonas JA/ET es la inducción en la expresión de proteínas PR antimicrobianas como PR3, PR4 y defensina PDF 1.2 (Thomma 1998). Las vías de señalamiento del JA son generalmente antagónicas a la vía del SA aunque en algunos casos, por ejemplo ante el ataque de *P.syringae* a *A.thaliana*, ambas vías actúan simultáneamente y se cree que mejoran la resistencia frente a dicho patógeno (Pieterse et al., 2012).

La hormona ABA también participa en la resistencia frente a enfermedades, y su función depende directamente de la modalidad de interacción establecida entre planta-patógeno. Altos niveles de ABA aumentan la susceptibilidad de plantas de *Arabidopsis* frente a la infección por patógenos biótrofos y hemibiótrofos, mientras que niveles inferiores a los encontrados en plantas

wt (tipo salvaje) aumentan la resistencia a la infección por parte de patógenos necrótrofos (Mauch-Mani y Mach 2005). Esta hormona además puede tener un efecto inhibitorio sobre la vía del SA y lo que llegaría a favorecer el establecimiento de la vía del JA en contra de un ataque de herbivoría (Pieterse et al., 2012).

Inmunidad inducida por efectores (ETI).

Cuando las moléculas efectoras son reconocidas por las proteínas R se activa la inmunidad inducida por efectores o ETI, los mecanismos moleculares que se llevan a cabo una vez activada la ETI son muy similares a los observados en la PTI pero con mayor intensidad y en algunos casos se observa la respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección (Dangl y Jones, 2006). Esta potente segunda línea de Inmunidad de la planta se activa por la interacción directa o indirecta de efectores y proteínas R específicos y corresponde al modelo gen a gen planteado por flor en 1971 y ya mencionado anteriormente. La ETI es probablemente el mecanismo de defensa más potente e intenso que posee la planta (Abramovitch et al. 2006; Chisholm et al. 2006).

Efectores.

La secuenciación de los genomas completos de patógenos en conjunto con búsquedas genéticas han llevado a la identificación de numerosos efectores (Grant et al. 2006).

Los efectores T3SS son efectores de bacterias patógenas que se secretan a través del sistema de secreción de tipo 3 o están involucrados en el proceso de secreción (Véase sección “Evasión de la respuesta de defensa por parte del patógeno”).

A diferencia de las bacterias, los hongos y oomycetes patógenos no poseen sistemas de secreción de tipo 3. En general, estos efectores son secretados al apoplasto (Chisholm et al. 2006). La mayoría de los efectores de hongos y oomycetes poseen una señal de secreción de tipo 2 en su extremo N-terminal, lo que sugiere que los mismos son secretados por la vía secretora de tipo 2 de eucariotas que involucra la exocitosis de vesículas provenientes del aparato de Golgi (Panstruga y Dodds 2009). Sin embargo, aunque algunos de estos efectores funcionan en el apoplasto, otros ingresan al citoplasma de la célula vegetal ya que son reconocidos por proteínas R citosólicas y se han detectado en el interior de la célula infectada (Kemen et al. 2005; Panstruga and Dodds 2009).

Numerosos efectores de hongos y bacterias poseen actividad enzimática, algunos de los cuales son los responsables de modificar las proteínas vegetales para promover la virulencia del patógeno y evitar la detección por parte de la planta (Chisholm et al. 2006). Sin embargo, una cepa de un patógeno codifica en su genoma en general un repertorio de 20 o 30 efectores que están altamente regulados y suelen ser funcionalmente redundantes (Dodds and Rathjen 2010). A continuación se mencionan dos ejemplos que describen diferentes formas de redundancia de efectores: El primer ejemplo es la redundancia de los efectores AvrPto y AvrPtoB de la bacteria *Pseudomonas syringae*. Ambos efectores tienen como blanco al complejo FLS2-BAK1; se cree que AvrPtoB posee una doble estrategia para suprimir las quininas: su extremo amino terminal suprime la respuesta a flagelina mediante su interacción con BAK1 (Shan et al. 2008) y su dominio carboxilo terminal tiene actividad E3 ubiquitina ligasa y puede ubiquitinar proteínas de la célula vegetal como la quinasa Fen y otras quininas marcándolas para la degradación por la vía del proteosoma (Rosebrock et al. 2007). Por otro lado, AvrPto presenta también como blanco quininas,

entre las que podemos encontrar a FLS2 y EFR. Probablemente estos efectores supriman la PTI mediante la inhibición de varios receptores quinasa del tipo PRR en una forma no específica (Dodds and Rathjen 2010). Otro ejemplo de redundancia de efectores se da con el gran número de efectores de *P. syringae* que tienen como blanco a la proteína RIN4 (RPM1-interacting protein 4). AvrB, AvrRPM1, AvrRpt2 y HopF2Pto tienen como blanco a esta proteína y utilizan diferentes estrategias moleculares para inhibirla (Axtell and Staskawicz 2003; de Wit 2007; Mackey et al. 2002; Wilton et al. 2010).

Asimismo, también podemos encontrar efectores que no son redundantes y que no poseen como blanco proteínas involucradas en la PTI como en el caso de los efectores de la familia AvrBs3 con actividad TAL (transcription activator-like) de *Xanthomonas* spp. y *Ralstonia solanacearum*. Los efectores con actividad TAL son factores de transcripción que inducen en la planta la transcripción de genes específicos que estimulan el desarrollo de síntomas (Kay and Bonas 2009).

Los efectores eucariotas han sido considerablemente menos estudiados que los efectores bacterianos. En oomycetes, los efectores generalmente poseen una región conservada denominada RXLR (Arg-X-Leu-Arg, siendo X cualquier aminoácido). A raíz de la secuenciación del genoma del oomycete *Phytophthora infestans* se han identificado 563 genes que pertenecen a la familia de efectores RXLR y 196 efectores que pertenecen a la familia CRN (proteínas Crinkler). Estos genes se encuentran en regiones dinámicas del genoma lo que permite cambios evolutivos rápidos proporcionando una ventaja en la “carrera armamentista” con la especie hospedera. Estas regiones aportarían gran plasticidad evolutiva a los genes de efectores generando de esta manera la alta variación génica requerida para evadir el sistema inmune de la planta (Haas et al. 2009, Anderson et al., 2015). Se cuenta con evidencia de la acción de algunos efectores de *P. infestans* en la inhibición de la PTI; por ejemplo Avr3a suprime la muerte celular programada inducida por elicitores mediante la interacción con la proteína CMPG1 E3 ligasa de la planta (Bos et al. 2010). Por otra parte, se han realizado estudios proteómicos de la saliva en el nematodo *Meloidogyne incognita* que llevaron a la identificación de alrededor de 500 proteínas entre las cuales se encuentran muchos potenciales efectores que se solapan con los de nematodos patógenos de mamíferos (Bellafore et al. 2008).

Los efectores virales son en realidad proteínas supresoras del silenciamiento que interfieren con los mecanismos de silenciamiento de ARN de la planta y tienen como blanco enzimas involucradas en dicho proceso como DCL4 (dicer-like 4) o uniéndose a pequeñas moléculas de ARN doble cadena evitando el ensamblaje del complejo enzimático RISC (Speth et al. 2007; Voinnet 2001).

Reconocimiento de Efectores: proteínas R.

El reconocimiento de los efectores por parte de la planta es un evento clave en los mecanismos de defensa, es el segundo mecanismo de percepción del patógeno y lleva a la activación de la inmunidad inducida por efectores (ETI). Las moléculas responsables de este reconocimiento son las proteínas que confieren resistencia a enfermedades (proteínas R). En líneas generales, podemos clasificar las proteínas R en dos grandes clases (figura 4), la primera incluye las proteínas R que comparten una arquitectura conservada: presentan un dominio de unión a nucleótido (NB) seguido de un número variable de repetidos ricos en leucina (LRR) y se denominan proteínas de unión a nucleótido NB-LRR (Takken y Goeverse 2012). Esta clase de proteínas se puede dividir en dos subclases de acuerdo a sus dominios N-terminales: “coiled-coil” CC-NB-LRR y “Toll-Interleukin-1 receptor” TIR-NB-LRR. La segunda clase comprende proteínas que presentan

dominios LRR extracelulares (eLRR) y se pueden separar tres subclases de acuerdo a los dominios estructurales presentes en las mismas: la subclase RLP (receptor-like proteins) presentan un dominio extracelular LRR y un dominio transmembrana; las RLK (receptor-like kinases) tienen un dominio extracelular LRR, un dominio transmembrana y un dominio quinasa intracelular; la tercer subclase se denomina PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein), solo consta de un dominio LRR y está asociada a la pared celular (Chisholm et al. 2006).

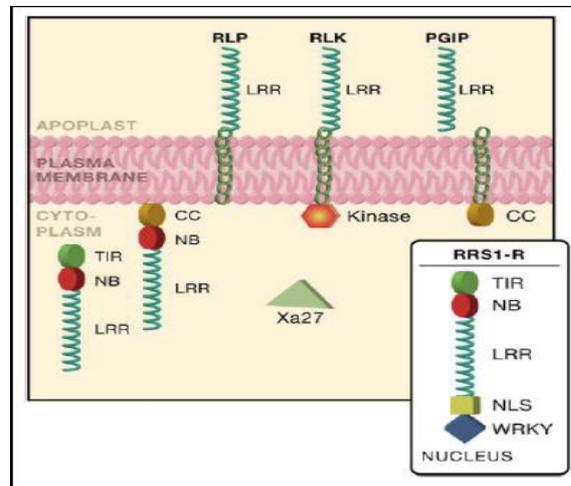


Figura 4. Ilustración que muestra a las diferentes clases de proteínas R. La clase de NB-LRR incluye las subclases TIR y CC y a RRS1-R que es una proteína R con actividad TAL en su dominio WRKY; la clase eLRR incluye las RLPs, RLKs y PGIPs. Xa27 es una nueva proteína R que no tiene dominios homólogos o otras proteínas conocidas. Tomado de Chisholm et al. 2006.

Reconocimiento intracelular de efectores: NB-LRRs.

Las proteínas de la clase NB-LRR pueden reconocer los efectores de forma directa o indirecta. El reconocimiento directo involucra la interacción física de ambas proteínas y el indirecto se lleva a cabo a través de alguna proteína accesoria. Se han demostrado varios casos de interacción directa entre efectores y NB-LRRs mediante ensayos de doble híbrido en levaduras y ensayos de interacción *in vitro*. El reconocimiento directo del efector AvrPi-ta del patógeno *Magnaporthe grisea* a través de la proteína Pi-ta del tipo CC-NB-LRR se ha demostrado a través de ensayos de doble híbrido y ensayos *in vitro* (Jia et al. 2000). También se ha probado mediante procedimientos de doble híbrido la interacción directa entre las proteínas L y M TIR-NB-LRR de lino y los efectores AvrL567 y AvrM respectivamente (Catanzariti et al. 2010; Dodds et al. 2006). Se ha descrito el reconocimiento indirecto de efectores en varios casos y se han propuesto varios modelos para estos tipos de interacción tales como el modelo “guard”, el modelo “decoy” y el modelo “bait & switch” que se ilustran en la figura 5.

El modelo “guardián” o “guard hypothesis” por su parte fue originalmente propuesto por Van der Biezen y Jones en 1998 para explicar el reconocimiento de la proteína efectora avrPto por la proteína Pto y la activación de las respuestas de defensa inducidas por la proteína NB-LRR Prf. De acuerdo a este modelo, Pto es un componente general en el mecanismo de defensa del hospedero que tal vez reconoce elicitores generales que funcionan como PAMPs. Pto sería el blanco de AvrPto de *P. syringae* para suprimir la PTI. Prf sería una proteína del tipo NB-LRR que monitorea a Pto y cuando detecta el bloqueo de Pto por AvrPto activa la defensa inducida por efectores (Van der Biezen and Jones 1998). A modo general cuando un efector de tipo 3 ingresa al citoplasma de una célula de un hospedero resistente e interactúa con su blanco modificando su estructura o formando un complejo que es reconocido por la proteína R que activa la ETI. En ausencia de esta

proteína R (en plantas susceptibles) el efector cumple con su función bloqueando la PTI y la enfermedad se desarrolla (Dangl and Jones 2001).

El modelo “señuelo” o “decoy” propone que una proteína “señuelo”, que imita a la proteína blanco del efector “engaña” al patógeno para que el mismo sea reconocido en lugar de bloquear la respuesta de defensa. Este modelo propone que la proteína blanco que es vigilada por la proteína R es en realidad un señuelo que imita a la proteína blanco funcional pero que solo funciona para reconocer al patógeno. Este modelo se basa en las siguientes premisas: los genes R son polimórficos en las poblaciones naturales; los blancos de los efectores se encuentran bajo presión selectiva para bajar la afinidad de unión al efector en genotipos susceptibles y, en genotipos resistentes en presencia de la proteína R, el blanco del efector tiene una presión selectiva para aumentar la unión a este efector y así mejorar el reconocimiento del mismo por la proteína R (van der Hoorn and Kamoun 2008).

El modelo “bait and switch” o “carnada e interruptor” es una modificación del modelo decoy que plantea 2 pasos para el reconocimiento: la proteína R (NB-LRR) está asociada a la proteína accesoria “carnada”, el efector interacciona con esta “carnada” y la proteína R usa esta interacción para reconocer directamente al efector y desencadenar la ETI (Dodds and Rathjen 2010).

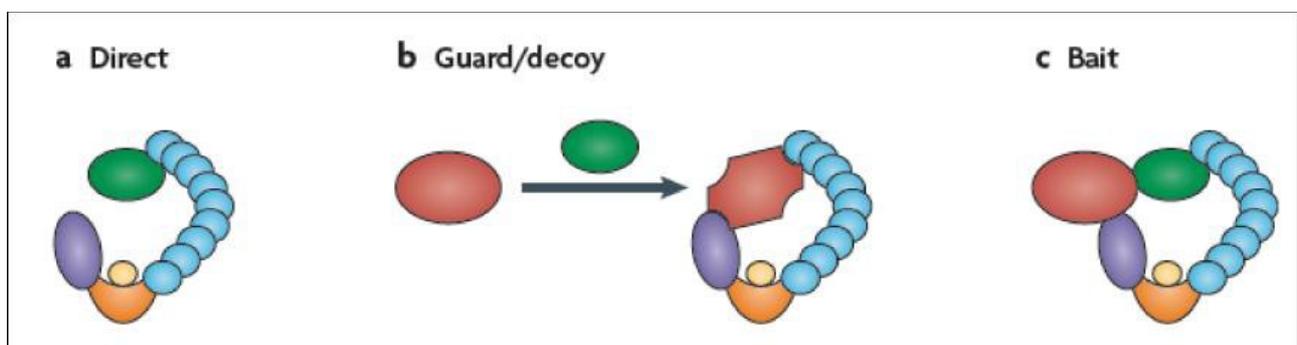


Figura 5. Modelos directos e indirectos de reconocimiento de efectores. **a.** Modelo de interacción directa entre el efector y la proteína R. **b.** Modelos guardián y señuelo donde la proteína R detecta cambios en la proteína accesoria. **c.** Modelo carnada e interruptor donde la proteína R utiliza la proteína accesoria para interactuar con el efector. Tomado de Dodds and Rathjen 2010.

Respuestas sistémicas.

Luego de que la planta reconoce al patógeno y se desencadenan respuestas inducibles, la planta es capaz de enviar una señal al resto de los órganos que no han sido invadidos y desencadenarse una respuesta a lo largo de toda la planta, de amplio espectro y duración. Existen dos tipos definidos: la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducible (ISR) (figura 6).

El fenómeno de HR en el sitio de infección promueve la posterior aparición de la SAR en toda la planta, la cual se caracteriza por ser de larga duración (desde días hasta meses dependiendo del patógeno) e inespecífica ya que proporciona resistencia a un amplio rango de patógenos (Kuc 1982; Kuc 1995; Kuc 2001; Ryals et al. 1996; Torres et al., 2006). Una característica importante de la SAR es la acumulación del ácido salicílico en las células, el cual actúa como molécula señal, así como también la activación de genes específicos a esta respuesta (genes SAR) (van Hulten et al., 2006). Estos genes SAR incluyen proteínas PR (Edreva 2005; van Houten et al., 2006, Pieterse et al., 2012).

Investigaciones recientes han demostrado que puede existir una base epigenética heredable generación tras generación para el establecimiento de la SAR. Luna y colaboradores, compararon la progenie de una planta de *Arabidopsis* que había sido sometida al patógeno *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 con la progenie de un individuo control. Hallaron que la progenie de la primera estaba mayor capacitada para resistir infecciones de patógenos biotrofos y hemibiotrofos, dado que tendían a activar genes inducibles por SA. Análisis a nivel genético mostraron que ciertos promotores inducibles por SA como WRKY6 y WRKY53 se acetilaron y la cromatina a nivel general se encontraba hipometilada, estado relacionado con transcripción activa. Dicho estado no fue observado en la progenie del individuo control a pesar de que se realizaron los mismos procedimientos y análisis genéticos, lo que sugiere que algunos aspectos de la regulación de la expresión de la SAR se podrían transmitir a las generaciones siguientes (Luna et al., 2012).

En el sitio de infección se produce una señal para el establecimiento de la SAR. Si bien por mucho tiempo se debatió sobre la naturaleza de dicha señal, hoy se sabe que son muy numerosas, y existen muchos genes involucrados, lo que demuestra la gran complejidad molecular de este proceso. Entre las principales señales se encuentran los siguientes metabolitos de naturaleza lipídica en general: ácido dicarboxílico azelaico, diterpenoide abietano dehidroabietinal, metil ester de ácido salicílico, factor dependiente de glicerol 3 fosfato, ácido piperónico, entre otros. Para la transferencia de señal a larga distancia mediante cualquiera de los metabolitos nombrados, se requiere de la proteína de transferencia lipídica DIR1 (deficient in resistance1) (Shah y Zeier, 2013).

Por su parte, la ISR (*Induced Systemic Resistance*) es otro tipo de resistencia a nivel sistémico. Al igual que la SAR, provee resistencia en toda la planta de manera inespecífica y muy duradera (varias semanas en algunos casos). Una diferencia importante reside en las hormonas participantes; en el caso de la ISR, el metil jasmonato (JA) y el etileno (ET). De todas maneras, para el establecimiento de la ISR en algunas especies, el SA puede ser importante (Weller et al., 2012). Otra diferencia relevante es que normalmente la misma es inducida por microorganismos que viven en la rizósfera, los cuales no necesariamente son patógenos de plantas, por ejemplo algunas especies del género *Pseudomonas*. Existen diferentes compuestos químicos y moléculas presentes o excretadas por las bacterias que son capaces de inducir ISR en la planta, entre ellos algunos

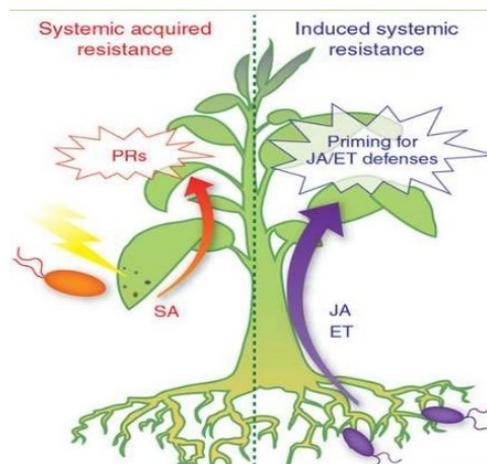


Figura 6. Esquema donde se presentan los dos tipo de resistencia sistémica vegetales que se conocen, SAR en la izquierda e ISR en la derecha. Tomado de Pieterse et al., 2012.

componentes de la pared bacteriana como los lipopolisacáridos, flagelos, sideróforos, lipopolipéptidos, antibióticos, SA, entre otros (Weller et al., 2012). Una característica de la ISR es la

gran concentración de proteínas PR y fitoalexinas presentes, comparado a una planta que no se encuentre en dicho estado (Heil and Bostock, 2002).

Existe un tipo de ISR que se activa en caso de ataque de herbívoros y en algunos casos se la denomina IRH (*Induced Resistance against Herbivores*). La ISR puede proveer resistencia a patógenos necrótrofos, biotrofos o hemibiotrofos (Heil and Bostock, 2002; Weller 2012).

CRKs.

Los receptores tipo quinasa ricos en cisteína (CRKs), se definen por la presencia de un dominio extracelular con regiones ricas en cisteínas que contienen uno o más módulos DUF26 (por sus siglas en inglés, dominio de función desconocida 26; PF01657; dominio de estrés antifúngico), constituyen una gran subfamilia de la familia de RLKs de plantas (Chen 2001; Gao y Xue 2012, Delgado-Cerrone et al., 2018). El dominio DUF26 alberga un motivo de cisteínas conservado (C-8X-C-2X-C) que podrían constituir un objetivo potencial de regulación redox que propuso a los CRK como posibles candidatos para la percepción de ROS (Wrzaczek et al., 2010). Los dominios o módulos DUF26 están presentes en otros tipos de proteínas vegetales, como las proteínas secretadas tipo receptores con repetidos ricos en cisteínas (CRRSPs) y las proteínas localizadas en los plasmodesmos (PDLPs), sugiriendo la existencia de múltiples e importantes funciones vinculadas a éstos módulos (Wrzaczek et al., 2013). Según reportes existen más de 40 CRKs en el genoma de *Arabidopsis*, y la mayoría de ellos exhiben ectodominios con una organización bimodular, cada módulo conteniendo un dominio DUF26 (Wrzaczek et al., 2010). Las evidencias sugieren un papel relacionado con la inmunidad y defensa frente a diferentes especies de patógenos para la mayoría de los CRKs de *Arabidopsis*. Los CRK participan además en respuestas frente a condiciones ambientales desfavorables y el control del desarrollo en *Arabidopsis* y en arroz. Los patrones de expresión de AtCRK se han analizado en respuesta a ROS, PAMP y otros tratamientos, y se ha propuesto un modelo para la regulación transcripcional de CRKs por hormonas vegetales y especies reactivas del oxígeno (Bourdais et al., 2015). Sumado a lo anterior, la sobreexpresión de CRKs podría conducir a una incrementada resistencia frente al estrés biótico y abiótico. Un ejemplo de ello, la sobreexpresión de AtCRK13 en *Arabidopsis* resultó en resistencia mejorada frente a la bacteria *Pseudomonas syringae*, mientras que la sobreexpresión de AtCRK5 aumentó la sensibilidad al ácido abscísico (ABA) y la tolerancia a la sequía (Acharya et al., 2007; Burdiak et al., 2015; Lu et al., 2016). Algunos CRKs también integran complejos de receptores relacionados con el sistema inmune: AtCRK28 fue capaz de inducir la muerte celular en presencia de BAK1, y se detectó en el complejo FLS2-BAK1. Si bien las evidencias sugieren una gran variedad de importantes funciones relacionadas con estas proteínas, las funciones bioquímicas precisas de los receptores vegetales que contienen DUF26 siguen sin estar claras (Delgado-Cerrone et al., 2018; Wrzaczek et al., 2018).

Solanum lycopersicum.

El tomate es una planta de la familia de las Solanáceas, originaria de América del Sur. En la naturaleza es perenne, aunque el tomate cultivado se mantiene generalmente un solo año en el campo. Su cultivo está extendido por todo el mundo, aunque produce las mayores cosechas en los climas cálidos. El verano debe ser largo, con temperaturas diurnas entre 23 y 24°C y nocturnas de 14°C. El tomate prefiere suelos algo ácidos (Peralta y Spooner 2000; Peralta et al., 2006).

Se trata de una de las hortalizas más importantes, con una producción anual mundial de alrededor de 170 millones de toneladas y 4,5 millones de hectáreas destinadas para su siembra. Se cultiva en todo el mundo, siendo los principales países productores China, USA, India, Turquía, Egipto, Italia, Iran, España, Brazil y Mexico (FAOSTAT 2015). Respecto al cultivo de tomate en Uruguay, el mismo ocupa el número 12 en orden de producción con 35229 toneladas anuales y 470 hectáreas totales cosechadas (Anuario de la DIEA). Existen numerosas variedades de tomate comerciales, y su número crece continuamente, obteniéndose plantas más resistentes a enfermedades, más productivas y con frutos de mejor calidad.

Es uno de los productos hortícolas que más diversidad de usos presenta. Aparte de consumirse crudo, puede servirse cocido, estofado, frito, encurtido, como salsa o combinado con otros alimentos. También puede procesarse industrialmente entero, como pasta, jugo, polvo, etc. En la actualidad se industrializa entre el 25 y el 30% de la producción mundial anual. Existen multitud de variedades, cultivadas durante todo el año, con frutos de distintos tamaños, formas y colores. Como alimento, es rico en fibra, bajo en calorías aportando vitaminas y minerales. Actualmente los tomates desempeñan un papel fundamental en la dieta diaria, a causa de las razones indicadas de disponibilidad y versatilidad, y por su alto valor nutritivo (Esquinas-Alcazar y Viñas 1995; Gebrandt y Thomas 2002; Knapp y Peralta 2016).

El tomate es una planta que presenta un tallo ramificado y muy poco rígido, por lo que a menudo necesita de un tutor o algún tipo de soporte para mantenerse erguido. La disposición de las hojas en los tallos es alterna. Las hojas son compuestas, formadas por entre 7 y 11 hojas simples. La planta de tomate presenta por toda su superficie pelos que segregan una sustancia de olor acre. La raíz es grande, pudiendo alcanzar los 60cm de profundidad. Las flores se agrupan en racimos, siendo de color amarillento, y florecen escalonadamente en distintas estaciones durante el año (Conesa et al., 2017). El fruto del tomate es una baya, gruesa y carnosa con dos o más segmentos, de diferentes formas y colores según la variedad. Su peso varía entre unos pocos gramos y 600 gramos. Generalmente es de color rojo, aunque también existen amarillos y morados.

El tomate es un organismo diploide cuyo genoma fue completamente secuenciado en el año 2012 (Tomato genome Consortium 2012). Su genoma posee un tamaño de aproximadamente 900 mega bases las cuales se distribuyen en 12 cromosomas. Tomate posee un 92% de identidad genómica con papa y se han encontrado algunos genes de tomate que codifican para receptores de la familia CRK (*cystein rich receptor like kinase*) con un alto índice de homología a los PRKs de papa (www.potatogenome.net). El presente proyecto se enmarca en la búsqueda y análisis de nuevos integrantes de la familia CRK en tomate, procurando aportar conocimiento original sobre éstos receptores.

Solanum tuberosum.

La planta de papa (*Solanum tuberosum*) es originaria de América del Sur. En el pasado, los cultivos indígenas antiguos de papa se distribuían en los Andes desde el oeste de Venezuela hasta el norte de Argentina, encontrándose incluso en los archipiélagos de Chiloé y Chonos (Spooners et al., 2005). Fue introducida en Europa en los 1500 y de allí llevada al resto del mundo.

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate, el morrón, y otros cultivos de interés. Es sensible a heladas y crece bien en climas templados, con temperaturas entre 15° y 27°C. Requiere una estación de crecimiento con un largo mínimo de 3 a 4 meses, en la cual las temperaturas no sean demasiado altas (>30°C) ni demasiado bajas (<5°C). El órgano que se consume es el tubérculo. Este es un órgano subterráneo de almacenamiento de reservas y resistencia. La planta lo desarrolla cuando percibe del ambiente señales de que se aproxima el invierno o la estación desfavorable para el crecimiento (Aldabadle y Dogliotti, 2002). Debido a las temperaturas extremas tanto en invierno como en verano, en nuestro país existen dos períodos para el cultivo de plantas de papa: primavera-verano y verano-otoño (Vilaró, 1990).

La papa es cultivada en más de cien países y consumida por más de 2 billones de personas diariamente. Es el tercer cultivo alimenticio, luego del trigo y el arroz, en importancia mundial y se consume fresco o procesado. Se han desarrollado una gran cantidad de variedades para abastecer la demanda, entre las que encontramos variedades con resistencia a enfermedades pre o post cosecha, variedades que se ajustan a los procesos de industrialización o que tienen mejores valores nutricionales. Además de aportar la energía del almidón, la papa es rica en vitamina C, aporta altos niveles de potasio y es buena fuente de fibra (Mullins et al. 2006), (<http://www.cipotato.org>). La producción global de la papa ha permanecido relativamente constante desde los años 60 siendo de aproximadamente 300 millones de toneladas anuales. Sin embargo ha cambiado la distribución de los países que lo cultivan: se observa un crecimiento en la producción de países en vías de desarrollo como India, China y varios países de África, un crecimiento moderado en Norteamérica y, al mismo tiempo, una importante disminución de la producción en los países de la Unión Europea (FAOSTAT 2015).

Los mapas genéticos basados en marcadores moleculares han posibilitado la identificación de varios *loci* genéticos responsables de caracteres de importancia agronómica. Entre los mismos se encuentran QTLs (*Quantitative trait locus*) y genes de resistencia a enfermedades, caracteres de desarrollo y morfología y de calidad (Mullins et al. 2006). Además se han establecido varios proyectos genómicos para la papa entre los que podemos nombrar al National Science Foundation (NSF) Potato Genome 22 project (<http://www.potatogenome.org>), Canadian Potato Genome Project (CPGP, <http://www.cpgp.ca>) y Potato Genome Sequencing Consortium (http://www.potatogenome.net/index.php/Main_Page). Estas entidades han secuenciado diferentes librerías de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), proveen datos de microarreglos y de secuenciación y anotación genómica de papa y gran parte del genoma de este organismo.

El cultivo de papa es sensible a diversos factores bióticos y abióticos, incluyendo patógenos y estrés proveniente del ambiente. Entre los patógenos más importantes que afectan al cultivo de papa encontramos patógenos bacterianos como *Ralstonia solanacearum*, que causa la marchitez bacteriana o “murchera” y *Pectobacterium carotovorum* (= *Erwinia carotovora*) que causa la podredumbre blanda; oomycetes patógenos como *Phytophthora infestans* que causa el tizón tardío; hongos patógenos como *Alternaria solani* que causa el tizón temprano y virus como el virus PVY que causa la enfermedad del mosaico (Hooker 1980).

Antecedentes.

Los genes *PRK* (*potato receptor-like kinase*) fueron aislados a partir de una biblioteca de expresión diferencial frente al tratamiento con *Pectobacterium carotovorum subs carotovorum* SCC3193. Se aislaron 4 ADNcs de aproximadamente 2220 pares de bases que se inducen por este patógeno y los mismos fueron designados como *PRK1,2,3* y *4* (*Solanum tuberosum receptor like kinase*). Mediante análisis bioinformáticos de sus secuencias se determinó que el marco abierto de lectura codifica para proteínas de 676 aminoácidos en el caso de *PRK1,2* y *4* y de 651 aminoácidos en el caso de *PRK3*. Las secuencias aminoacídicas de los *PRK* mostraron un índice de homología alto entre sí, de 91 a 99%. El análisis de estas secuencias indica que poseen dos regiones hidrofóbicas: una N-terminal que corresponde al péptido señal y otra que corresponde a la región transmembrana de proteínas integrales de membrana. Las regiones carboxilo terminal contienen subdominios conservados en quinasas de plantas, específicamente del tipo serina treonina quinasa de acuerdo a los motivos encontrados en los dominios catalíticos. La región comprendida entre el péptido señal y el dominio transmembrana es la más variable entre los *PRK* y correspondería a la región extracelular; si se compara la región extracelular de *PRK-1* con la de *PRK2, 3* y *4* la similitud de las mismas disminuye a 86-87% mientras que la similitud entre las regiones extracelulares de *PRK2, 3* y *4* permanece en 98-99%. Además la secuencia de *PRK3* muestra un gap de 25 aminoácidos que podría ser el resultado de "splicing" alternativo ya que se encontraron secuencias conservadas de este mecanismo en las ADNcs de los *StPRK* y se ha realizado un Southern blot que apoya esta hipótesis (Montesano et al. 2001). Esta arquitectura en sus dominios los ubica dentro de la familia de Receptores Tipo Quinasa (RLKs) de plantas (Afzal et al. 2008). Cuando se comparó la secuencia aminoacídica de los *PRK* con secuencias conocidas de receptores se encontró una similitud significativa con *PvPR20-1* (*PvRK20-1*) de *Phaseolus vulgaris* y con 3 RLKs de *Aradopsis* (Montesano et al. 2001). Al analizar la región N-terminal comprendida entre el péptido señal y la región transmembrana se observa la presencia de dos repetidos del dominio conservado DUF26 (PFAM id. n°: PF01657) que presenta el motivo C-X8-C-X2-C y cuya función es desconocida pero que podría estar involucrado en la estructura tridimensional mediante la formación de puentes disulfuro. La presencia de estos repetidos en su dominio extracelular ubica a los *StPRK* en la superfamilia de proteínas con repetidos ricos en cisteína (CRR: *cysteine-rich repeats*). En el genoma de *Arabidopsis* hay al menos 100 genes que contienen los dos repetidos de DUF26 y al menos 42 de ellos son RLKs llamados CRKs (CRR RLKs) constituyendo una de las clases de RLKs más grandes de *Arabidopsis* (Chen 2001). Se ha reportado que algunos CRKs de *Arabidopsis* se inducen frente a patógenos y en respuesta a SA y que los mismos desempeñan un rol importante en la regulación de los mecanismos de defensa y de la muerte celular programada (Chen et al. 2003; Chen et al. 2004), también se ha reportado que los CRKs presentan patrones de transcripción diferenciales frente a ozono y SA activando vías de señalización antagónicas (Wrzaczek et al. 2010).

Mediante la utilización de programas bioinformáticos como WoLF PSORT Y Deep-Loc1.0 se predijo la localización subcelular de las proteínas *PRK* en la membrana plasmática. Esta información en conjunto con el dominio transmembrana sugiere que los *PRK* se localizarían en la membrana plasmática de la célula vegetal, reafirmando su posible función de receptores tipo quinasa (Montesano et al., 2001; Delgado-Cerrone et al., 2018).

El tratamiento de plantas de papa con filtrado de cultivo (CF) de *PccSCC3193* en hojas y tubérculos muestra un patrón de expresión similar en ambos tejidos: se observa una rápida acumulación de transcritos de *PRKs* una hora luego del tratamiento y una disminución de los

mismos a las 2 horas pero se mantienen elevados hasta las 24 horas luego del tratamiento (figura 7A y B). En hojas sistémicas que no fueron tratadas se observó una acumulación de transcritos de PRKs mucho menor que en tejidos locales y bastante retrasada en el tiempo (figura 7A). Además se observó que estos genes también se inducen cuando las plantas son tratadas con oligogalacturónidos pero con una cinética diferente que con la inducción por CF (figura 8). Se observó igualmente que en el tratamiento control realizado con agua los PRKs tienen una leve inducción que se debe a la pequeña herida realizada en el tratamiento que seguramente libera fragmentos de pared celular (Montesano et al. 2001).

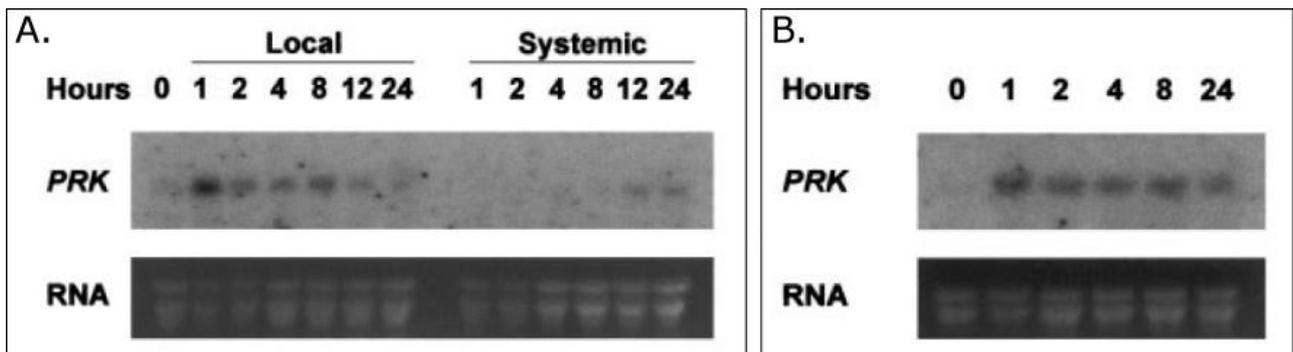


Figura 7. Patrones de expresión de ARNm de PRK con tratamiento de CF de Pcc en diferentes tejidos de papa. **A.** niveles de expresión de PRKs en hojas tratadas con CF y hojas sistémicas a diferentes tiempos de tratamiento. **B.** Niveles de expresión de PRKs en tubérculos tratados con CF a diferentes tiempos. Tomado de Montesano et al.,(2001).

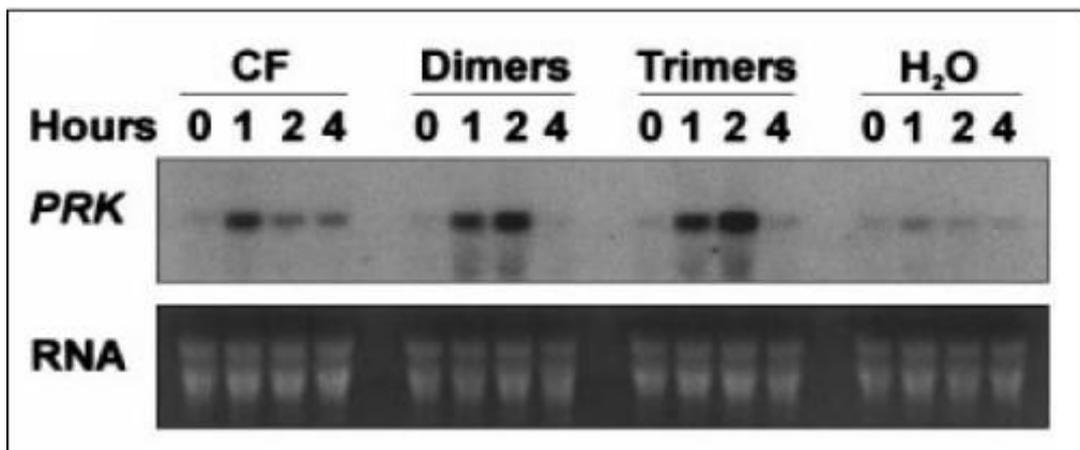


Figura 8. Patrones de expresión de ARNm de PRKs con tratamiento de CF de Pcc, dímeros y trímeros de Acido poligalacurónico. Tomado de Montesano et al., (2001).

Según los resultados obtenidos, se concluyó que los pequeños oligogalacturónidos son inductores de la expresión de los PRKs al igual que el tratamiento con CF. Estos resultados sugieren que los PRK tendrían un papel importante en las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad y que los mismos posiblemente juegan un rol en la percepción de Pcc o del daño

celular ocasionado por los factores de virulencia de la misma y también en la transducción de estas señales en mecanismos de respuesta de la planta.

Mediante ingeniería genética se generaron líneas de plantas de papa capaces de sobreexpresar el receptor PRK2. Las mismas fueron expuestas frente a algunas especies de patógenos de naturaleza fúngica en ensayos de infección *in vitro*. En dichos ensayos también se realizaron infecciones de plantas de papa Bintje (sin transformar). Se analizó la aparición de síntomas de enfermedad, se correlacionó lo observado entre todas las líneas infectadas y se realizaron inferencias estadísticas con los resultados obtenidos. En líneas generales, plantas que sobreexpresan PRK2 mostraron una incrementada resistencia frente a importantes patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* y *Alternaria solani* (resultados no mostrados).

Hipótesis.

Hasta donde llega nuestro conocimiento el estudio de los receptores CRK de tomate no se ha abordado en profundidad. Sabemos que tomate cuenta con varios receptores de la familia CRK los cuales podrían desempeñar funciones relevantes en la defensa de la planta frente a organismos fitopatógenos. El presente es un trabajo de carácter exploratorio que busca aportar información original sobre estos receptores en tomate, enfocado principalmente en sus posibles funciones defensivas.

Objetivo general.

Contribuir con la generación de conocimiento de los receptores CRK de tomate, en particular respecto a sus posibles funciones defensivas frente a fitopatógenos.

Objetivos específicos.

- 1) Generación de la construcción genética StPrk2-Cmyc-His6-PROK2.
- 2) Obtención de plantas de tomate genéticamente modificadas que contengan el gen de papa StPrk2.
- 3) Caracterización primaria fenotípica y genotípica de las plantas de tomate genéticamente modificadas.
- 4) Análisis de CRKs de tomate no descritos hasta el momento.

Resultados y discusión.

A continuación se presenta el esquema de tareas y actividades realizados en el presente trabajo (figura 9).

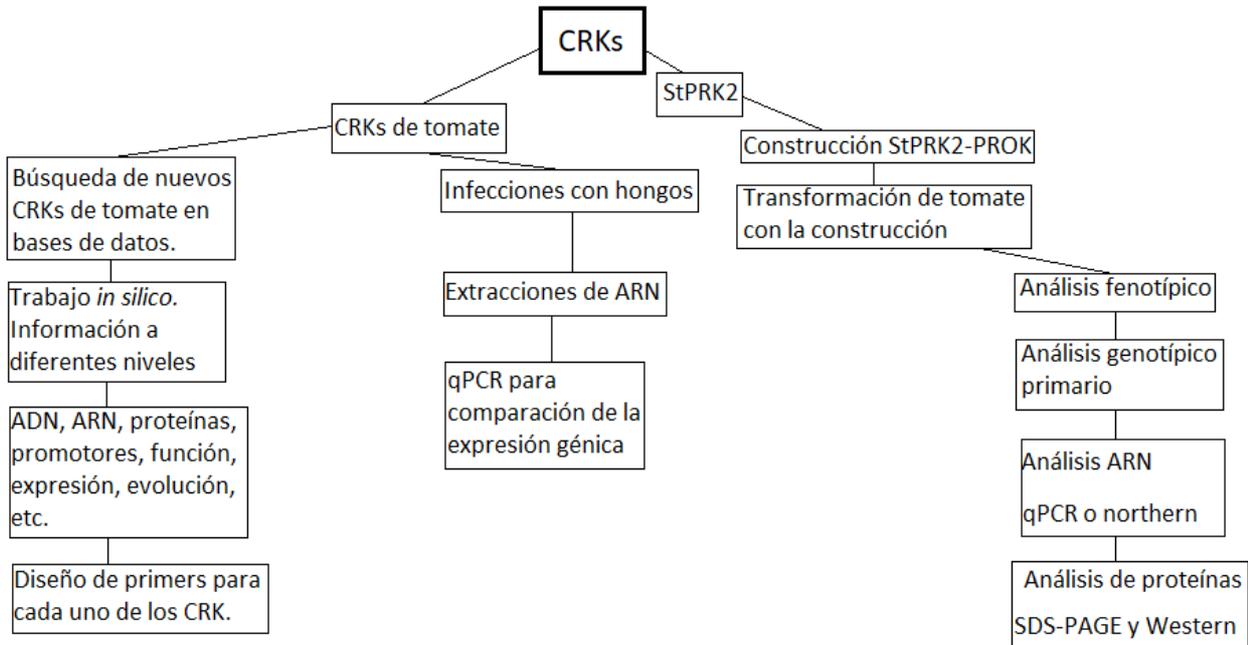


Figura 9. Esquema de actividades.

Generación de semillas de tomate.

Para los experimentos y ensayos llevados a cabo en este trabajo, se utilizó el tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar comercial MoneyMaker el cual posee un gran rendimiento en la producción de frutos (España et al., 2014). Se evaluaron los tiempos y características del crecimiento de las plantas y su producción de frutos con el objetivo de generar las condiciones necesarias para la reproducción del ciclo de vida de tomate. Con los frutos obtenidos, se extrajeron semillas que constituyeron nuestra base de material biológico para actividades experimentales.

Se cultivaron semillas en diferentes medios: tierra en macetas colocadas en invernadero, turba en contenedores pequeños y medio de cultivo *in vitro* en frascos de vidrio. De los 3 medios, el que mostró mayor velocidad y efectividad en la germinación de semillas de tomate fue el cultivo *in vitro*: los órganos primordiales emergen generalmente a partir del quinto día y para los 10 se desarrolla una plántula de 8cm aproximadamente. Por otro lado, 7-8 de cada 10 semillas generan plantas en estas condiciones. Para los aspectos nombrados, las diferencias en el desempeño de las semillas entre medio de cultivo *in vitro* con medio de tierra y medio de turba fueron muy notorias: tanto en tierra como turba la velocidad de crecimiento fue muy variable, con tiempos de entre 10 y 30 días y una efectividad estimada del 40% (4 de cada 10 semillas generarían plantas). Tanto en tierra como en turba las semillas fueron sembradas a 1 centímetro de profundidad. Respecto a las

semillas cultivadas en tierra, se ensayó el procedimiento en verano, otoño, invierno y primavera. Se observó que las semillas plantadas en verano y primavera generaban plantas capaces de alcanzar mayores tamaños en menor tiempo y con floración más temprana, lo que repercutió en la producción de frutos. Esta observación concuerda con el trabajo de McCormick y colaboradores (1986). Se observó igualmente el crecimiento de las plantas en presencia y ausencia de varilla tutor. Pudo apreciarse que las plantas que se desarrollaron con tutor o apoyo crecieron considerablemente más en altura, pero su tallo era más fino y frágil. La producción de tomates en ambas condiciones fue similar; no se observaron diferencias notables.

En base a los resultados obtenidos se desarrolló una estrategia para maximizar la producción de semillas, la cual se resume a continuación. Se esterilizaron semillas (véase materiales y métodos) y se plantaron *in vitro* en frascos con MS al 2%. Luego de 2 semanas, cuando las plantas habían alcanzado un mínimo de 10cm, se transfirieron directamente a macetas de al menos 20cm de diámetro con tierra y se colocaron en el invernadero del instituto. Durante al menos 4 días las plantas transferidas permanecieron protegidas contra la deshidratación ocasionada por cambio de medio con bolsas transparentes de nylon, y regadas todos los días con agua y al menos una vez por semana con solución de Farheus (Oono et al., 2011). Se realizaron siembras durante todo el año aunque se concentraron esfuerzos en las estaciones primavera-verano. En la figura 10 se pueden visualizar plantas de tomate cultivadas en nuestras instalaciones en diferentes estadios del desarrollo.



Figura 10. Fotos de las plantas de tomate generadas en nuestras instalaciones. Se aprecian las flores y frutos.

Construcción genética *PRK2-Cmyc-His6-PROK2*.

Para la realización de la construcción genética *Prk2-Cmyc-His6-PROK2* se hizo uso de otra construcción la cual se componía por el cDNA completo de *Prk2* en el vector de expresión de levaduras pPICZAalfa (ver materiales y métodos). Dicha construcción contenía en el extremo c-terminal las secuencias de los epítopes cMyc y 6xhis, las cuales son de gran utilidad para

procedimientos de detección proteica como el *western blot* y ensayos de purificación de proteínas, entre otros. Las secuencias de los epítopes cMyc y 6xhis se pueden apreciar en la figura 11. Se llevó a cabo una extracción por miniprep de ADN plasmídico proveniente de *E.coli* XL1-Blue conteniendo *Prk2-Cmyc-His6-pPICZAalfa* a partir de cultivos de 5ml de LB conteniendo 25ug/ml del antibiótico zeocina (materiales y métodos). Luego de la extracción, se midió la concentración del ADN plasmídico obtenido por medio de nanodrop y la misma resultó de 180 ng/ul.

A 6xhis tag: 5`-CATCATCATCATCATCAT -3`. S.N.
N- H H H H H H -C. S.A

B cMyc tag: 5`-GAA CAG AAA CTG ATC TCT GAA GAA GAC CTG-3`. SN
N - E Q K L I S E E D L -C. SA

Figura 11: Secuencias de los epítopes (tags) de histidina y cMyc. Para ambos casos, SN: secuencia nucleotídica, SA: secuencia aminoacídica.

Contando con *PRK2-Cmyc-His6-pPICZAalfa* aislado, se realizó una amplificación de *Prk2* mediante reacciones de PCR con los cebadores PRK2-GF1 (forward) y PRK3-PYES (reverse). Se llevaron a cabo 3 reacciones utilizando *PRK2-Cmyc-His6-pPICZAalfa* como molde, de manera de asegurar una cantidad apreciable de producto amplificado que sería imprescindible para ensayos posteriores dentro del proceso de construcción genética. El cebador PRK2-GF1 se complementa con la parte 5' de *PRK2* incluyendo el codón de inicio (AUG), mientras que el cebador PRK3-PYES se complementa con el codón de terminación y una región del sitio de clonado múltiple de pPICZAalfa, corriente abajo respecto al inserto. La reacción de amplificación debe dar como resultado un fragmento de 2290 nucleótidos, de los cuales 2273 pertenecen a *PRK2-his-myc*. El producto de PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando el agente intercalante Good View (SBS Genetech) y visualizado mediante transiluminador UV (UVStar, Biometra, USA). Se observó un fragmento que coincidió con el tamaño teórico de *PRK2* lo que indicaba que la amplificación fue exitosa. El producto de PCR fue posteriormente purificado según se detalla en Materiales y Métodos. Luego se procedió con la clonación del producto de PCR ya analizado en el vector pROK2 el cuál posee al promotor de expresión constitutiva CAMV35s (promotor de virus del mosaico del coliflor). Para ello se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico a partir de un precultivo en medio LB con 100ug/ml de kanamicina de una colonia de *E.coli* XL1-Blue que contenía el vector de expresión vegetal PROK2 (vacío, sin inserto) y se estimó su concentración en 100ng/ul. Se digirió tanto el producto de amplificación de *PRK2* como el vector PROK2 vacío previamente aislado con las enzimas Sac1 y Xho1. Esta reacción de restricción daría lugar a cortes con extremos cohesivos diferentes tanto en *PRK2* como en el vector PROK2, permitiendo que la posterior ligación se concrete en una dirección específica. Se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% para visualizar y verificar la integridad del producto de digestión y proseguir con la construcción *PRK2-Cmyc-His6-PROK2*. La reacción de restricción fue correcta, se observaron bandas únicas de ADN lineal que se correspondieron con *PRK2-Cmyc-His6* y *PROK2* vacío, con 2273 y 12850 pares de bases respectivamente. Se estimó la concentración de ADN en las bandas de *PRK2* y *PROK2* vacío con ayuda del marcador de peso molecular para ajustar las cantidades a emplear en el ensayo de ligación. Se procedió con la escisión de las bandas, purificación de los fragmentos de restricción y la ligación de *PRK2-Cmyc-His6* con *PROK2*.

Se transformaron células de *E.coli* XL1 Blue con el producto de ligación (Sambrook y Russell 2001) y las mismas fueron plaqueadas en medio LB agar con kanamicina (km) empleada como antibiótico de selección a una concentración de 100ug/ml. Se aislaron 20 colonias transformantes

de las cuales 9 fueron seleccionadas para análisis mediante colony PCR. En la misma, se utilizó una construcción de *PRK2-PROK2* sin epítopes como control positivo. Se usaron los cebadores 35S1 (*forward*) y PRK2-PW1 (*reverse*), cuyas secuencias son presentadas en la sección Materiales y Métodos. Con dichos primers, se esperaba una banda de 260pb, la cual migraría con las bandas de menor peso molecular del marcador. El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 12). Se observó que las bandas correspondientes a *PRK2-Cmyc-His6-PROK2* (producto de ligación) son iguales en altura al control positivo, lo cual era esperable.



Figura 12: Visualización del producto de Colony PCR para confirmación de transformantes de XL1 Blue con *PRK2-PROK*. Se pueden observar las colonias transformantes y el control positivo (C+). Marcador Lambda Pst1 con los pesos moleculares (PM, en pares de bases) indicados al costado.

Para confirmar que *PRK2* se haya insertado en la dirección correcta, respetando el marco de lectura abierto y confirmar que no existan mutaciones ni cambios genéticos de ninguna índole, se secuenció la construcción utilizando los primers 35S1 y PRK3-PYES por los flancos 5' y 3' respectivamente. El primer 35S1 se hibrida con el promotor 35S de CAMV y permite visualizar el codón de inicio de la traducción. El primer PRK3-PYES se hibrida con el codón de terminación e incluye los epítopes *his6* y *Cmyc*. Ambos primers permiten analizar la secuencia de *PRK2* en su totalidad. Dos colonias transformantes fueron seleccionadas para la secuenciación. Se pudo advertir en ambos casos que la secuencia quedó correctamente ligada y respetando el marco de lectura.

El resultado de la secuenciación y la PCR de tiempo final, terminaron de confirmar que la construcción *PRK2-Cmyc-His6-PROK2* y la posterior transformación bacteriana fueron exitosas. Se realizaron gliceroles (materiales y métodos) de las 9 colonias transformantes analizadas por PCR.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción genética.

Previo a la transformaciones de tomate, se debió transformar *Agrobacterium tumefaciens*, la cual mediaría el proceso anteriormente nombrado. Para ello, se hizo uso de dos cepas de *A.tumefaciens*: C58C1 y LBA4404 (ver materiales y métodos). Se aplicaron diferentes protocolos de transformación los cuales, según se ha reportado, poseen alta efectividad con las dos cepas que utilizamos. Se aplicó protocolo de transformación mediante CaCl₂ para C58C1 y electroporación para LBA 4404. Se emplearon minipreps de la construcción *PRK2-Cmyc-His6-PROK2* para los eventos de transformación independientes. En ambas transformaciones, las colonias individuales comenzaron a aparecer después de 5 días pasado el plaqueo en medio selectivo. Las colonias poseían la apariencia y color indicado. Se procedió a aislar 20 de las colonias obtenidas en cada transformación en medio LB con los antibióticos correspondientes. Se seleccionaron 10 colonias para análisis y conformación de transformantes mediante colony PCR, con el uso de los primers 35S1 y PRK3-PYES, anteriormente utilizados para confirmar transformantes de la construcción en XL1-Blue. Los productos de PCR se analizaron en electroforesis en gel de agarosa tal como se muestra en la figura 12 (se observan los resultados de PCR de la transformación de la cepa C58C1). En 3 de los pocillos hubo muestras que confirmaron presencia de inserto, con tamaños que se correspondieron con lo esperado. Dichas colonias fueron nombradas como CT2, CT5 y CT7. La última generó la banda de mayor brillo y fue seleccionada para secuenciación, por lo cuál a la misma se le realizó una extracción plasmídica. Los resultados demostraron que la secuencia se ligó correctamente respetando el marco de lectura.

El resultado de la secuenciación y la PCR de tiempo final, confirmaron la presencia de *PRK2-Cmyc-His6-PROK2* en transformantes de *A. tumefaciens*. Se realizaron gliceroles de la colonia transformante secuenciada.

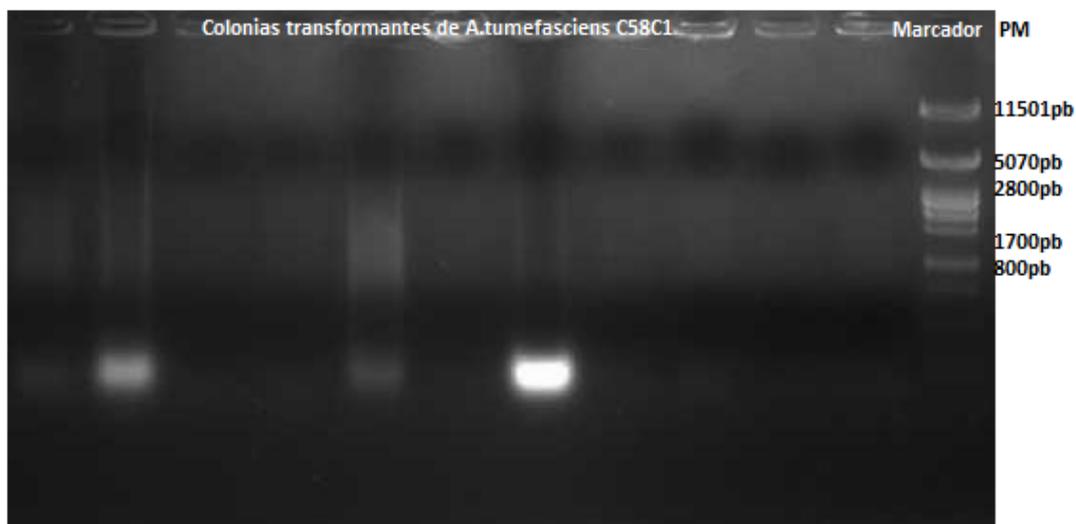


Figura 13. Visualización del producto de Colony PCR para confirmación de transformantes C58C1 con *PRK2-PROK*. Se pueden observar las colonias transformantes y el marcador Lambda Pst1 con los pesos moleculares (PM) indicados al costado.

Transformación de tomate con la construcción genética, micropragación y observación fenotípica.

Se generaron plantas de tomate cultivar MoneyMaker genéticamente modificadas mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el vector de transformación *PRK2-Cmyc-His6-PROK2*. Los procedimientos de transformación implicaron la familiarización con las técnicas requeridas para manipular y micropropagar tejidos de tomate *in vitro*. La transformación de explantos de *S. lycopersicum* se llevó a cabo según los procedimientos descritos por Sharma y colaboradores (2009) añadiendo aspectos descritos en trabajos de McCormick y colaboradores (1986) y Ellul y colaboradores (2002). En nuestro laboratorio se han transformado exitosamente plantas de papa y desde el principio no visualizamos obstáculos para realizar con éxito la transformación de tomate mediada por *Agrobacterium* con los procedimientos ya mencionados. El cultivar de tomate utilizado en el estudio ha sido objeto de procedimientos de transformación genética en el pasado, obteniéndose resultados positivos según lo publicado por Frary y Earl (1996). En nuestro laboratorio se contaba con la experiencia de transformación de papa pero no de tomate. Como no conocíamos equipo de investigación que realizaran Transformación de tomate mediada por *A. tumefaciens* en Uruguay, tomamos la decisión de consultar la literatura y realizar los procedimientos nosotros. Los detalles del protocolo en cada etapa se describen en materiales y métodos, pero en esta sección se presentan todos los resultados, observaciones y modificaciones implementadas en cada paso de la transformación genética de tomate.

Se esterilizaron semillas y se las sembró en medio de germinación. Se las dejó crecer durante varios días hasta el desarrollo de los órganos primordiales hipocótilos y cotiledones (figura 14 A). Por lo general los cotiledones suelen ser los órganos empleados como explantos para la transformación de tomate, aunque los hipocótilos han sido utilizados con éxito en algunos ensayos según lo reportado por McCormick y colaboradores (1986). Tanto hipocótilos como cotiledones fueron extraídos y colocados en placas con medio de precultivo conteniendo BAP o transzeatina (ambas hormonas del tipo de las citoquininas) dejándolos allí durante 2 días previo a la infección con *Agrobacterium tumefaciens* (figura 14 B). Los resultados con los explantos fueron similares con ambas hormonas. Aquellos explantos que respondieron al precultivo con hinchazón, engrosamiento y aumento de su dureza y rigidez (lo que pudo notarse durante la manipulación con pinzas) fueron infectadas sumergiéndolas en suspensión de *Agrobacterium* con concentraciones de 1.10×10^8 (OD=1) y $0,5 \times 10^8$ (OD=0,5), comparándose luego los resultados con ambas concentraciones. Para la transformación se utilizaron las dos cepas de *Agrobacterium* genéticamente transformadas: C58C1 y LBA4404. Ambas cepas han sido seleccionadas para transformar diferentes especies vegetales, entre ellas tomate (Dong et al., 2001; Wroblewski et al., 2005), logrando resultados satisfactorios. En otros trabajos realizados en nuestro laboratorio, se logró transformar plantas de papa con C58C1. El desempeño de las plantas transformadas por cada cepa de *Agrobacterium* fue también observado. Posteriormente a las infecciones con esta bacteria, los explantos fueron colocados nuevamente en medio de precultivo e incubados de 2-4 días. Superado el lapso, los cotiledones que se mostraron en buenas condiciones fueron transferidos a medio selectivo con los antibióticos kanamicina (km) y clafórán (claf) (figura 14 C). El primero de éstos posee la finalidad de seleccionar los explantos transformados genéticamente mientras que el restante se utiliza para ayudar a curar los tejidos vegetales de *Agrobacterium*. Pasada una semana desde la transferencia, varios explantos presentaron contaminación bacteriana. Aquí se pudo observar que la exposición de los mismos a mayores concentraciones de *Agrobacterium* (1.10×10^8) y un mayor tiempo de infección en medio de precultivo (hasta 4 días) contribuyeron a empeorar

las condiciones de cultivo, potenciando la contaminación. Algunos de los cotiledones e hipocótilos sanos comenzaron a desarrollar callos a partir de las dos semanas (figura 14 D). Aquellos callos que aumentaron de tamaño fueron transferidos a frascos con medio selectivo (figura 14 E), de manera de no limitar su crecimiento. Algunos callos murieron mostraron un color marrón mientras que otros dieron lugar a pequeños tallos o shoots (figura 14 F). Los callos vivos con shoots fueron traspasados a nuevos frascos con medio selectivo cada dos semanas. Se observó que los hipocótilos mostraron una mayor capacidad para la formación de callos que los cotiledones, lo que se considerará en los próximos experimentos con tomate. Algunos callos fueron transferidos paralelamente a medio de germinación y se comparó la capacidad de ambos medios en el desarrollo y regeneración de explantos transformados. Algunos callos siguieron generando shoots los cuales aumentaron rápidamente su altura y comenzaron a desarrollar plántulas con órganos foliares (figura 14 G, h e I). Cuando estos últimos alcanzaron los 5-7cm de estatura, fueron transferidos a medio de enraizado o medio de germinación. Se observó que únicamente algunas de las plántulas transferidas a medio de germinación fueron capaces de aumentar su tamaño y desarrollar raíces, mientras que las transferidas a medio de enraizado murieron sin generar raíz ni mostrar crecimiento alguno. Las plántulas dieron lugar a raíces y un mes después completaron su desarrollo llegando a la tapa del frasco. En primera instancia se seleccionaron aquellas plantas que pasaron por el proceso de transformación, resistentes a km y curadas de *A. tumefaciens*, y se multiplicaron mediante micropropagación *in vitro* de manera de asegurar rápidamente un mayor número (figura 15). Se obtuvieron dos plantas en principio transformantes, resistentes a km. Estas plantas micropropagadas crecieron con un ritmo similar a MoneyMaker (sin transformar).

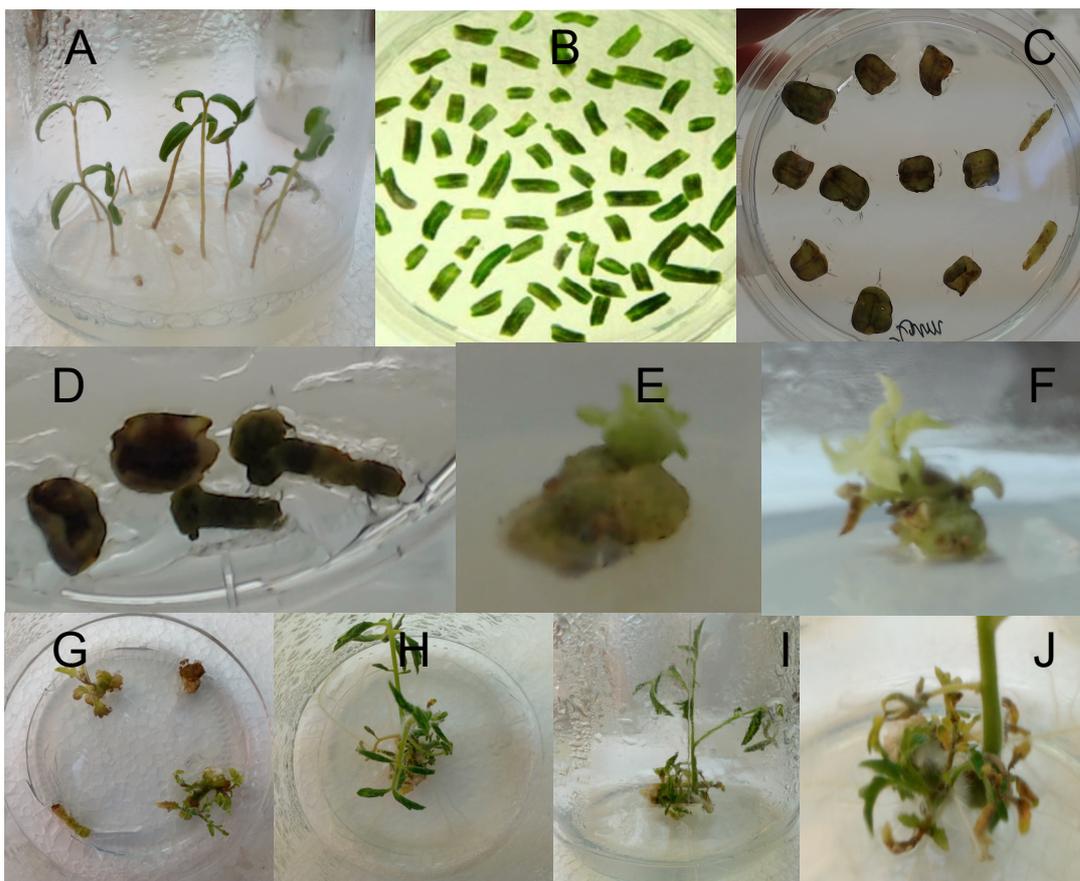


Figura 14. Fotografías que ilustran las diferentes etapas en la transformación de tomate. A: plántulas de 10 días, con cotiledones e hipocótilo. B: Cotiledones cortados y colocados en medio de precultivo. C: Cotiledones e hipocótilos hinchados, luego de la infección. D: Detalle de callos jóvenes formándose en hipocótilos. E: Callo en etapa más avanzada del desarrollo. F: Callo generando tallo o shoot. G: Callos con plántulas en formación. H: Planta desarrollada a partir del callo, con múltiples hojas, vista de arriba. I: Misma planta que la anterior, pero vista desde el costado. J: Detalle del callo que dio lugar a la planta. Se observan raíces.



Figura 15: Fotografías que muestran a las dos plantas de tomate transformantes micropropagadas. A: Plantas fotografiadas minutos después de la micropropagación. B: Las mismas plantas, dos semanas luego de la micropropagación.

Posteriormente, las dos plantas micropropagadas fueron sometidas a una caracterización genotípica primaria mediante PCR de tiempo final para confirmar la presencia del cassette modulador *pROK2-PRK2-Cmyc-His6* bajo el promotor 35S en el genoma de tomate. En la figura 16 se muestra una imagen representativa de *PROK2* (vector que contiene el cassette modulador) y las diferentes regiones que lo conforman. Se realizaron extracciones de ADN genómico de las dos plantas de tomate según se describe en Materiales y Métodos y se midió su concentración con nanodrop, alcanzando la misma 750ng/ul. Con las extracciones de ADN genómico se realizó un ensayo de PCR de tiempo final utilizando como control positivo una extracción de ADN plasmídico de *PRK2-Cmyc-His6-PROK2* proveniente de XL1-Blue. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa tal como se muestra en la figura 17. Se agregaron las

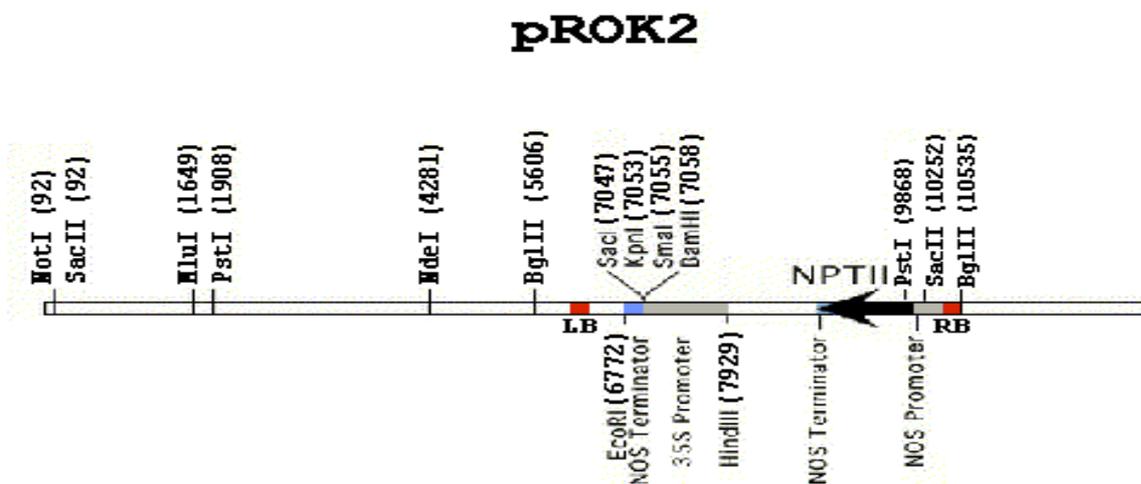


Figura 16. Ilustración del vector de transformación *pROK2* el cuál contiene el cassette modulador que se insertó en el genoma de tomate.

preparaciones de ADN genómico para visualizar su integridad (parte izquierda arriba de la figura). Los productos de PCR de los supuestos transformantes obtenidos y analizados en la electroforesis se nombraron como PCR T1 y PCR T2. De los dos tomates, solo una confirmó presencia de inserto presentando un tamaño que se correspondió con lo esperado, idéntico al control positivo colocado a su lado (PCR T2). Este resultado demostró que se obtuvo una planta transformada con el vector *PRK2-Cmyc-His6-PROK2*. La planta restante que no pudo ser confirmada como transformante (PCR T1) a pesar de sobrevivir en medios con antibióticos, fue considerada como control de transformación. Paralelamente, se observó el aspecto de la línea vegetal transformada, comparando sus características fenotípicas con plantas MoneyMaker sin transformar y con el control de transformación (figura 18). Las plantas se encuentran en el siguiente orden:

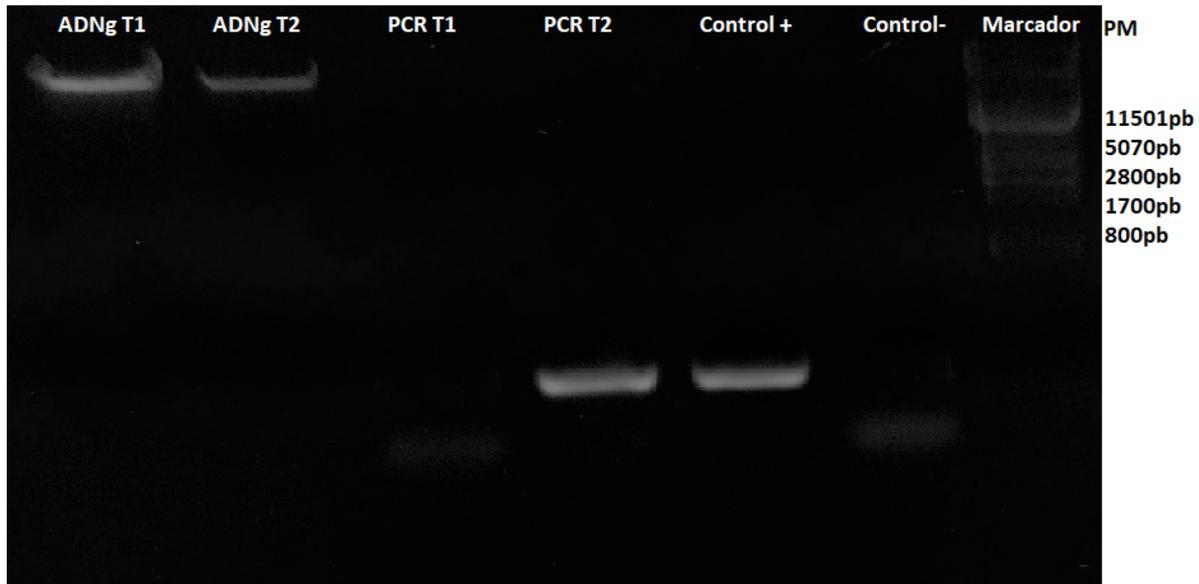


Figura 17. Visualización del producto de PCR para confirmación de la presencia del cassette modulador *35S-PRK2-PROK* en tomate. ADNgT1: muestra de extracción de ADN genómico de tomate transformante 1. ADNgT2: muestra de extracción de ADN genómico de tomate transformante 2. PCR T1: producto de PCR de tomate transformante 1. PCR T2: producto de PCR de tomate transformante 2. Control +: control positivo de PCR. Control -: control negativo de PCR (agua). Marcador: marcador de peso molecular Lambda Pst1. PM: peso molecular en pares de bases.



Figura 18. Plantas de tomate en frascos de medio *in vitro*. Izquierda, MoneyMaker. Centro, transformante de tomate confirmado. Derecha, control de transformación.

MoneyMaker en la izquierda, transformada en el centro y control de transformación en la derecha. Se analizó el largo de los entrenudos ya que se ha descrito en investigaciones anteriores la

existencia de entrenudo corto en plantas de papa que sobreexpresan PRK2. En apariencia no se observaron diferencias notables y debe considerarse que el tiempo de crecimiento luego de los procedimientos de micropropagación fue muy similar para cada una de las plantas. El número de hojas y su tamaño no difirieron marcadamente según las observaciones.

Algunos clones de la planta transformante confirmada fueron trasplantados desde medio *in vitro* a tierra para evaluar su crecimiento y desarrollo en dichas condiciones, así como también su producción de frutos y semillas. Hasta ahora se está procediendo con dicho análisis.

Análisis de los patrones de expresión proteica en tomate.

Se realizaron extracciones de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas de plantas de tomate con el objetivo de analizar y comparar los patrones de expresión proteica y la posible detección de PRK2-his-myc. Esta proteína es un receptor de membrana plasmática según investigaciones anteriores y, por tanto lo más probable es encontrarla en la fracción insoluble (proteínas hidrofóbicas). Se procedió con la extracción de proteínas del transformante confirmado *PRK2-Cmyc-His6-PROK2* y de MoneyMaker en paralelo según se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente se realizaron ensayos de Bradford para determinación de su concentración. Tanto para el transformante como para MoneyMaker las concentraciones alcanzaron valores similares, de entre 250-300ng/ul para fracción de proteínas hidrofílicas y 50-55ng/ul para fracción de proteínas hidrofóbicas. Dada la baja concentración que presentaron éstas últimas (ambas extracciones de tomate), fueron sometidas a ensayo de aumento de la concentración por metodología de metanol-cloroformo (Materiales y Métodos). Luego de este ensayo se realizó nuevamente el procedimiento de Bradford para estimar su concentración, la cual mejoró considerablemente llegando a valores aproximados de 110ug/ul. Las proteínas extraídas fueron analizadas mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%. Se agregaron aproximadamente 20ul de muestra en cada pocillo. Las muestras fueron dispuestas de la siguiente manera, de izquierda a derecha: Fracciones hidrofílicas de tomate transformante y MoneyMaker, marcador molecular, fracciones hidrofóbicas de tomate transformante y MoneyMaker. Luego de la corrida electroforética se procedió a teñir el gel; primero con colorante de Coomassie y luego con nitrato de plata (Materiales y Métodos). Se obtuvo una mayor intensidad y claridad de banda con la tinción de nitrato de plata, que se muestra en la figura 19.

Respecto al gel, se notó que los patrones de expresión proteica en ambos tomates, tanto en fracción hidrofílica como hidrofóbica, fueron muy semejantes. Se aprecian prácticamente las mismas bandas en cada preparación. Se observaron algunas bandas pequeñas en las fracciones hidrofóbicas de ambos tomates similares en peso molecular a StPRK2 (72 Kilodaltons). Debido a esto, no se pudo afirmar que PRK2 se haya expresado. Según lo observado es muy posible que tomate posea receptores u otro tipo de proteínas de similar tamaño molecular que StPRK2, lo que explicaría la presencia de bandas en la región hidrofóbica de la extracción de Money Maker. Por otra parte, la expresión de proteínas foráneas en distintas especies vegetales suele ser baja comparada con bacterias, levaduras y otros sistemas de expresión (Desai et al., 2010).

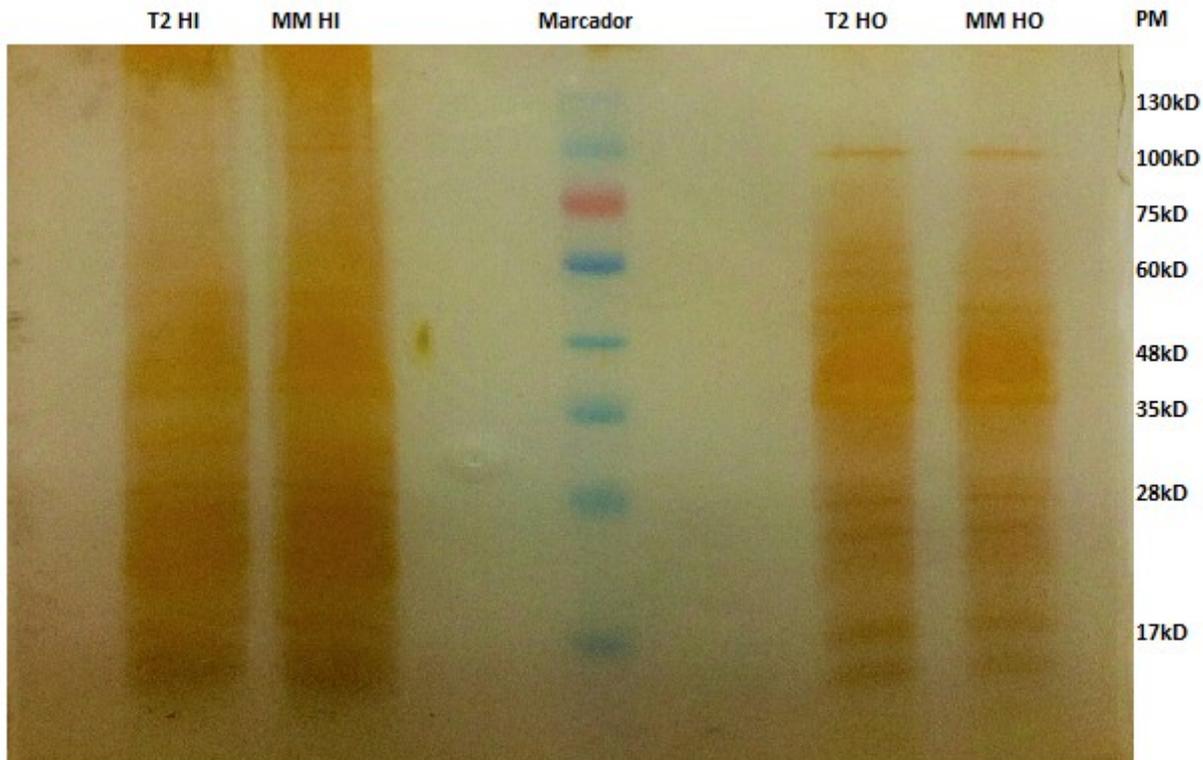


Figura 19. Visualización de los patrones de expresión proteica en tomate transformante y MoneyMaker. T2 HI: Fracción de proteínas hidrofílicas de tomate transformante 2. MM HI: Fracción de proteínas hidrofílicas de MoneyMaker. Marcador: Maeatrogen Accuruler RGB, con los pesos moleculares indicados en el costado de la foto y expresados en kiloDaltons (kD). T2 HO: Fracción de proteínas hidrofóbicas de tomate transformante 2. MM HO: Fracción de proteínas hidrofóbicas de MoneyMaker.

Detección de PRK2 mediante western blot.

Se realizó un ensayo de *Western blot* con el objetivo de detectar la presencia de PRK2 en las muestras proteicas hidrofílicas e hidrofóbicas de tomate. El protocolo paso a paso se encuentra detalladamente descrito en Materiales y Métodos. Como anticuerpo primario, se utilizó inmunoglobulina IgG proveniente de conejo (Pierce Thermo Scientific, USA), capaz de detectar epítopes 6xhis presentes en proteínas. La construcción generada contiene PRK2 seguido de un epítotope 6Xhis en su región C-Terminal por lo que puede ser detectada mediante el anticuerpo primario mencionado. La construcción posee igualmente un epítotope Cmyc corriente arriba del epítotope 6xhis, pero en ésta ocasión y basándonos en resultados previos, se eligió detectar la proteína mediante anticuerpo anti-6xhis. Como anticuerpo secundario, se empleó uno proveniente de cabra anti-inmunoglobulina IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabanita (Pierce Termo Scientific, USA). Brevemente, el anticuerpo primario detecta a la proteína en cuestión inmovilizada en una matriz sólida, en este caso una membrana de nitrocelulosa, luego el anticuerpo secundario conjugado se adhiere al primario y, en presencia de luminol, se produce una reacción quimioluminiscente que puede ser detectada mediante auto-radiografía.

Se ensayaron muestras de extracciones proteicas de tomate generado por transformación y tomate MoneyMaker, fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Se utilizó el marcador Accuruler RGB (Maestrogen) debido a que el mismo se transfiere a la membrana sin perder la tinción, facilitando la posterior determinación de los pesos moleculares de las bandas detectadas mediante el procedimiento. En el análisis de las autoradiografías, desde la exposición de 30 segundos hasta la

de 1 hora se obtuvieron imágenes con un patrón de bandas claro. A las 24 horas no se detectó banda alguna. Se eligió la fotografía con 1 hora de exposición, que es la que se observa en la figura 20. Los controles negativos (extracciones de tomate MoneyMaker hidrofílica e hidrofóbica) no mostraron banda alguna. La fracción hidrofílica de tomate transformado con la construcción no generó banda, lo cual se esperaba dado que PRK2, al tratarse de un receptor de membrana, no debería integrar dicha fracción de proteínas. Por su parte el control positivo, el cual consistió en una muestra de inducción proteica en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* cepa w303 transformada con el dominio quinasa de PRK3, mostró dos bandas: una de alrededor de 60kD la cual se aproxima al peso molecular de la proteína expresada y otra banda de peso muy superior, mayor a 130kD, lo que se correspondería probablemente con una versión modificada post-traduccion de la misma proteína. La fracción hidrofóbica de tomate transformado con la construcción desarrolló una banda única que pudo ser detectada con el procedimiento. Dicha banda poseía un peso molecular en el rango de los 70kD, muy similar al peso de PRK2 (72kD). El hecho de que, entre las 4 fracciones proteicas sólo la hidrofóbica de tomate transformante mostrara banda y con una masa molecular similar a la estimada de PRK2, sugiere que posiblemente éste receptor se expresó en la planta transformante. De ser así, debe tenerse en cuenta que el promotor es de naturaleza constitutiva, lo que promovería una constante expresión de PRK2 en el tomate transformado.

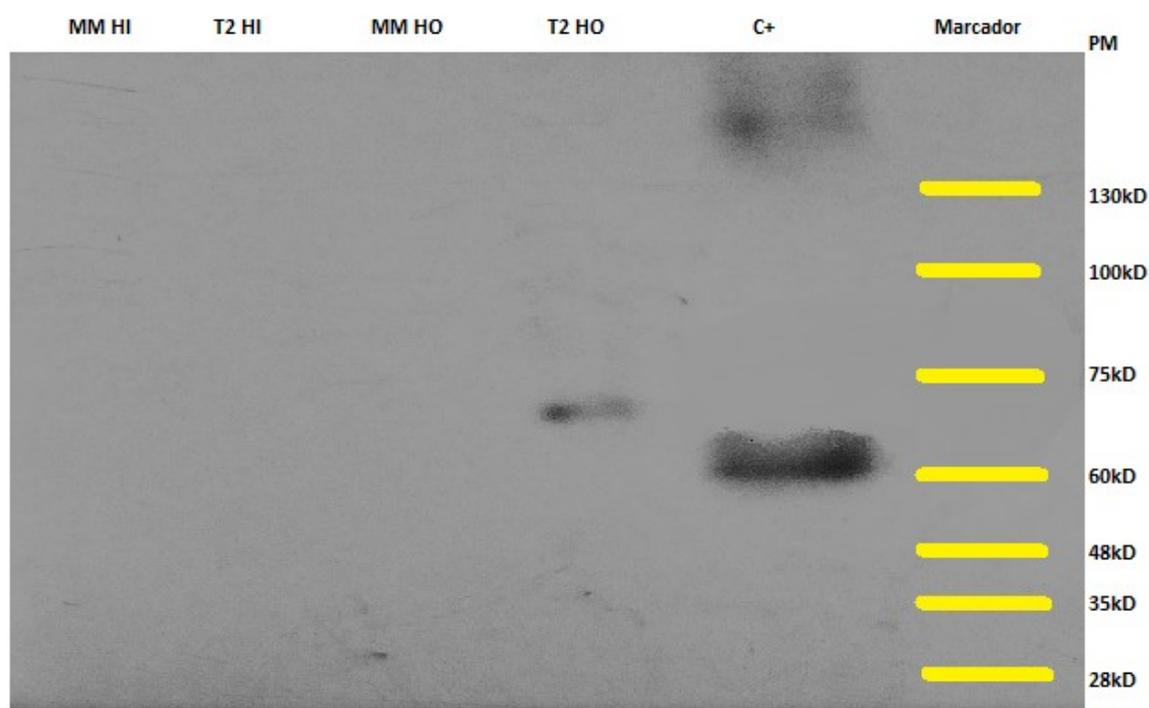


Figura 20. Visualización de PRK2 en placa radiográfica mediante técnica de western blot. MM HI: MoneyMaker fracción hidrofílica. T2 HI: Transformante 2, fracción hidrofílica. MM HO: MoneyMaker, fracción hidrofóbica. T2 HO: Transformante 2, fracción hidrofóbica. C+: Control positivo, PRK KIN expresado en levaduras. Marcador: Maestrogen Accuruler RGB con los pesos moleculares expresados en kiloDaltons en el costado.

Ensayos de infección de tomate con hongos.

Se realizó la puesta a punto de infecciones fungicas en tomate, con el objetivo de conocer y posteriormente reproducir las condiciones óptimas de infección de tomate con especies de hongos como *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Los hongos fueron mantenidos como se describe en Materiales y Métodos y las esporas se extrajeron de placas con micelios de aproximadamente un mes de edad. El conteo y cálculo del número de esporas se realizó con la ayuda de una cámara de Newbauber y microscopio óptico. Las plantas se infectaron luego de un mes desde su micropropagación.

Se analizaron algunos parámetros importantes relativos a ensayos de infección: concentración de esporas en el inóculo y volumen del inóculo. Se ensayaron 3 concentraciones de esporas: $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^5$ UFC (unidades formadoras de colonias) de las cuales sólo la primera no generó síntomas en tomate en ningún momento. Las concentraciones de $1 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^5$ dieron lugar al desarrollo de síntomas, siendo la primera de ellas la más adecuada por su moderada agresividad en la planta. En dicha concentración, los síntomas para ambas especies comenzaron a observarse claramente entre el quinto y sexto día para *Botrytis*, y a partir del décimo para *Colletotrichum*. Respecto al volumen de los inóculos, se ensayaron dos: 5ul y 10ul. En este caso, no se visualizó una marcada diferencia respecto a los síntomas en las hojas inoculadas, pero el volumen de 10ul mostró ser poco conveniente debido a que en varias ocasiones parte del inóculo no podía ser retenido por la hoja y tendía a caer al medio de cultivo. En la figura 21 se pueden observar imágenes representativas de los ensayos de infección.

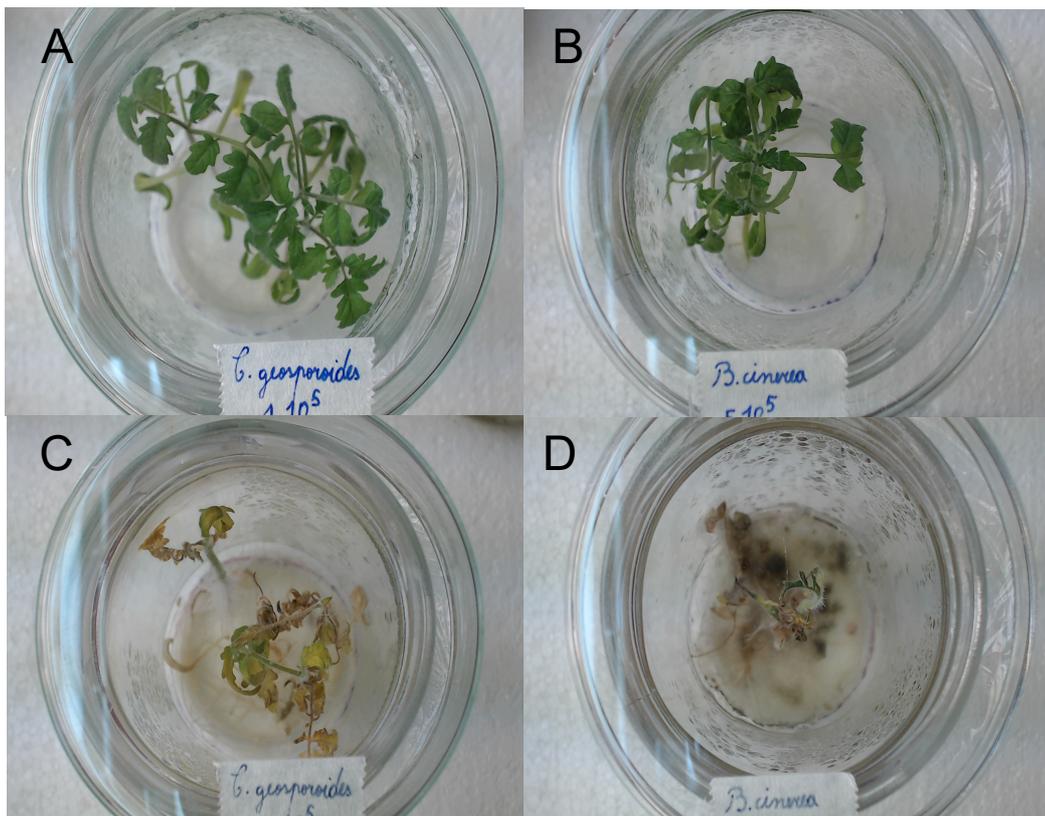


Figura 21: Fotografías de infecciones de plantas de tomate con hongos. A: Planta infectada con *Colletotrichum g.*, día 1. B: Planta infectada con *Botrytis c.*, día 1. C: Planta infectada con *Colletotrichum g.*, día 14. D: Planta infectada con *Botrytis c.*, día 20. Para las infecciones mostradas se utilizó una concentración de esporas de $1 \cdot 10^5$.

Búsqueda y análisis bioinformático de CRKs de tomate.

Se realizaron análisis *in silico* de receptores CRKs de tomate. Se llevó a cabo una serie de búsquedas en NCBI y Phytozome cuyas bases de datos contienen un gran número de genes de tomate anotados, con el objetivo de encontrar nuevos CRKs de tomate. En las búsquedas se utilizó la secuencia del receptor PRK2 de papa como templatado debido a que investigaciones anteriores encontraron algunos receptores con alto índice de homología al mismo en tomate. Cada uno de los receptores fue analizado detalladamente con programas informáticos (MatGat, Fgnesh, Softberry, Phylogeny.fr, Phytomine, SwissProt, Expasy, AgriGO, entre otros) lo que arrojó información a nivel de gen, secuencias promotoras, ARN, proteínas y relaciones filogenéticas. Los datos hallados fueron utilizados para comparar y correlacionar todos los receptores entre sí, dilucidar sus posibles funciones biológicas e implicaciones en respuestas defensivas frente a estrés biótico/fúngico. Se diseñaron *primers* para cada uno de los CRK los cuales fueron luego utilizados en ensayos de PCR cuantitativa.

Análisis a nivel de proteínas.

Utilizamos originalmente la secuencia proteica del receptor StPRK2 para nuestras búsquedas en las bases de datos. Por investigaciones anteriores, se conoce el número que identifica a la familia de proteínas que incluye a PRK2: PFAM01657. El PFAM consiste en una gran colección de alineamientos de secuencias y modelos que incluye a la mayor parte de los dominios proteicos y familias. Las proteínas comprendidas en el identificador PFAM01657 poseen una característica principal: presencia de dominios DUF26. Utilizando las bases de datos de los sitios Phytozome y NCBI, se encontraron 18 proteínas de tomate que en principio se presentaron como CRKs. Dos de ellas, mediante análisis informático de secuencias y dominios demostraron no pertenecer a éste grupo dada la falta de un dominio transmembrana, imprescindible en cualquier receptor de membrana. Dichas proteínas pertenecen a la familia PFAM01657, pero no pertenecen al grupo de los CRKs. Entonces, al eliminar dos de las proteínas, quedamos con 16 las cuales cumplen con los requisitos para incluirse dentro de los CRKs, y se nombran a continuación (elegimos los identificadores utilizados en el Phytozome): Solyc01g007960.2, Solyc01g007970.1, Solyc01g007980.2.1, Solyc01g007990.2.1, Solyc02g067780.2.1, Solyc02g079990.2.1, Solyc02g080010.2.1, Solyc02g080030.1.1, Solyc02g080070.2.1, Solyc02g080080.2.1, Solyc02g086590.2.1, Solyc03g111540.1.1, Solyc03g112730.2.1, Solyc05g005070.2.1, Solyc11g011870.1.1, Solyc11g011880.1.1, Solyc11g011880.1.1.

Una vez confirmados los 16 CRKs, se realizaron análisis detallados con el uso de herramientas bioinformáticas disponibles. En primer lugar, investigamos el grado de homología de cada uno de los CRKs de tomate con StPRK2 y solo 3 de ellos mostraron valores considerablemente altos: Solyc02g080070.2.1, Solyc02g080080.2.1, Solyc02g079990.2.1, con 89,5%, 72% y 69% respectivamente. Los restantes mantienen un grado de homología menor, con valores de entre 51-62%. Pudo observarse que las regiones que mantienen mayor grado homología son a su vez las más conservadas, como el sitio catalítico del dominio quinasa y las secuencias que conforman el dominio DUF26 en la región extracelular, lo cual con seguridad se relacione directamente con la funcionalidad biológica de los CRKs. Posteriormente se investigaron otros parámetros importantes,

los cuales se muestran en la tabla 1. Respecto al largo de la secuencia proteica, se observó una gran variabilidad: desde los 400 hasta los 856 aminoácidos, Solyc02g080030.1.1 y Solyc02g080010.2.1 respectivamente. Se observó que 13 de los 16 CRKs superan los 600 aminoácidos de largo. Los 3 que mayor homología mostraron con PRK2, poseen un largo de 676 aa (89,5%), 671 aa (72%) y 666 aa (69%).

Identificador	Secuencia	Módulos DUF26	Dom TM	Péptido señal	Ubicación	PM (kD)	PI	Cisteínas
Solyc01g007960.2	651	2	260-284	1-28 . Cliva en 28.	M plasmática	72,1	7,49	5
Solyc01g007970.1	655	2	273-299	1-46. Cliva en 47.	M plasmática	72,7	8,42	4
Solyc01g007980.2	638	2	259-277	1-27. Cliva en 28.	M plasmática	71,2	8,79	5
Solyc01g007990.2	638	2	246-271	1-20. Cliva en 21.	M plasmática	70,7	8,05	4
Solyc02g067780.2	495	1	85-109	No. Confirmado	M plasmática	55,9	6,07	2
Solyc02g079990.2	666	2	270-290	1-22. Cliva en 23.	M plasmática	74,2	6,52	4
Solyc02g080010.2	856	2	277-299	1-20. Cliva en 20.	M plasmática	96,2	7,02	4
Solyc02g080030.1	400	1	180-210	1-25. Cliva en 26.	M plasmática	45	5,29	3
Solyc02g080070.2	676	2	281-303	1-20. Cliva en 21	M plasmática	75	6,16	4
Solyc02g080080.2	671	2	285-307	1-21. Cliva en 21	M plasmática	74,6	6,02	4
Solyc02g086590.2	664	2	256-278	1-26. Cliva en 26	M plasmática	72,8	8,56	4
Solyc03g111540.1	675	2	275-299	1-30. Cliva en 31	M plasmática	75,9	6,17	4
Solyc03g112730.2	616	2	209-233	No. Confirmado	M plasmática	67,9	6	4
Solyc05g005070.2	719	2	3: 33-54 ; 83-102; 320-340	No. Confirmado	M plasmática	80,5	6,81	5
Solyc11g011870.1	455	1	134-156	No. Confirmado	M plasmática	50,4	7,97	2
Solyc11g011880.1	642	2	264-286	1-26. Cliva en 27	M plasmática	72,3	9	5

Tabla 1. Se muestran datos a nivel de proteínas de los 16 CRKs de tomate. Abreviaciones: Dom TM=dominio transmembrana, PM=peso molecular, PI=punto isoeléctrico, Cisteínas=Cisteínas presentes en el los dominios DUF26 y que podrían influir en el plegamiento de la proteína.

PRK2 posee 676 aa, lo mismo que su principal homólogo de tomate. Posteriormente se realizaron los cálculos de peso molecular utilizando la herramienta Prot Param del ExPASy. Al igual que el largo de la cadena aminoacídica, el peso molecular mostró grandes diferencias, que van desde los 45 KD hasta los 96 KD (Solyc02g080030.1.1 y Solyc02g080010.2.1 respectivamente). Esta variabilidad es elevada considerando que se trata de proteínas de la misma familia y similares dominios. Los restantes poseen pesos moleculares que rondan los 70 KD, similar a StPRK2 (72kD). Respecto a los dominios, observamos que todos los CRKs cuentan con los 3 dominios básicos: quinasa intracelular, transmembrana y dominio extracelular con módulos DUF26 según Phytozome. El dominio transmembrana se encuentra entre los dominios quinasa y extracelular y las longitudes que van desde los 20 a 30 aa. Para su búsqueda, se utilizó la herramienta Phobius (Kall et al., 2007), la cual usa un algoritmo matemático para hallar áreas muy hidrofóbicas dentro de la proteína. Uno de los CRKs, Solyc05g005070.2.1 mostró 3 secuencias las cuales se reconocieron como dominios transmembrana y una de ellas se ubicaría en el dominio extracelular (tabla 1). Este hallazgo podría sugerir un mayor nivel de complejidad en el anclaje de algunos CRKs en la membrana plasmática. Otra posibilidad sería que el programa pueda estar confundiendo un dominio transmembrana con el péptido señal. Luego, respecto al dominio extracelular, 13 de los 16 CRKs mostraron dos módulos DUF26 mientras 3 presentaron solamente 1 módulo DUF26. Éstos 3 CRKs son a su vez los más pequeños, con tamaños de 45, 50,4 y 55,9 (Solyc02g080030.1.1, Solyc11g011870.1.1 y Solyc02g067780.2.1 respectivamente). Se analizó luego la presencia de péptido señal con la utilización de programas informáticos Signal p-5.0 y Phytomine. Se observó

que 12 de los 16 CRKs poseen péptido señal de entre 20-46 aminoácidos en la región N-terminal y con sitio de clivaje. Los CRKs que, según los programas utilizados, carecen de péptido señal son Solyc05g005070.2.1, Solyc03g112730.2.1, Solyc11g011870.1.1, Solyc02g067780.2.1. Sin embargo, análisis por programa Deep-Loc1.0 Y Wolfpsort predijeron que todos los CRKs se ubican en la membrana plasmática, lo cuál ya se había reportado para este tipo de receptores (Montesano et al., 2001). Es probable que las secuencias de los CRKs que carecen de péptido señal presenten sesgos o se encuentren incorrectamente anotadas en las bases de datos, ya que para migrar a la membrana plasmática los receptores necesitarían de un péptido señal que las dirija (Cymer et al., 2015). Otra posibilidad podría ser la existencia de mecanismos celulares que no requieran la presencia de péptido señal para dirigir el receptor proteico al lugar indicado. Se analizaron igualmente otros parámetros proteicos como punto isoeléctrico (PI) y el patrón de cisteínas. El punto isoeléctrico es el PH en el cual un polianfolito o molécula multicargada (en este caso una proteína) posee carga 0 o neutra (Cargile et al., 2004). Se trata de una característica importante ya que puede brindar información sobre su estructura, plegamiento y composición iónica. Para dicha característica encontramos una relativa variabilidad, con valores de PI que van desde levemente ácido con 5,29 (Solyc02g080030.1.1) hasta básico con 9 (Solyc11g011880.1.1) aunque la mayoría se encuentra en valores neutros cercanos a 7, indicando que la proporción de partículas cargadas positivamente es similar a la proporción de partículas cargadas negativamente. Posteriormente se analizaron las cisteínas que se unen entre sí (pares) contribuyendo con el plegamiento y disposición tridimensional del modulo DUF26 y el dominio extracelular. Se observó que la mayoría posee entre 4-5 pares de cisteínas, mientras que los más pequeños poseen 2-3, por tanto se trata de una característica dependiente del tamaño. Cada modulo DUF26 posee 2 o 3 pares, por tanto aquellos CRKs que presenten mas de un dominio DUF tendrán a su vez más pares de unión de cisteínas. Es probable que el plegamiento tridimensional de estos módulos se vincule directamente con la función del receptor. Estos resultados en su conjunto muestran la naturaleza variada de los receptores CRKs hallados en tomate.

Mediante la herramienta informática AgriGO (Zou et al., 2010) se estudió la función putativa de cada uno de los 16 receptores. El mismo utiliza un algoritmo y comparando con una amplia base de datos es capaz de asignar una función a una proteína o grupo de proteínas con grado alto de precisión. Las secuencias proteicas de los 16 CRKs fueron agregadas en el programa y los resultados se observan en la figura 22. El resultado es una imagen con diferentes puntos jerárquicos (figuras rectangulares) que contiene todos los términos estadísticamente significativos y cada cual posee un color que lo identifica. Cuanto menor sea el valor-p ajustado del término, más significativo será estadísticamente, y el color del nodo es más oscuro y más rojo. En términos biológicos, a medida que los colores se intensifican y se vuelven más oscuros (de blanco a rojo) se está alcanzando un mayor grado de especificidad en la función biológica asignada a la proteína. La función específica que el programa determinó para los 16 CRKs de tomate es la fosforilación aminoacídica (serin threonin quinasa), lo cual es consistente con análisis e investigaciones anteriores (Montesano et al., 2001; Delgado-Cerrone et al., 2018).

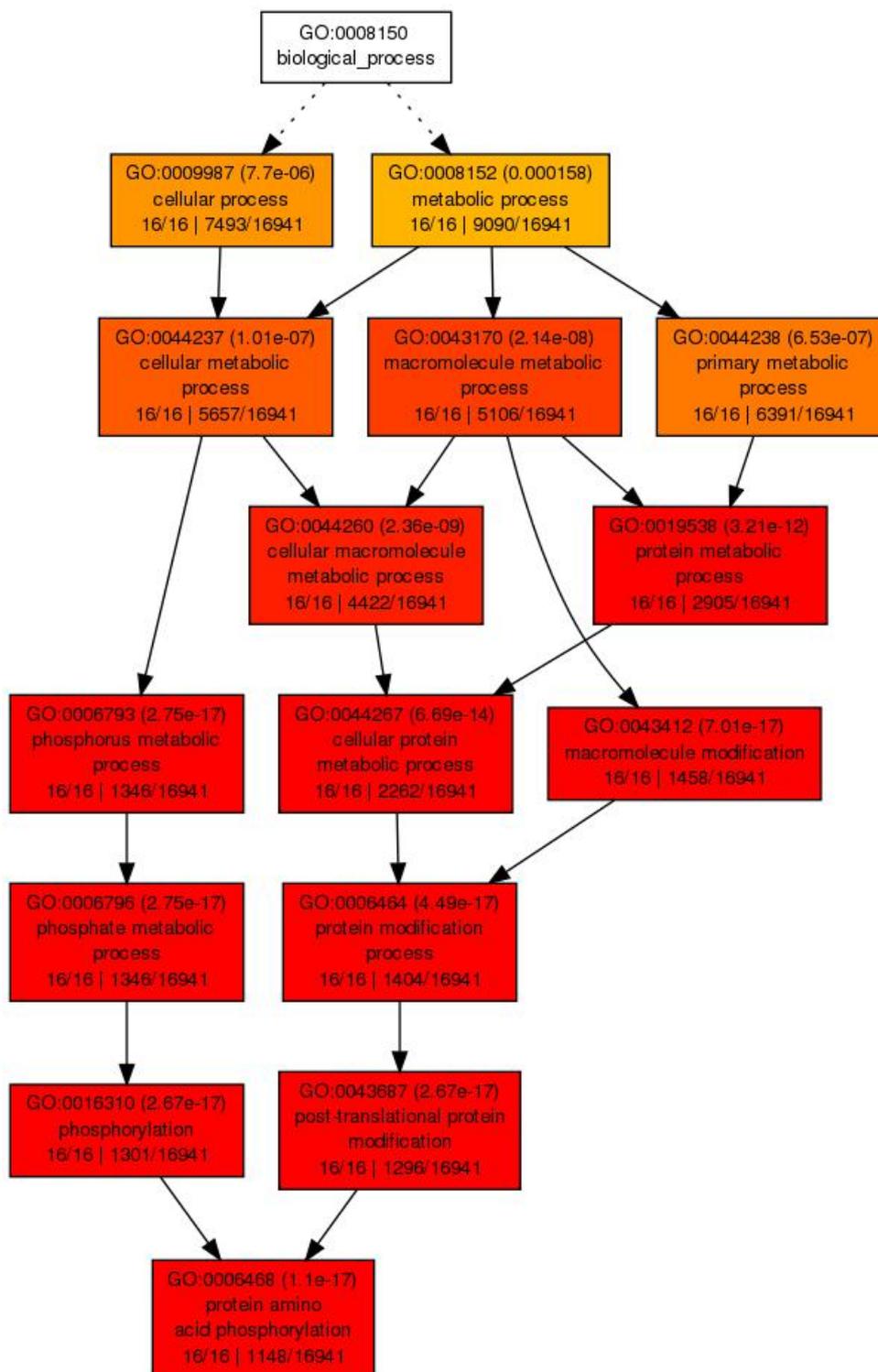


Figura 22. Imagen que muestra el resultado proporcionado por el programa AgriGO2.0. GO+número es un identificador de función bioquímica basado en publicaciones. El valor p, (por ejemplo 1,1e-17) consiste en un respaldo estadístico de la función asignada por el programa y cuánto menor se muestre, mayor será su significado estadístico. Se presenta igualmente la proporción de proteínas en la base de datos que poseen la misma función bioquímica que las de nuestro estudio, en este caso 1148/16941. Se muestra la función asignada en el centro de cada cuadro y la proporción de proteínas de nuestro estudio a la cuales el programa asigna las mismas funciones, en este caso 16/16.

Análisis a nivel de ADN y ARN.

Se realizaron análisis a nivel de ADN y ARN de los 16 CRKs de tomate anteriormente confirmados. Para cada uno de ellos, se usan los mismos identificadores los cuales fueron ya empleados cuando se presentaron los resultados del análisis a nivel de proteínas. Se hallaron algunos datos que se muestran a continuación (tabla 2). Primeramente se analizaron las ubicaciones genómicas de cada uno de los genes. Se observó que los 16 CRKs se encuentran distribuidos solamente en 5 cromosomas (chr). Interesantemente, es el chr 2 el que más genes de CRKs concentra, con 7 de los 16 totales. Le sigue el cromosoma 1 con 4 genes de CRKs, los chr 3 y 11 con 2 y por último el chr 5 con 1. Si bien no existe un gran número de CRKs diferentes en tomate, llama la atención lo poco distribuidos que se encuentran en el genoma. Es probable que la ocurrencia de eventos de duplicación génica en el pasado conjuntamente con la selección natural hayan causado esta disparidad en la distribución de los CRKs. Los eventos de duplicación génica en plantas no son poco comunes y se sabe que muchas veces pueden mejorar el fitness o éxito reproductivo de la especie (Panchy et al., 2016; Andolfo et al., 2015).

Otro aspecto que se analizó fue la presencia de secuencias génicas repetidas en tándem (un mismo gen repetido varias veces dentro de un mismo locus) y los resultados fueron igualmente interesantes. Según Phytomine, en 14 de los 16 CRKs están presentes las repeticiones en tándem, y 11 de los 14 presentan más de una secuencia repetida (tabla 2). Solyc11g011870.1 y Solyc11g011880.1, los cuales se encuentran en el chr 11, mostraron 6 repetidos. Solyc03g005070.2 y Solyc03g111540.1 presentaron 5 y 4 repetidos en tándem respectivamente. La presencia de numerosos repetidos en un mismo locus no resulta del todo llamativa ya que se trata de un fenómeno reportado frecuentemente y se hipotetiza que contribuye con la evolución de las diferentes familias de proteínas (Panchy et al., 2016). Estudios realizados han reportado que alrededor del 10% o más de los genes de *Arabidopsis thaliana* y arroz presentan repetidos en tándem (Yu et al., 2015; Soltis et al., 2015). Los repetidos se han descubierto principalmente en genes cuyos productos se vinculan con la respuesta frente a estrés y proteínas de membrana en arroz y en genes de respuesta a patógenos en Solanáceas y Brassicáceas (Yu et al., 2015; Leister 2004). Un ejemplo bien documentado de repetido en tándem en tomate comprende los genes cf4-9 los cuales codifican para receptores de membrana con dominio extracelular rico en leucina y se ubican en el chr 1. Estos genes contribuyen a la defensa del tomate contra hongos como *Cladosporium fulvum* y se han generado tomates modificados que sobreexpresan estos genes (Parniske 1997; Parniske et al., 1999; Kim et al., 2017). Considerando dichas investigaciones, nuestros resultados sugieren que varios de los CRKs de tomate podrían desempeñar roles importantes en el ciclo vital de la planta.

Por otra parte se analizó el número teórico de transcritos de cada uno de los CRKs hallados. En este caso los resultados fueron idénticos para todos: según Phytomine, los 16 CRKs presentan 1 solo transcritos. En otros receptores se han descubierto formas alternativas para sus transcritos, pero quizás no se aplique con los CRKs de tomate según nuestros resultados. Se estudió paralelamente la composición de intrones y exones en cada uno de los genes. Según Phytomine y FGNESH (Solovyev et al., 2006), los números de exones van de 6 a 9, mientras que los intrones van de 5 a 8. En todos los casos, los exones superan por una unidad a los intrones. Se observó que la longitud de intrones y exones son similares.

Los resultados obtenidos en su conjunto nos ayudan a conocer su naturaleza a nivel de ADN y nos permitieron averiguar datos hasta ahora desconocidos los cuales podrían contribuir con la

dilucidación de aspectos importantes y hasta ahora desconocidos relacionados con los CRKs de tomate.

Identificador gen	Ubicación cromosómica	Tándem	Largo gen	Número transcritos.	Largo transcripto	Largo cds	Exones	Intrones
Solyc01g007960.2	SL2.50ch01:2149842-2152519	1	2678	1	2002	1956	6	5
Solyc01g007970.1	SL2.50ch01:2153668-2157136	1	3496	1	1968	1968	9	8
Solyc01g007980.2	SL2.50ch01:2161571-2164368	1	2798	1	2108	1917	8	7
Solyc01g007990.2	SL2.50ch01:2170706-2173712	1	3007	1	2235	1917	7	6
Solyc02g067780.2	SL2.50ch02:37895016-37897553	2	2538	1	1652	1488	7	6
Solyc01g007960.2	SL2.50ch02:44353432-44356498	3	3067	1	2242	2001	7	6
Solyc01g080010.2	SL2.50ch02:44360278-44364646	3	4369	1	2654	2571	8	7
Solyc02g080030.1	SL2.50ch02:44369655-44371926	3	2272	1	1203	1203	5	4
Solyc02g080070.2	SL2.50ch02:44382173-44386350	3	4178	1	2364	2031	7	6
Solyc02g080080.2	SL2.50ch02:44390904-44394354	3	3451	1	2139	2016	7	6
Solyc02g086590.2	SL2.50ch02:49245804-49249742	0	3939	1	2496	1995	7	6
Solyc03g111540.1	SL2.50ch03:62145384-62148246	4	2863	1	2028	2028	7	6
Solyc01g112730.2	SL2.50ch03:63071332-63074048	0	2717	1	2230	1851	6	5
Solyc03g005070.2	SL2.50ch05:74921-78722	5	3802	1	2434	2160	9	8
Solyc11g011870.1	SL2.50ch11:4812501-4815269	6	2769	1	1368	1368	8	7
Solyc11g011880.1	SL2.50ch11:4818939-4822147	6	3209	1	1929	1929	8	7

Tabla 2. Se muestran datos relacionados con ADN y ARN de cada uno de los 16 CRKs de tomate.

Análisis a nivel de promotores.

Con el uso de la herramienta Phytomine, se extrajeron las secuencias promotoras hasta 1000pb corriente arriba del codón de inicio para cada uno de los CRKs de tomate. Con la ayuda de dichas herramientas se analizaron los promotores en búsqueda de secuencias o motivos conocidos que puedan aportar información sobre los genes y su expresión. Pudo observarse que se trata de promotores complejos, conformados por un gran número de motivos conocidos y caracterizados que se han observado en otros genes, algunos repetidos varias veces. Cabe aclarar que los motivos representan una gran cantidad, por lo que seleccionamos solamente algunos que consideramos mas relevantes, mas representativos y/o mas repetidos para mostrar en la tabla 3. Primeramente, destacamos la presencia del motivo o elemento ABRE en 9 de los 16 CRKs. ABRE, por las siglas en inglés significa elemento de respuesta al ABA (ácido absísico). El ABA es una hormona relevante la cuál participa en en el desarrollo vegetal y vías de señalización las cuales contribuyen con la defensa de la planta frente a algunas especies de patógenos (Mauch Mani and Mauch 2005). Este elemento ha sido reportado en las secuencias promotoras de algunos genes como Em1 Y Rab16 los cuales codifican para proteínas del tipo dehidrinas y se encuentran dentro de las LEAs (proteínas abundantes en la embriogénesis). Se trata de chaperonas y se sabe están implicados en la línea de defensa de la planta frente a estrés abiótico como estabilizantes de la integridad celular (Nakagawa et al., 1996; Ganguly et al., 2012; Banerjee y Rochyndoury 2017). En 5 de los 9 CRKs, Solyc01g007970.1, Solyc02g080070.2, Solyc02g086590.2, Solyc03g111540.1, Solyc11g011880.1, estos elementos se encuentran repetidos, lo que podría indicar la importancia del elemento ABRE en la expresión del gen. Es probable que el ABA pueda influir con la expresión de los CRKs de

tomate que presenten el elemento ABRE en sus promotores. Por otro lado, se observó que Solyc02g080070.2, el cual posee dos elementos ABRE, presenta a su vez el motivo AT-ABRE. Este último es un elemento accesorio de respuesta al ABA frente a la deshidratación (Banerjee et al., 2017), lo que sugiere que el gen que cuyo promotor lo posee puede responder frente a situaciones de estrés abiótico, concretamente ante la falta de agua. Se analizó la presencia de BOX-W1 en los promotores de CRKs de tomate. El motivo BOX-W1 consiste en un elemento de respuesta frente a elicitores fúngicos y se ha observado en promotores de proteínas PR (asociadas con la patogenicidad) de *Arabidopsis thaliana* (Rushton 1996). Según reportes, este elemento podría ser importante en la activación de la defensa de la planta frente a patógenos fúngicos. Según la información obtenida, 7 de los 16 CRKs (tabla 3) presentan dicho motivo lo cual sugiere la posibilidad de que varios CRKs de tomate se vinculen con mecanismos de defensa frente a fitopatógenos de naturaleza fúngica. Se analizó también la presencia del elemento-CGTGA el cual, basado en investigaciones anteriores se trata de un motivo regulatorio presente en proteínas involucradas en la respuesta de la vía del metil jasmonato, especialmente en proteínas PR cuya transcripción es inducida por el factor caWRKY40 (Ifnan Khan et al., 2018). 6 de los 16 CRKs poseen dicho elemento en sus promotores, lo cual sugiere su participación cuando dicha vía defensiva se activa. Respecto al motivo ERE, se observó que también 6 de los CRKs de tomate lo presentan. Dicho motivo ha sido observado en angiospermas, y los genes que lo poseen se especula que están asociados a respuestas frente a una alta concentración de etileno (Sazegari et al., 2015; Li et al., 2015). El etileno es una hormona que desempeña importantes funciones en el ciclo de vida de la planta, como la floración y maduración del fruto y participa en respuestas defensivas frente a patógenos de diferentes especies asociado al metil jasmonato (Pieterse 2012).

Identificador	ABRE	AT~ABRE	W box	CGTCA-motivo	ERE	STRE	TCA	WUN-motivo	MYB
Solyc01g007960.2	562-		593	520, 931-					varios
Solyc01g007970.1	171-, 487-		230		438, 907	16-			333-, 938
Solyc01g007980.2					6, 524, 57-	708, 842-		347	756-, 976-
Solyc01g007990.2			180, 686	425-		992-		97	varios
Solyc02g067780.2	543		817-	155-, 569-, 313, 981	254-	353-, 416-, 382		164-	59-, 903-, 890-
Solyc02g079990.2	573			689		913-		49	802
Solyc02g080010.2					540-			630	
Solyc02g080030.1				739-				201-, 583, 501-	712
Solyc02g080070.2	563-, 565-	563-			varios				466-
Solyc02g080080.2			892-						
Solyc02g086590.2	415-, 543-, 454		701-					809	77
Solyc03g111540.1	582-, 583						933		762-, 975
Solyc03g112730.2									923-
Solyc05g005070.2	789-			711		731-			
Solyc11g011870.1					676-				21-
Solyc11g011880.1	248, 743, 249		697				944	771-, 772-	679, 916-

Tabla 3. Se muestran algunos de los motivos más importantes que componen los promotores de cada uno de los CRKs de tomate y su ubicación dentro de la secuencia promotora analizada.

Estos resultados sugieren que algunos de los CRKs de tomate participan en la vía de señalización del etileno y los jasmonatos. Posteriormente se analizó la presencia del motivo STRE el cual se trata de un elemento de respuesta frente situaciones de estrés como shock por altas y bajas temperaturas, bajos Phs, falta de nutrientes, entre otros. Un ejemplo de proteínas que llevan dicho motivo son las GRP2 de *Arabidopsis*, las cuales consisten en proteínas de unión al ARN

capaces de regular transcripcionalmente a otras proteínas y enzimas. Su actividad se induce principalmente en condiciones de estrés abiótico como sequías (Lu 2019). Se observó que 6 de los CRKs de tomate presentan el motivo lo cual sugiere la probabilidad de que algunos de los CRKs participen en respuestas de estrés abiótico. Se estudió la presencia del motivo TCA, que ha demostrado vincularse con la respuesta celular frente al ácido salicílico y se lo relaciona con respuesta frente a estrés biótico. El promotor del gen KcCAS el cual codifica para la cicloartenol sintasa posee dicho elemento (Basyuni et al., 2018). Se observó que solo dos CRKs, Solyc03g111540.1 y Solyc11g011880.1, poseen dicho motivo, por lo que se deduce que es probable que respondan ante concentraciones crecientes de la hormona en situaciones de estrés causado por fitopatógenos. La presencia del elemento WUN, que se trata de un motivo de respuesta frente a herida fue analizada en los promotores de CRKs. Este motivo ha sido reportado en receptores lectina tipo quinasa de arroz, que responden ante herida y ataque por patógenos (Passricha et al., 2017). Se observó en este caso que 8 de los 16 CRKs presentan dicho motivo. Se sabe que la respuesta frente a una herida o daño mecánico se relaciona estrechamente con la defensa de la planta frente a organismos patógenos (Zipfel et al., 2009). El último motivo en estudiarse fue el MYB, que forma parte del promotor de *Arabidopsis* del gen que codifica para la pro dehidratasa, cuya función es la producción de ácido glutámico a partir de prolina y se induce en situación de sequía (Wang et al., 2019). Se observó que 13 de los 16 lo poseen, constituyendo el motivo de mayor presencia en los CRKs de tomate. Es posible que la presencia de este motivo complemente vías de respuesta frente a situaciones de sequía y estrés abiótico en general.

Los resultados del análisis de promotores CRKs en su conjunto sugieren que estos receptores se relacionan con respuestas frente a amenazas de diferente naturaleza, incluyendo estrés biótico y abiótico, como patógenos fúngicos y fitopatógenos en general, shock por altas y bajas temperatura, bajo Phs, bajas cantidades de nutrientes en el ambiente, estrés hídrico, entre otros. Debe destacarse que algunos CRKs poseen elementos de respuesta frente a hormonas como el ácido salicílico, jasmonatos, etileno y ABA, lo que sugiere estos receptores integran complejas vías de señalización mediadas por dichas hormonas. Resulta llamativa la fuerte presencia de elementos o motivos de respuesta frente a estrés abiótico, pues 7 de los 9 elementos analizados se han vinculado a situaciones de esa índole. Es posible que además de desempeñar roles de defensa frente a diferentes amenazas, algunos CRKs se relacionen con funciones vitales en el desarrollo y ciclo de vida de las plantas de tomate. Hasta ahora nuestro objetivo se ha basado en el análisis de los receptores CRKs de tomate, con énfasis en defensa de la planta frente a fitopatógenos, pero los resultados obtenidos sugieren una complejidad funcional mucho mayor en estos receptores.

Estudio de las relaciones genéticas de los CRKs de tomate.

Se realizó un árbol genético de los CRKs de tomate con la información obtenida del NCBI y Phytozome. Para ello se utilizó la función Phylogenetic Tree del programa MEGAX y se aplicó el modo de análisis bajo metodología de parsimonia, muy utilizado para diferentes estudios genéticos y genéticos (Nei y Kumar 2000, Kumar et al., 2016). Los resultados se presentan en la figura 23. Se generó un árbol genético que relaciona a los CRKs de tomate, con sus ramas y valores para cada uno de los nodos. El índice de consistencia es 0.845282, el índice de retención es 0.75643 y el índice compuesto es 0.639397 para todos los sitios informativos de parsimonia. El árbol se obtuvo utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (Kumar et al., 2016). Hubo un total de 979 posiciones en el conjunto de datos final. Se utilizaron las secuencias proteicas

para el desarrollo de las relaciones genéticas aquí mostradas. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X.

Relativo a los CRKs, se observa que el grupo más externo del árbol se compone de Solyc01g007960.2.1 y Solyc01g007990.2.1, los cuales se ubican en el mismo cromosoma (el número 1) y poseen un ancestro en común cercano (figura 23). Luego aparecen Solyc01g007970.1.1 y Solyc01g007980.2.1, los cuales según el análisis comparten un ancestro en común lejano con la mayoría de los CRKs y se ubican también en el chr 1. Por otra parte, Solyc02g080070.2.1, Solyc02g080080.2.1, Solyc02g079990.2.1, Solyc02g080010.2.1 y Solyc02g080030.1.1 se encuentran estrechamente relacionados, se ubican todos en el chr 2 y comparten un ancestro en común con un valor de nodos de 23. Solyc03g111540.1.1 comparte ancestro en común lejano con los 5 anteriores, aunque se ubica en el chr número 3. Por su parte, Solyc11g011880.1.1 y Solyc11g011870.1.1 mostraron una relación genética cercana y se ubican en el chr 11. Solyc02g086590.2.1 y Solyc03g112730.2.1 se muestran cercanos, aunque se ubican en regiones genómicas completamente diferentes (chr 2 y 3 respectivamente). Por último, Solyc02g067780.2.1 y Solyc05g005070.2.1 no muestran parentesco cercano con ningún otro CRK, y pertenecen a chr 2 y 5 respectivamente.

Según lo expuesto, en general los CRKs más cercanos entre sí genéticamente se encuentran en el mismo cromosoma, sugiriendo que la mayoría de ellos surgieron por procesos de duplicación génica. Otros en cambio, pueden haberse generado por eventos de duplicación y traslocación, pasando de un cromosoma a otro, como Solyc03g111540.1.1. Se requerirán nuevos análisis para dilucidar más en profundidad las relaciones genéticas entre los 16 CRKs de tomate así como estudios a nivel evolutivo los cuales proporcionarían información sobre sus funciones y la selección de estas proteínas en la historia natural de las plantas.

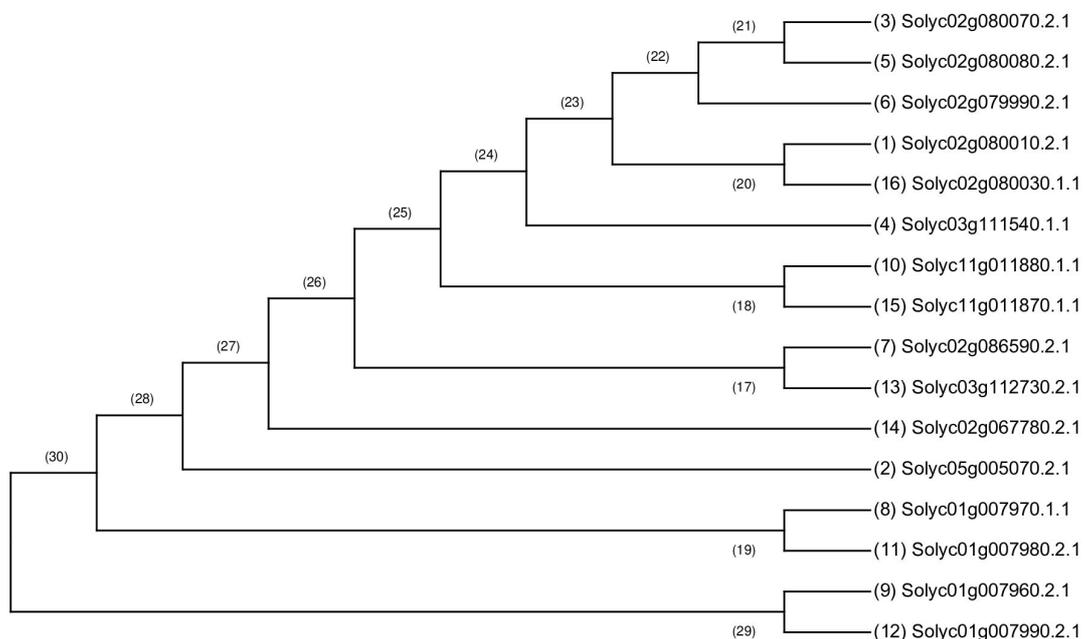


Figura 23: Árbol genético de los 16 CRKs de tomate. Pueden observarse los valores para cada una de las ramificaciones.

Análisis de expresión de CRKs frente a infecciones con *Botrytis cinerea*.

Se analizó la expresión génica de algunos CRKs de tomate mediante ensayos de PCR cuantitativa. Para ello se realizaron infecciones en plantas de tomate in vitro de 4 semanas de edad y utilizando un inóculo de 5ul y 1×10^5 UFC tal como se describe en la sección “Ensayos de infección de tomate con hongos”. Se infectaron hojas de tomate y las mismas fueron cortadas a las 24 horas, congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80C. Se tomaron hojas sin infectar, lo que consideramos como control y repetimos el mismo procedimiento de extracción. Paralelamente se trataron hojas con agua y herida y se extrajo la hoja a las 24 horas. Se realizaron 4 réplicas para infección, control y tratamiento con herida y agua. Las hojas extraídas fueron procesadas de modo de obtener ARN de ellas (Materiales y Métodos) y se llevaron a cabo ensayos de retrotranscripción para generar ADNc el cual serviría como molde en los ensayos de PCR. Se diseñaron primers *forward* y *reverse* para cada uno de los 16 CRKs de tomate.

Para todas las reacciones de PCRs en tiempo real se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN, Alemania.) y un termociclador QuantiStudio (Applied Biosystems, USA). El programa de ciclado así como los primers empleados y sus características se presentan en Materiales y Métodos. Se utilizaron primers de genes *housekeeping* los cuales sirvieron como referencia de expresión en las condiciones de trabajo. Se realizó una prueba para corroborar si los primers, tanto de los 16 CRKs como los de referencia, funcionan correctamente. Para dicha prueba se utilizó una mezcla de ADN con muestras provenientes de cada una de las 3 condiciones a analizar en partes igualitarias (24 horas infección, control 0 y herida con agua). Se corrió el producto de esta prueba en un gel de agarosa 1% (p/v) para analizar el tamaño de los fragmentos amplificados. Pudo observarse que todos los primers generaron productos con los tamaños esperados. Luego de la prueba primaria de amplificación, se procedió a estudiar la efectividad de los primers en la reacción de PCR. Se realizaron diluciones seriadas de la muestra de ADN original (ver Materiales y Métodos). Se observó que únicamente 5 juegos de primers de CRKs y un *housekeeping* mostraron una efectividad aceptable, levantando entre el ciclo 25 y el 28, con valores de entre 90 y 108%. Dichos primers fueron 7960, 7990, 80070, 80080 y 11880 para los CRKs y LSM7 para gen de *housekeeping*. Esta fue una primera aproximación y en las siguientes, se mejorará el diseño de los primers para los CRKs aplicando el conocimiento adquirido.

Se procedió a analizar la expresión mediante qPCR de los 5 CRKs para los cuales sus primers diseñados mostraron un valor aceptable de efectividad. Se utilizaron 4 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas en los ensayos. Los resultados fueron extraídos y analizados mediante el software QuantistudioAnalyzer (Applied Biosystems) y Excel (Microsoft). Se determinaron los valores de Ct, dCt, ddCt y 2ddCt y los desvíos estándar. Los resultados se muestran en la figura 25. Para el gen Solyc02g080080 no se obtuvieron resultados consistentes, por lo tanto no fueron incluidos en dicha figura. Se puede observar que dos de los genes Solyc01g007990.2.1 y Solyc11g011880.1.1 mostraron sobreexpresión en condiciones de infección con *Botrytis cinerea* a las 24 horas, cuadruplicando y duplicando respectivamente los niveles de expresión respecto al control. Para los restantes genes analizados, Solyc01g007960.2.1 y Solyc02g080070.2.1, si bien los promedios de expresión en condiciones de infección con *Botrytis cinerea* a las 24 horas mostraron mayores valores, el elevado nivel de error impide afirmar que efectivamente allí exista sobreexpresión de dichos CRKs. Solyc02g080070.2.1 mostró un valor superior de expresión en tratamiento de herida con agua a las 24 horas comparado con la muestra de infección con *Botrytis cinerea*.

Los resultados de qPCR respaldan la hipótesis de que algunos CRKs de tomate podrían estar implicados en mecanismos de defensa frente a patógenos, ya que observamos sobreexpresión de 2 genes (de 4 analizados) en muestras de tomates infectados con *Botrytis cinerea*.

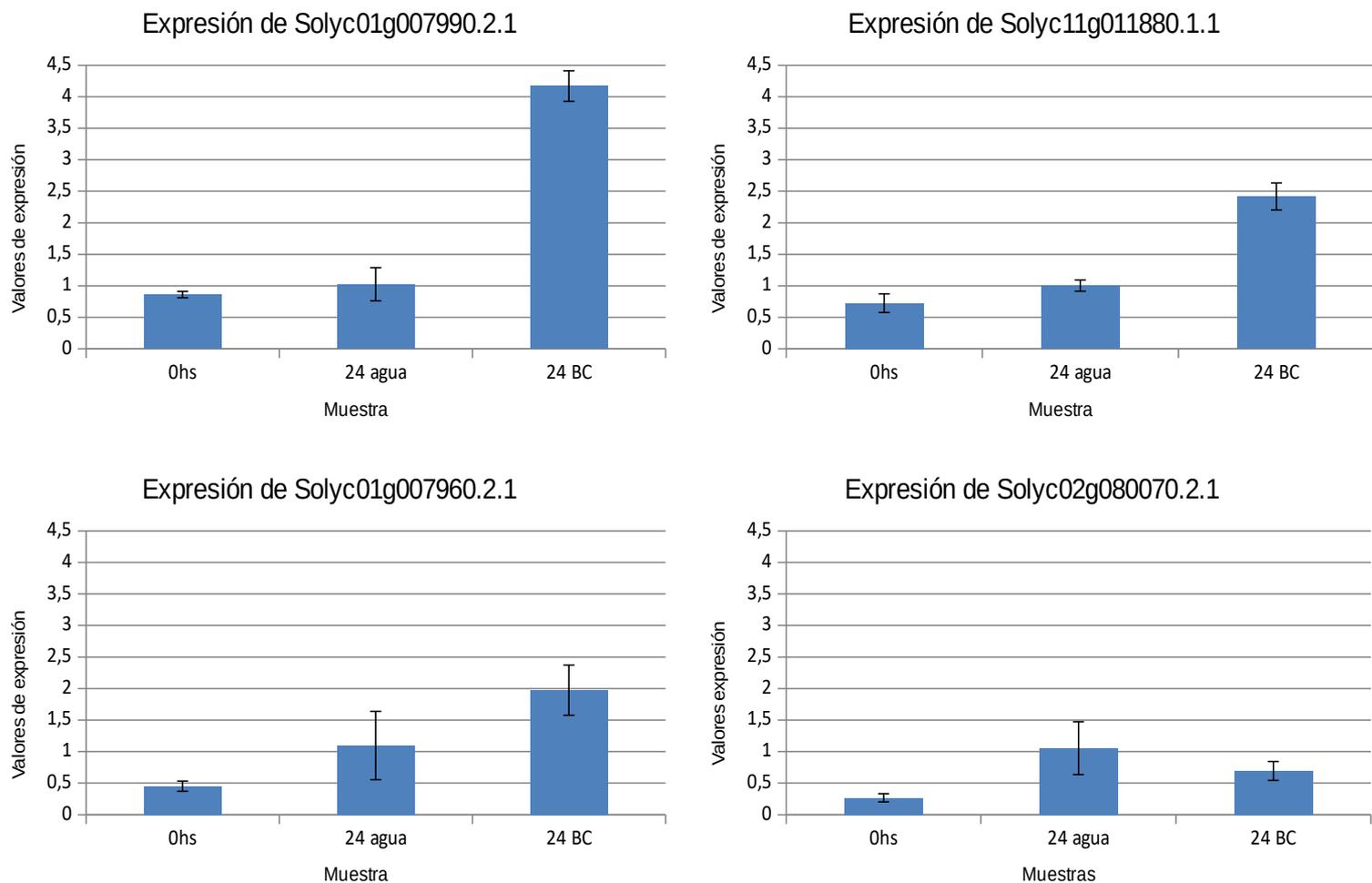


Figura 25. Promedios de los valores de expresión de 4 genes CRKs de tomate según lo obtenido por qPCR. 0Hs: Control 0. 24 agua: tratamiento herida y agua, muestra 24 horas. 24 BC: infección con *Botrytis c*, muestra 24 hs. Se presenta la barra de error en cada uno de los gráficos.

Conclusiones finales.

Para nuestros ensayos utilizamos tomate cultivar comercial MoneyMaker. Las condiciones necesarias para la reproducción del ciclo de vida de la planta fueron generadas evaluando los tiempos de crecimiento, condiciones óptimas para la germinación, mantenimiento de las plantas y producción de frutos. Se observó que las semillas plantadas en frascos con medio *in vitro* crecen más rápido y con mejor eficacia que en tierra, por lo cuál plantar en frascos con medio de cultivo y luego transferir a macetas con tierra es una opción mucho más eficaz para nuestros fines y necesidades que plantar directamente en tierra. Se descubrió también que los tomates crecen y se desarrollan más rápido cuando se los planta en estación cálida primavera-verano y se les agrega solución nutritiva de Farehus al menos una vez por semana. En base a lo obtenido se elaboró una estrategia para la eficiente producción de semillas de tomate.

Se cumplió con el objetivo de generar la construcción génica *PRK2-Cmyc-His6-PROK2*, la cual fue posteriormente utilizada para la transformación de tomate. De manera de cumplir con la actividad se empleó otra construcción la cual se componía por el cDNA completo de StPrk2 en el vector de expresión de levaduras pPICZAalfa. Dicha construcción poseía los epítopes 6xhis y cMyc y era importante incluirlos dadas las ventajas que estos otorgan en la detección (mediante western blot) de la proteína en cuestión. Se transformaron exitosamente bacterias *E.coli* XL1-Blue con la construcción y se seleccionaron dos colonias transformantes para secuenciación. Al analizar las secuencias de las colonias transformadas concluimos que no poseía ningún error en su composición y que se respeta el marco de lectura abierto.

Previo a la transformaciones de tomate, se llevó a cabo la transformación de *A. tumefaciens*, la cual media el proceso anteriormente nombrado. Para este fin se hizo uso de dos cepas diferentes de *A.tumefaciens*, C58C1 y LBA4404 y se aplicaron protocolos diferentes de transformación, reportados de alta efectividad con las dos cepas utilizadas. Se aplicó protocolo de transformación química por CaCl₂ para C58C1 y electroporación para LBA 4404, obteniéndose un gran número de transformantes para ambos eventos. Mediante ensayos de PCR y secuenciación se confirmó el éxito en las transformaciones de *A.tumefaciens*.

Se llevó a cabo la transformación de tomate MoneyMaker con la construcción *PRK2-his-myc-PROK2* utilizando las dos cepas de *A.tumefaciens* con protocolo que ha probado ser efectivo cuando se aplicó a cultivares comerciales de tomate. Los explantos usados para tal fin fueron los hipocótilos y cotiledones, obteniéndose mejores resultados con los primeros ya que mostraron mayor capacidad de regeneración y menor contaminación. Se obtuvieron dos plantas resistentes a kanamicina, de las cuales una de ellas, mediante procedimiento de PCR de tiempo final, confirmó la presencia del cassette modulador *35S-PRK2-his-myc*. La planta transformante fue micropropagada y analizada en frascos *in vitro* junto con MoneyMaker y el control de transformación, en búsqueda de diferencias fenotípicas como características en el desarrollo, diferenciación, velocidades de crecimiento y forma del entrenudo. Se observó en primera instancia que, en líneas generales, la planta transformante y el control de transformación poseían un aspecto muy similar a MoneyMaker, volviéndolas indistinguibles entre si. La planta transformante fue transferida de medio *in vitro* a macetas con tierra, continuando hasta ahora con el análisis fenotípico.

Se realizaron extracciones de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas de plantas de tomate transformante y MoneyMaker con el fin de analizar y comparar los patrones de expresión proteica y la posible detección del receptor de papa PRK2-his-myc. Se realizaron procedimientos de electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE, y se tiñieron con métodos de Coomassie

y nitrato de plata. Se obtuvieron bandas mas claras con la tinción de nitrato de plata y se observó, como era esperable grandes diferencias en las fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas, con una concentración mucho mayor en las primeras. Sin embargo, no se observaron diferencias notables al comparar las mismas fracciones entre el tomate transformante y MoneyMaker. En torno a los 70kD, en el carril correspondiente a la fracción hidrofóbica de tomate transformante se observaron bandas que podrían corresponderse en tamaño molecular con PRK2 aunque no pudimos corroborarlo. Similares bandas también se observaron en el tomate MoneyMaker, lo cual muy posiblemente se deba a la existencia en tomate de proteínas hidrofóbicas de similar peso molecular que PRK2.

El análisis de proteínas se continuó con la realización de un ensayo de *Western blot* con el objetivo de detectar la presencia del receptor PRK2 en las muestras de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas de tomate. Se realizó el procedimiento empleando un kit de quimioluminiscencia. Se corrieron muestras proteicas de tomate transformado y MoneyMaker y como control positivo se utilizó una muestra de extracción proteica que contenía dominio kinasa de PRK3 expresada en levaduras. Se observó una banda con peso molecular similar a PRK2 en el carril correspondiente a las proteínas hidrofóbicas de tomate transformante, sugiriendo la expresión de dicho receptor. En el carril de proteínas hidrofílicas de tomate transformante no se observó banda alguna, mientras que en ambas muestras de MoneyMaker tampoco se observó ninguna banda. El control positivo generó dos bandas, las cuales no se corresponden con el peso molecular de PRK3 kinasa pero es probable que las proteínas en levaduras están sometidas a procesos de modificación post-traduccionales. En nuestro laboratorio conocemos de este efecto al expresar proteínas vegetales en distintos microorganismos. Según nuestros resultados, concluimos que el procedimiento de western fue exitoso ya que se captaron bandas en los carriles esperados (muestra hidrofóbica de tomate transformante y control positivo) y la banda obtenida perteneciente a tomate se corresponde aproximadamente con el tamaño de PRK2 indicando la presencia del receptor de papa en las muestras proteicas de tomate.

Se realizó con éxito la puesta a punto de infecciones fúngicas en tomate. El objetivo de las mismas radicó en reproducir las condiciones óptimas de infección de tomate con las especies de hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Se ensayaron 3 concentraciones diferentes para ambas especies de hongos: 5.10×10^4 , 1.10×10^5 y 5.10×10^5 . Se concluyó que la concentración óptima para analizar los síntomas de infección en hojas de tomate es de 1.10×10^5 . Esta concentración sería la aplicada para experimentos posteriores.

Se llevaron a cabo análisis *in silico* de receptores CRKs de tomate. Se realizaron búsquedas de nuevos CRKs en bases de datos conocidas las cuales sabemos contienen un gran número de genes anotados de tomate y otras especies vegetales. Para la ejecución de las búsquedas se utilizó la secuencia del receptor StPRK2 de papa como templatado debido a que investigaciones anteriores encontraron algunos receptores de alta homología con el mismo en tomate. Cada uno de los receptores fue analizado en detalle con programas informáticos, generando información relativa a gen, promotores, ARN, proteínas, relaciones genéticas y posible función biológica. Se comenzó con la búsqueda de CRKs por homología de secuencias proteicas y pertenencia a la familia PFAM01657. Se realizaron alineamientos de secuencias y se probó que los receptores pertenecientes al grupo de los CRKs de tomate son 16 y no 18 como se pensaba inicialmente. Se observó que varían en aspectos como el tamaño molecular (de 45 a 96kD), características directamente relacionadas con el peso molecular como la cantidad de módulos DUF26 (1 o 2) y cisteínas vinculadas al plegamiento (2 a 5) y otros aspectos como el punto isoelectrico (de un $pI=5,29$ a $pI=9$), demostrando la existencia tanto de diferencias como similitudes en la composición aminoacídica y carga de los CRKs. Por otra parte, se observó que todos los CRKs poseen 3 dominios básicos:

dominio externo con módulos DUF26, dominio transmembrana reconocible y dominio quinasa intracelular. Pudo comprobarse que todos se ubican en la membrana plasmática de las células vegetales, aunque 4 de ellos no mostraron péptido señal, lo cual resulta interesante y nos hace plantear la pregunta de si existe algún mecanismo celular que permita transportar y ubicar a una proteína en un lugar específico sin la necesidad de utilización de un péptido señal. El programa AgriGo demostró que se trata de quinasas activas, lo que se esperaba.

El análisis a nivel de ADN mostró datos nuevos muy interesantes. Primeramente la ubicación cromosómica: los 16 genes se ubican en solo 5 cromosomas, de los cuales 7 se encuentran en el cromosoma 2. Es altamente probable que varios de los genes que se encuentran en el mismo cromosoma hayan surgido por duplicación génica. Luego se analizó la presencia de repetidos en tándem en los locus de cada gen *CRK*: se observó que 14 de 16 genes de *CRKs* presentan repetidos, algunos incluso en 5 o 6 repeticiones lo cual es llamativo. Lo hallado aquí puede ser un indicativo de la importancia funcional de varios de estos genes. Otro dato a considerar es que se halló solo un transcripto para cada gen; si bien este dato no es indicativo de la existencia de splicing alternativo para los *CRKs*, tampoco la refuta. Seguiremos estudiando para aprender más sobre formas alternativas para cada *CRK*.

Posteriormente se estudió la composición de secuencias promotoras. Se encontró que poseen elementos o motivos de respuesta a 4 de las principales hormonas vegetales relacionadas con la defensa vegetal: ABRE (ácido absísico) CGTGA (jasmonatos) ERE (etileno) y TCA (ácido salicílico). Se hallaron elementos WUN, BOX-W1, STRE y MYB los cuales son elementos asociados con la respuesta celular frente a heridas, elicitors fúngicos, estrés por temperatura y humedad y respuestas frente a sequía respectivamente. Estos hallazgos, sugieren el vínculo de los *CRKs* de tomate con mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos de diferente naturaleza así como la posibilidad de que algunos de los *CRKs* se relacionen estrechamente con respuestas frente a estrés abiótico, lo que se ha reportado en algunos *CRKs* de especies diferentes. Sumado a lo anteriormente expuesto, es también posible que algunos *CRKs* desempeñen funciones vitales en el desarrollo, fisiología y ciclo de vida de las plantas de tomate. Los resultados obtenidos aquí sugieren una complejidad funcional considerable y hasta ahora desconocida en estos receptores.

Se realizaron ensayos de qPCR con el fin de analizar y comparar los niveles de expresión génica de *CRKs* de tomate. Según las pruebas de eficiencia de primers, solo 5 de ellos podían utilizarse para estudiar la expresión génica. Según lo obtenido, los resultados de qPCR respaldan la hipótesis de que algunos *CRKs* de tomate podrían estar implicados en mecanismos de defensa frente a patógenos, ya que observamos una clara sobreexpresión de 2 genes (de 4 analizados) en muestras de tomates infectados con *Botrytis c.* En este trabajo, únicamente se analizó la expresión frente a una especie de patógeno y en una sola condición de infección, lo cual puede servir como plataforma para la realización de futuros ensayos de análisis de expresión frente a infecciones con patógenos de diferente naturaleza, como por ejemplo *Pseudomonas syringe*, también un importante patógeno de tomate. Será necesario rediseñar los primers para analizar la expresión de los restantes *CRKs* de tomate.

En el presente trabajo, se abordó la temática de los *CRKs* de tomate con el fin de contribuir con el conocimiento de estos importantes receptores celulares desde la óptica de las interacciones entre plantas y patógenos. Estos receptores en tomate no se habían abordado con profundidad, lo que constituyó una motivación para la realización de la investigación. Según lo obtenido, no solamente encontramos indicios que sugieren la participación de los *CRKs* en la defensa de tomate frente a patógenos, sino que además podrían desempeñar roles de elevada importancia en la respuesta de la planta frente a diferentes tipos de estrés abiótico e incluso en el desarrollo y ciclo

vital. Podremos emplear esta investigación como punto de partida para seguir analizando esta familia de receptores en tomate, falta mucho para alcanzar un conocimiento tangible de ellos.

Materiales y Métodos

Especies vegetales utilizadas.

Se usaron ejemplares axénicos de *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker, micropropagados *in vitro* en medio de cultivo MS2% (20g/L sacarosa, 0,5g/L MES, 4,3 g/L MS sales, pH5,7), a 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz, con un flujo de fotones de 100 μ mol.m⁻².s⁻¹. Las semillas empleadas para el crecimiento de las plantas *in vitro* fueron extraídas de tomates cultivados en invernadero, procediendo de la siguiente manera: Los tomates una vez maduros, con un color y aroma característicos, fueron retirados de las plantas y seccionados de manera de separar sus semillas. Las mismas fueron colocadas en bandejas plásticas con papel permitiendo escurrir el líquido y pulpa asociados para posteriormente ser transferidas a tubos falcon con 8% de ácido clorhídrico. Se dejaron agitando por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se enjuagaron con abundante agua del grifo utilizando una rejilla plástica. Se colocaron en otros tubos falcon conteniendo agua y se dejaron agitando nuevamente. Se volvieron a enjuagar y se transfirieron a placas de petri para secarse a temperatura ambiente durante al menos 3 días.

Especies y cepas bacterianas utilizadas.

La cepa bacteriana utilizada fué la XL Blue (*Escherichia coli*), que posee un genotipo cromosomal *recA1* (carece de recombinasa A funcional) y es comúnmente empleada en estudios genéticos y biotecnológicos (Sambrook y Russell 2001). Se contaba con numerosos stocks de células competentes de XL Blue a -80c. Respecto a *Agrobacterium tumefaciens* se utilizaron las cepas C58C1 (Ashby el al., 1988) y LBA 4404 (Deschamps et al., 2016), ambas altamente efectivas para la transformación genética de numerosas especies vegetales, algunas de ellas comerciales.

Vectores.

Para la realización de la construcción PRK2-PROK2 se utilizó a pPICZAalfa (<https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/ppicz%25CE%25B1c-p-63745.html>) como vector intermediario en el que se realizó parte de la construcción del cassette de expresión del receptor PRK2 el cuál fue posteriormente clonado al vector binario de PROK2 (http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html).

Gliceroles.

Respecto a la *E.coli* XL1 Blue, los gliceroles fueron realizados según lo siguiente: Se generaron cultivos líquidos en medios LB (o LB con kanamicina, según el caso), y se dejaron incubando de 16 a 18 horas a 37o C. Se agregó 0,6 ml de cultivo y 0,4 ml de glicerol estéril en un tubo *cryovial*, se mezcló utilizando un vortexeador e inmediatamente se guardó en el freezer -80oC (Sambrook y Russell 2001). Para los gliceroles de *A. tumefasciens* cepas C58C1 y LBA 4404, se procedió de manera similar que en XL1 Blue pero con diferencias en la temperatura (28oC) y antibióticos (se añade el claforán).

Extracción de ADN plasmídico de *E.coli*.

Para las extracciones de ADN plasmídico de XL1 Blue, se utilizaron los reactivos de GenCatchR Plasmid DNA Miniprep Kit (Epoch Biosciences, USA) y se procedió según el protocolo que se describe a continuación. Se realizaron precultivos con 5ml de medio LB con colonias aisladas frescas de placas, usando la kanamicina a una concentración de 100 µg/mL como selección y se incubó a 37o C toda la noche. Para la extracción del ADN plasmídico, dichos precultivos se centrifugaron por 2 minutos de manera de “pelletear” las células. Luego se resuspendieron las células en 200µl de solución MX1 y se agregaron 250 µl de Buffer MX2 invirtiendo el tubo unas 6 veces. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 350 µl de buffer MX3 invirtiendo el tubo unas 5 veces. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue introducido inmediatamente en una columna GenCatchR que había sido anteriormente colocada sobre un tubo de colección. Se centrifugó a 5000 rpm por 1 minuto y se descartó el *flow-trough*. Se agregó 500µl de buffer WN, se centrifugó la columna 1 minuto a 9000 rpm y se eliminó el *flow trough*. Se colocó 700µl de buffer WS y nuevamente se centrifugó a 9000 rpm pero por 30 segundos. Se desechó el *flow-trough*. Se centrifugó a 13000 por 2 minutos con el objetivo de eliminar el etanol residual (ya que el mismo es capaz de interferir negativamente con posteriores ensayos a los que pueda someterse el ADN plasmídico). Por último se colocó la columna en tubo Eppendorf nuevo, se agregó 30 ul de buffer de elución y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos. Se almacenó la muestra a -20oC.

Extracción de ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefasciens*.

Las extracciones de ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefasciens* se realizaron siguiendo un protocolo similar al de XL1 Blue, pero con la adición de algunas variaciones, utilizando los reactivos de GenCatchR Plasmid DNA Miniprep Kit (Epoch Biosciences, USA) y se procedió según como se describe a continuación. Se realizaron precultivos con 30ml de medio LB con colonias aisladas frescas de placas, usando la kanamicina a una concentración de 100 µg/ml y 250ug/ml de claforán antibióticos como selección y se incubó a 28o C toda la noche. Para la extracción del ADN

plasmídico, dichos precultivos se centrifugaron por 3 minutos. Luego se resuspendieron las células en 200µl de solución MX1 y se agregaron 250 µl de Buffer MX2 invirtiendo el tubo unas 8 veces. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 350 µl de buffer MX3 invirtiendo el tubo unas 5 veces. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue introducido inmediatamente en una columna GenCatchR. Se centrifugó a 5000 rpm por 1 minuto y se descartó el *flow-trough*. Se agregó 500µl de buffer WN, se centrifugó la columna 1 minuto a 9000 rpm y se eliminó el *flow trough*. Se colocó 700µl de buffer WS y nuevamente se centrifugó a 9000 rpm pero por 30 segundos. Se desechó el *flow-trough*. Se centrifugó a 13000 por 2 minutos con el objetivo de eliminar el etanol residual. Por último se colocó la columna en tubo Eppendorf nuevo, se agregó 30 ul de buffer de elución previamente calentado a 70oC y se dejó reposando por 10 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos, se retiró la muestra y se almacenó a -20oC.

Medición de la concentración de ADN.

La determinación de la concentración de de ADN en las muestras se llevó a cabo con el uso de un nanodrop o espectrofotómetro de microvolúmenes marca Eppendorf del laboratorio de Fisiología Vegetal.

Reacciones de PCR de tiempo final.

Se realizaron varios ensayos de PCR, con diferentes finalidades. El primero de ellos se levó a cabo con el objetivo de amplificar el fragmento correspondiente a *prk2-his-myc a* partir del ADN plasmídico perteneciente al vector pPICZAalfa. Los primers empleados en este ensayo fueron PRK2-GF1 (forward) y PRK3-PYES (reverse) cuyas secuencias son AGGATGGTTGCCGTCTACTTG y TCTGGGCGTGCGAGCGAGCAAG respectivamente. Estos primers permiten extraer toda la secuencia de *prk2* desde el codón de inicio hasta los epítopes his y myc. La master mix de la reacción se describe en la figura 25. Luego se realizaron ensayos de colony PCR para confirmar presencia de cassette modulador 35S-*prk2-his-myc-PROK2* en colonias transformantes de XL1 Blue y *Agrobacterium tumefaciens* cepas C58C1 y LBA4404. Los primers utilizados para éstas reacciones fueron 35S1 (forward) y PRK2-PW1 (reverse) cuyas secuencias son AAGTGTGCGCGAGCGAGCG y CACGAGCGAGCTGTTAGCTAG respectivamente. La máster mix de la reacción se describe en la figura 26. Por último se realizó un ensayo de PCR para confirmar transformantes de tomate, con la misma máster mix y primers utilizados para las reacciones de colony PCR anteriormente

<u>Mezcla de reacción.</u>	<u>Mezcla de reacción 2.</u>
Buffer taq con MgCl.....5ul	Buffer taq con MgCl.....2ul
dNTPs(10nm).....0,6ul	dNTPS (10nm).....0,4ul
Primer 5´(10nm).....1ul	Primer 5´(10nm).....1ul
Primer 3´(10nm).....1ul	Primer 3´(10nm).....1ul
Taq polimerasa.....1ul	Taq Polimerasa.....1ul
Muestra ADN.....1ul	Muestra ADN.....1ul
Agua PCR.....40,4ul	Agua PCR.....13,6ul
Total.....50ul	Total.....20ul

Figura 26. Mezclas de reacción (master mix) utilizadas en los ensayos de PCR.

nombrados. Los ensayos de PCR se realizaron según Sambrook y Russell (2001), utilizando un termociclador R225 (Eppendorf, USA) y siguiendo el mismo programa de ciclado que se muestra en la tabla 4.

Número Ciclos	Temperatura (c)	Tiempo (minutos)
1	94	5
30	94	0,5
	55	0,5
	72	2
1	72	7

Tabla 4. Ciclado utilizado para nuestros ensayos de PCR.

Extracciones de productos de PCR.

Para el procedimiento, se utilizó el manual y reactivos de GenCatchR PCR Purification Kit (Epoch Biosciences, USA). Brevemente, se pipeteó 100uL de producto de PCR en un tubo Eppendorf estéril y se mezcló con 0,5 ml de solución PX. Se colocó una columna GenCatchTm en un tubo de colección y se vertió la mezcla en la columna. Se centrifugó a 5000rpm por 1 minuto y se descartó el *flow trough*. Se lavó la columna agregando 0,5mL de solución WN y centrifugando a 5000rpm por 1 minuto. Se lavó nuevamente la columna pero utilizando solución WS y se centrifugó a 13000 rpm eliminando el etanol remanente. La columna fue colocada en un tubo Eppendorf nuevo, se agregó 30ul de buffer de elución y se dejó reposando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cumplido el lapso se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos y se guardó la muestra a -20oC.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las electroforesis de ADN fueron realizadas según manual Current Protocols (Ausubel et al., 2003). Para los geles, se disolvió la agarosa hasta llegar a 1% en buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 µg/ml). Las muestras se mezclaron previo a su cargado en el gel, con buffer de carga diluido a la quinta parte (Buffer carga 5X: Ficoll 20% m/v; EDTA pH 8.0 50 mM; *Bromophenol blue* 0.05 m/v; *Xylenecyanol blue* 0.1% m/v). Las corridas se realizaron en cubas electroforéticas con el gel sumergido en buffer TAE 1X a un voltaje de entre 90 y 120 Volts en fuente de poder EPS-301 (AmershamR, GE HealthCareTM, England). Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con la enzima *PstI* (λ/PstI) lo que permitió estimar el tamaño de los fragmentos analizados. Además, este marcador permite estimar la concentración de la muestra ya que el ADN λ tiene 48.502 nucleótidos y se siembra 1 µg del mismo, por lo que comparando la intensidad de las bandas de las muestras con las bandas del marcador se puede estimar las concentraciones de las muestras. Luego de finalizadas las corridas,

los geles fueron visualizados y analizados en un transiluminador M100 (Biorad, USA), laboratorio de Virología Molecular, donde fueron registrados fotográficamente.

Extracción de bandas en gel de agarosa.

Para este procedimiento se hizo uso del manual y los reactivos de QiaQuick Gel Extraction Kit (QiagenTM, Germany). Se cortó el fragmento del gel de agarosa que contenía la banda de interés con un bisturí. Se pesó el fragmento en un tubo Eppendorf y se le agregó 3 volúmenes de buffer QG a 1 volumen de gel. Se incubó a 50°C por 10 minutos de manera de disolver el gel en el buffer. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló por vortexeador hasta disolver. Se colocó una columna QiaQuickTM en un tubo de colección, se agregó la muestra en la columna y se centrifugó la misma 1 minuto a 13000rpm descartando posteriormente el *flow trough*. Se agregó 0,75mL de buffer PE a la columna y se centrifugó 1min a 13000rpm. Se centrifugó nuevamente por 1min a 13000rpm para eliminar el etanol residual. Se colocó la columna en Eppendorf estéril y se agregó 30ul de buffer E. La muestra fue dejada en reposo durante 1 minuto, se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y se guardó a -20°C para posterior uso.

Ligación de secuencias de ADN para la construcción.

Para el proceso, se siguió el manual de ligación de Molecular Cloning (Sambrook y Russell 2001) y se hizo uso de la ligasa T4 (Promega USA TM). Se estimaron las concentraciones de las muestras digeridas por medio de visualización en gel de agarosa, comparando las bandas correspondientes a estas con las bandas presentes en el marcador de peso molecular (cuyas concentraciones son conocidas). Las concentraciones fueron valoradas aproximadamente en: 18ng/uL para *Stprk2* y 180ng/uL para *PROK2*. Teniendo en cuenta las concentraciones se agregaron 2μL de digestión *PROK2*, 15μL de digestión *Stprk2* (relación volumen/volumen *Stprk2*/*PROK2* fue de 7.5 a 1), 1uL de ligasa T4 y 2uL de buffer de ligación (Promega USA TM) dando lugar a un volumen total de reacción de 20ul. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas y posteriormente se inactivó a 70°C por 10 minutos. La muestra de ligación se guardó a -20°C.

Transformación genética de bacterias.

Para la transformación de *Escherichia coli* XL1 Blue se siguió el manual de Molecular Cloning (Sambrook y Russell 2001). Se plaquearon bacterias de la cepa XL1 BLUE en placas de LB y se las dejó incubando overnight a 37°C. Se seleccionó 1 colonia y con un ansa estéril, se colocó en un tubo Eppendorff con 100 μl de CaCl₂ 1M y se dejó reposando en hielo por una hora. Luego se agregó 4μl de muestra de ligación *Stprk2-PROK2* y se dejó reposando en hielo por una hora. Pasado el lapso se realizó un shock de calor a 37°C por 3 minutos en el termoblock e inmediatamente se le agregó 400 ul de medio LB para dejar incubando a 37°C con agitación. Por último, las muestras fueron subcultivadas en placas con medio selectivo y se crecieron overnight.

Transformación genética de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para a la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1 se procedió de la siguiente manera. Se plaquearon colonias en placas de LB con 100ug/ml de estreptomina (st) y 20ug/ml de rifampicina (rif) y se las dejó incubando overnight a 28oC. Se seleccionó 1 colonia y con un ansa estéril, se colocó en un tubo Eppendorff con 100 µl de CaCl₂ 1M y se dejó incubando en hielo por una hora. Luego se agregó 5µl de muestra de ligación *Stprk2-PROK2* y se dejó reposando en hielo por una hora. Pasado el lapso se realizó un shock de calor a 42oC por 3 minutos en el termoblock e inmediatamente se le agregó 400 ul de medio LB para dejar incubando a 28oC con agitación. Por último, las muestras fueron subcultivadas en placas con medio selectivo con los antibióticos km, rif y st y se crecieron overnight.

Respecto a la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404, se empleó un protocolo de electroporación que se describe a continuación. Primeramente, se generaron las células competentes que luego serían transformadas mediante electroporación. Para ello se cultivo una colonia de LBA 4404 en 5ml de medio YEP líquido (10g/l extracto de levadura, 10g/l peptona y 5g/l cloruro de sodio, ph=7) con 20ug/ml de rifampicina en agitación overnight. Luego se pasaron 2,5ml del cultivo líquido a 250ml de medio LB y dejando crecer hasta alcanzar una OD600 de 0,8 y se centrifugó a 4000g durante 5 minutos y 4oC eliminando luego el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 50ml agua estéril fría, se colocaron en un tubo falcon y se repitió el ciclo de centrifugación-resuspensión en 50ml de agua estéril fría 3 veces más. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1,25ml de 10% glicerol y se distribuyó en alícuotas de 50ul por tubo eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y guardaron a -80oC. Para la transformación mediante electroporación, un tubo con 50ul de células competentes se incubó en hielo por 5 minutos y, una vez que se descongeló se agregó 2,5ul de miniprep de *PR2-PROK2* y se mezcló. Se transfirió la mezcla a una celda de electroporación enfriada, se colocó la celda en un electroporador GenePulser (BioRad) y se procedió según manual de manufacturador. Los parámetros de electroporación utilizados fueron (para celda de 1mm): capacitancia=25uF, resistencia=200 ohmios y voltaje=2,4kV. Inmediatamente luego del pulso eléctrico se agregó 1ml de medio YEP, la suspensión bacteriana fue transferida a un nuevo tubo eppendorf y se incubó a 28oC con agitación durante 4 horas. Pasado el lapso el cultivo se plaqueó en medio LB conteniendo kanamicina y se dejó cultivando a 28oC por tres días, con las placas dadas vuelta.

Transformación genética de plantas de tomate.

A continuación se resume el protocolo de transformación que utilizamos, el cual consiste en una adaptación del protocolo descrito por Sharma y colaboradores (Sharma et. al., 2009).

Los cotiledones e hipocótilos de plantas de 10 días de edad se utilizaron como explantes de transformación. Para generar dichos explantes, semillas de *Solanum lycopersicum* cultivar MoneyMaker fueron tratadas con 5% de detergente durante 15 min en agitación vigorosa, seguido de lavado con agua corriente en rejillas de plástico por 10 minutos. Las semillas fueron luego esterilizadas superficialmente con 4% hipoclorito de sodio durante 12 min con agitación intermitente, seguido de 4–6 lavados con agua estéril. Las semillas fueron secadas con papel esterilizado y sembradas en frascos de vidrio (base de 10 centímetros) con medio de germinación (2,15gs medio basal MS, 0,56gs vitaminas Gamborg B5, 15gs sacarosa, 8gs de agar) a 28oC, ciclo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y 40W de potencia lumínica. Después de 10 días de crecimiento,

se extrajeron los cotiledones e hipocótilos de las plántulas. Los cotiledones se cortaron en la punta y la base, quedando segmentos de aproximadamente 0,7 cm × 1,0 cm de tamaño y se colocaron en placas con medio de precultivo (4,3gs medio basal MS, 1,12gs vitaminas Gamborg B5, 15gs de sacarosa, 8gs agar y 2mg/ml de BAP) durante 48 horas a 28 ° C con la superficie adaxial en contacto con el medio. Paralelamente se realizaron cultivos líquidos con *Agrobacterium tumefaciens* cepas C58C1 y LBA4404 conteniendo el vector de transformación prk2-PROK2. Las mismas fueron crecidas en LB con agitación durante 72hs 28 ° C y 200 rpm. Las células se centrifugaron a 5000 rpm y se lavaron con medio líquido de lavado (4,3gs medio basal MS, 1,12gs vitaminas Gamborg B5, 15gs de sacarosa). El pellet se resuspendió en 10 ml de medio de lavado y la densidad celular bacteriana se midió usando un espectrofotómetro (ThermoScientific). Se ajustó la concentración final de trabajo a un valor de 1 OD600 (equivalente a 1x10exp8 células por mililitro) diluyéndola con medio de lavado. Explantes sanos que respondieron al precultivo, se incubaron en la suspensión bacteriana durante 30 min e invirtiendo el tubo cada 10 min durante el proceso. Los explantes se secaron sobre papel de seda estéril y cocultivado con *Agrobacterium* en el mismo medio de precultivo durante 48-72 h a 28 ° C con 50–80 explantes en cada placa de Petri de 9cm. Después de la etapa de cocultivo, los explantes se lavaron 4–5 veces con medio de lavado, se secaron sobre papel estéril y se transfirieron a medio de selección (4,3gs medio basal MS, 1,12gs vitaminas Gamborg B5, 15gs de sacarosa, 8gs agar ,1 mg /l de trans-zeatina, 100mg/l kanamicina y 500mg/l de claforán). Para esta etapa, cada placa de Petri (9 cm) contaba con 20–25 explantes y se cultivaron bajo una luz de 16hs luz/ 8hs oscuridad a 28 ° C. Explantes que mostraron regeneración o desarrollo de callos se subcultivaron en nuevas placas de medio selectivo cada 15 días. Los brotes regenerados cuando alcanzaron 4cm de altura aproximadamente fueron extirpados desde el callo y transferidos a medio de enraizamiento (4,3gs medio basal MS, 1,12gs vitaminas Gamborg B5, 15gs de sacarosa, 8gs agar, 100mg/l kanamicina y 500mg/l de claforán) y medio de germinación con selección (2,15gs medio basal MS, 0,56gs vitaminas Gamborg B5, 15gs sacarosa, 8gs de agar). Brotes que no produjeron raíces después de tres semanas de su transferencia al medio de enraizamiento fueron descartados. Esas plántulas que lograron un buen desarrollo de brotes (~ 8 cm de altura) fueron micropropagadas de manera de aumentar el número de individuos de cada línea.

Extracción de ADN de tomate.

Para la realización de la actividad se utilizaron los reactivos y el protocolo de DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen), cuyos pasos se resumen a continuación. Se pesaron 100mg de tejido foliar de tomate e inmediatamente se procedió a su molienda con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. Se agregaron 400ul de buffer AP1 y 4ul de RNAsa A (100ug/ml) al tejido lisado y se mezcló inmediatamente por vortex. Se incubó la mezcla a 65oC durante 10 minutos, invirtiendo el tubo tres veces durante el lapso indicado. Se agregaron 130ul de solución P3 y la muestra fue incubada en hielo por 5 minutos. Se centrifugó la muestra 5 minutos a 20,000 x g y se pipeteó el lisado a una columna QIAshredder Mini spin ya colocada en tubo de colección de 2ml. Se centrifugó la muestra en columna 2 min a 20,000 x g. Se recuperó el flow trough y el mismo fue transferido a un tubo esteril. Se agregaron 1,5ml de buffer AW1 y se mezcló rápidamente. La muestra fue transferida a una columna DNAeasy Mini Spin y se centrifugó a 1 minuto a ≥6000 x g. En esta oportunidad se eliminó el flow trough. Se agregaron 500ul de buffer AW2 en la columna y

se centrifugó por 1 minuto a $\geq 6000 \times g$. Se eliminó el flow through. Se agregaron nuevamente 500ul de buffer AW2 y se centrifugó a $20,000 \times g$ por dos minutos. La columna fue luego transferida a un tubo de 1.5ml y se pipeteó 100 μ l Buffer AE directamente en la membrana. se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto at $\geq 6000 \times g$ para eluir ADN genómico.

Secuenciación de ADN.

Para las secuenciaciones de ADN se contrataron los servicios de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Institut Pasteur de Montevideo. La concentración aproximada de ADN plasmídico fue de 100 ng/ μ L en un volumen total de 7 μ l, mientras que la cantidad de cebador utilizada fue de 5 picomoles aproximadamente. Se utilizaron los cebadores forward 35S1 y reverse PICalfa, cuyas secuencias se presentan a continuación. Los cromatogramas generados a partir de las secuenciaciones fueron analizados con programas informáticos como Bioedit y MEGAX.

Mantenimiento de hongos y realización de ensayos de infección en tomate.

Se seleccionó al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* para la realización de ensayos de infección en plantas de tomate. Estos hongos fueron mantenidos en placas de medio Potato Dextrose Agar o PDA (polvo de papa deshidratada 4g/l, dextrosa 20g/l y agar 15g/l) y subcultivados a nuevas placas cada 3 semanas. Respecto a la extracción de esporas, las placas candidatas fueron observadas con una lupa procurando visualizar esporas sobre el micelio. Una vez seleccionadas las placas, al lado de un mechero se agregó 5ml aproximadamente de agua miliQ estéril sobre el micelio y se rastrilló con herramienta de vidrio hasta generar una suspensión turbia la cuál luego se transfirió a un tubo falcon, se colocaron 200ul de la suspensión a una cámara de Neubauber, se observaron al microscopio óptico y se procedió a realizar el conteo de esporas. A partir del resultado anterior, se ajustó la concentración de esporas con el agregado de agua estéril. Para los ensayos de infección, se seleccionaron plantas de tomate cv MoneyMaker crecidas *in vitro* en frascos con medio MS al 2% y se utilizaron hojas comprendidas entre la posición 3-5 contando desde el ápice, a las cuales se les realizó una pequeña abertura sobre la cara adaxial con tip estéril. En dichas aberturas se colocaron 5-10ul de la suspensión de esporas cuidando que la misma no se deslice y caiga al medio. Se dejaron en las condiciones anteriormente nombradas (véase "Especies Vegetales Utilizadas") y extrajeron muestras en tiempos 0hs, 24hs, 48hs y 72hs.

Extracción de ARN de tomate.

Se utilizaron los reactivos y el protocolo de RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Alemania), cuyos pasos se resumen a continuación. Se pesaron 100mg de tejido foliar de tomate e inmediatamente

se procedió a su molienda con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. Se agregaron 450 µl de Buffer RLT al tejido molido (aún congelado), se vortexeó por unos segundos e incubó la muestra 1 minuto a 56°C. Se transfirió el lisado a una columna de centrifugación QIAshredder colocada en un tubo de colección y se centrifugó por dos minutos a máxima velocidad. El sobrenadante fue extraído y transferido a un nuevo tubo eppendorf. Se agregaron 0,5 volúmenes de etanol (96–100%) a la muestra, se mezcló inmediatamente y transfirió a una columna RNeasy en un tubo de recolección. La muestra fue centrifugada durante 15 s a $\geq 8000 \times g$ y se descartó el flow through. Se agregaron 700 µl de buffer RW1 a la columna RNeasy y se centrifugó durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ de manera de lavar la membrana de la columna y el flow trough fue desechado. Fueron agregados 500 µl de Buffer RPE a la columna y se centrifugó durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ desechando luego el flow trough. Se agregaron 500 µl de Buffer RPE a la misma columna de y se centrifugó durante 2 minutos a $\geq 8000 \times g$ como nuevo lavado de la columna. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 min. El objetivo de ésta centrifugación fue eliminar todo residuo de etanol. La columna fue colocada en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, se le añadió 30 µl de agua libre de RNasa directamente y se centrifugó durante 1 minuto a $\geq 8000 \times g$ para eluir el ARN. La muestra eluída se conservó a -20°C hasta nuevo uso.

Retrotranscripción.

Se procedió según protocolo de Quantitect Reverse Transcription (Qiagen) el cual se resume a continuación. Se descongeló el ARN extraído en hielo. Paralelamente se descongeló buffer gDNA Wipeout, transcriptasa reversa Quantiscript, buffer Quantiscript RT, RT Primer Mix y agua libre de RNasa a temperatura ambiente (15-25 ° C) y se mezcló cada solución moviendo suavemente los tubos. Se centrifugó brevemente para recoger el líquido residual de los lados de los tubos, y luego se almacenaron en hielo. Se Prepararon las reacciones de eliminación del ADN genómico en hielo, se mezclaron y almacenaron en hielo. Se Incubaron las muestras durante 2 minutos a 42 ° C. Luego se colocaron inmediatamente sobre hielo. Se Preparó la master mix de transcripción inversa en hielo. Se mezcló y almacenó en hielo. Luego se agregó la muestra de ARN del a cada tubo conteniendo master mix de transcripción inversa. Se mezclaron nuevamente, se incubaron en hielo y luego se calentaron durante 15 minutos a 42 ° C. Superado el lapso se incubó durante 3 minutos a 95 ° C para inactivar la transcriptasa inversa. Ya finalizado el proceso de transcripción reversa, las muestras fueron guardadas a -20 para luego ser empleadas en procedimiento de PCR en tiempo real.

Preparación de muestras proteicas de plantas.

Se molieron 250mg de tejido foliar en nitrógeno líquido hasta generar un polvo fino. Las muestras permanecieron congeladas hasta el siguiente paso. Se transfirieron las muestras a viales de 2ml previamente enfriado a -20 C. Se agregaron 1,5ml de la solución de metanol a cada muestra, se vortexeó por 30 segundos y se incubó a -20 C por 5 minutos. Se vortexeó periódicamente manteniendo las muestras a -20 C. Se centrifugó a 16000g a 4 C por 5 minutos y se

quitó el sobrenadante de manera cuidadosa, conservando únicamente el pellet. Se repetieron los pasos 3-5 dos veces más y una vez finalizadas las repeticiones se golpeó el borde del tubo contra una superficie dura para eliminar la solución de metanol. Se agregó 1,5ml de acetona previamente enfriada a -20 C y se vortexeó 15-30 seg, incubando la mezcla a -20 C por 5 minutos. Se centrifugó a 16000g a 4 C por 5 minutos y el sobrenadante fue eliminado cuidadosamente. Se dejó secando a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se repitió el paso con acetona. Se estimó el peso de la muestra, comparando con el peso del vial vacío. Se agregaron 6ul de Working Solution tipo 1 por cada mg de muestra a temperatura ambiente. Se disolvió pellet por vortex, incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó a 16000g por 5 minutos. Se removió el sobrenadante, correspondiente con la fracción de proteína hidrofílica y cuidando de no afectar el pellet. Se realizaron repeticiones de los pasos 12-14 usando 1,5ml de Working Solution tipo 1 e incubaciones por 5 minutos. El sobrenadante fue desechado. Se agregaron 4ul de Working Solution tipo 4 por cada mg de muestra, se disolvió pellet con vortex incubando luego a temperatura ambiente por 15 minutos. Se vortexeó con frecuencia. Por último se centrifugó a 16000g por 30 minutos y se removió el sobrenadante (fracción de proteínas hidrofóbicas), colocándolo en un tubo nuevo. Las fracciones de proteínas solubles e insolubles fueron almacenadas a -20°C.

Medición de las concentraciones proteicas.

Se estimaron las concentraciones de las muestras proteicas según protocolo de Bradford (Ausubel et al., 2003). Brevemente, se agito el reactivo de Bradford (SigmaR), procurando su homogenización. Se prepararon los estándares proteicos de BSA (proteína de concentración conocida que se usó para estimar la concentración de la mezcla proteica cuya concentración es desconocida) agregando solución con BSA 2mg/mL y agua en diferentes tubos Eppendorf hasta llegar a 0,05mL en forma de dilución seriada. Se agregaron 0,05mL de extracto conteniendo proteínas solubles en otros tubos. Tanto a los tubos con BSA como a los que contenían muestras proteicas, se les agregó 1,5mL de reactivo de Bradford y se agitaron para homogenizar. Se pasaron los contenidos de los tubos a celdas de espectrofotometría y se midió la absorbancia de muestras y estándares a 595nm. Se compararon los valores de absorbancia de las muestras de las fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas con los valores obtenidos de los estándares de BSA y se estimaron las concentraciones de dichas muestras, las cuales rondaron los 0,35-0,5 mg/ml (hidrofílicas) y 0,04-0,05mg/ml (hidrofóbicas).

Protocolo para aumentar la concentración proteica.

Se procedió según lo descrito por Wessell y Flugge (Wessell y Flugge 1984) como se describe a continuación. Se agregaron 150 µl de muestra de proteína en un tubo Eppendorf con una concentración de proteína que oscila entre 50-150ng/ul. A la muestra se le agregaron 600 µl de metanol seguido de 150 µl de cloroformo y se mezcló completamente mediante agitación por vortex. Luego se agregaron 450 µl de agua ultrapura Mq, se mezcló mediante vortex y se centrifugó a 14,000xg durante 5 minutos. Se retiró con cuidado la fase acuosa superior, procurando no distorsionar el precipitado de proteína blanca formado entre las fases superior e inferior. Se agregaron 450 µL de metanol, se mezcló nuevamente mediante agitación de vortex y se

centrifugó a 14,000 xg durante 5 min, tratando de eliminar el metanol. Se centrifugó brevemente para recoger el metanol residual en el fondo del tubo y se desechó cuidadosamente. Se dejaron los tubos abiertos en la mesada de trabajo durante aproximadamente 10 minutos para permitir que el metanol / cloroformo restante se evapore por completo. Se agregó 50ul de agua a la muestra de proteínas en el pellet y se agitó bien para disolverlo totalmente. La muestra fue almacenada a -20oC.

Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE.

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 10% para visualizar la proteína expresada (Sambrook y Russell 2001). Se procedió del siguiente modo: Gel de resolución (6 ml): 2.52 ml de H₂O miliQ, 1,5 ml de 4x lower gel buffer pH 8.8 (36.4% Tris-HCl, 0,8% SDS), 1,98 ml de acrilamida:bisacrilamida (30:8), 3 ul de temed y 45 ul de persulfato de amonio (APS) al 10%. Gel concentrador (3ml): 1,75ml de agua mQ, 0,75ml de upper gel buffer PH=6,8 (6,05% Tris-HCl, 0,4% SDS), 0,5ml de acrilamida:bisacrilamida, 1.5ul de Temed y 10ul de APS 10%. El tiempo de polimerización de gel fue de aproximadamente 1 hora.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: se tomaron 19 µl de cada una y se mezclaron con 6ul de sample buffer 4X (3.02 g Tris Base, 40 ml glicerol, 8 g SDS, 20 mL b-mercaptoetanol, 0.004g azul bromofenol, agua hasta alcanzar los 100ml) y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. En cada pocillo del gel se sembró el mismo volumen de muestra (25 µl) cada una con una concentración de 0,8-1mg/ml y 0,05-0,150, fracciones de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas respectivamente. La corrida se realizó a 200 Volts. Las proteínas se corrieron con running buffer 1X (running buffer 4X + 1% SDS). La tinción con Coomasie se realizó según protocolo de rutina (Ausubel 2003) y se empleó solución con azul de Coomasie (0.4 g Coomasie brilliant blue, 250 ml de isopropanol, 100 ml ácido acético), durante 25 minutos con agitación. Para la destinción, se utilizó buffer de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético) durante dos horas. La tinción con nitrato de plata se realizó siguiendo protocolo de Shevchenko y colaboradores (Shevchenko et. al. 1996), como resumimos aquí: el gel fue fijado en 50% metanol y 5% ácido acético durante 20 minutos. Se lavó el gel con 50% metanol durante 10 minutos. Se incubó el gel en agua destilada a temperatura ambiente durante toda la noche y luego el mismo fue sensibilizado en 0,02% de tiosulfato de sodio por 1 minuto. Se lavó el gel 2 veces con agua destilada durante 1 minuto cada vez y se incubó en 0,1% de nitrato de plata durante 20 minutos a 4oC. Se lavó el gel en agua destilada, se transfirió a un contenedor limpio y se repitió lavado. El gel fue revelado en formalina (35% de formaldehído) al 0,04% y 2% carbonato de sodio. La tinción fue detenida alrededor de 1 hora después con 5% ácido acético, momento en el cual se alcanzó el color y la intensidad de banda deseados. El gel fue mantenido con 1% de ácido acético.
4X running buffer: 12 g/l tris base y 57,68g/l de glicina.

Protocolo de Western blot para detección de PRK2.

Este procedimiento se utilizó para detectar PRK2 en muestras de lisis (extracto crudo) y muestras de purificación proteica (mediante columnas de NiNTA). Brevemente, éste procedimiento consiste en la transferencia e inmovilización de proteínas desde un gel hasta una membrana sólida

(por ejemplo nitrocelulosa). La membrana posteriormente es incubada con anticuerpo primario (anti-epítotope histidina en nuestro caso) y luego con anticuerpo secundario conjugado a enzima (el anticuerpo secundario es capaz de reconocer y pegarse al primario). Se agrega una solución con sustrato que es procesado por la enzima y se produce una reacción que puede detectarse por diferentes maneras, en nuestro caso es una reacción quimioluminiscente que se detecta por autoradiografía. Para la realización de este procedimiento se siguió protocolo para western blot húmedo (Ausubel et al., 2003). Las muestras proteicas que fueron sometidas a este proceso se corrieron por SDS-PAGE. Se agregó en el mismo gel 5uL de marcador coloreado (Prestained Molecular Marker, Pierce™). Posteriormente, el gel a transferir se equilibró en buffer de Towbin (6, 14g/L de Tris base, 27,8g/L de glicina, 1g/L SDS y 200mL de metanol) y se prosiguió según protocolo de miniEV Electroforesis and Electrotransfer Unit (AmershamR , USA) Se cortó la membrana del mismo tamaño que el gel, se sumergió en agua mQ y luego se dejó reposar de 3 a 5 minutos en buffer Towbin. Se humedeció con buffer también el papel de filtro y las esponjas. Se ensambló el sándwich de transferencia de la siguiente manera: Sobre una tapa o bandeja se colocó el cassette de transferencia (miniEV Electroforesis and Electrotransfer Unit, AmershamR) y se agregó, sobre el cátodo (electrodo negativo), esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, dos esponjas. Se cerró el cassette por el ánodo (electrodo positivo). Se colocó el cassette en la cuba de transferencia y se agregó alrededor de 350 ml de buffer de Towbin previamente refrigerado en el cassette cerrado. Se llenó la cuba de transferencia con 1,8 litros de agua mQ refrigerada. Se seteo la unidad (AmershamR EP301) a 30V, la corriente hasta 350 mA por 2 horas y se comenzó la transferencia. Cuando se cumplió el lapso de tiempo, se detuvo la transferencia y se desensambló el cassette. La membrana se colocó en una bandeja, y se realizó tinción con colorante Ponceau S (0,1% de Ponceau S de Sigma P3504, 5% ácido acético) para visualizar el resultado de la transferencia de proteínas. Se agitó manualmente por 5 minutos y se lavó con agua destilada (Ausubel et al., 2003).

Se Colocó la membrana en una bandeja pequeña y 50ml de buffer de bloqueo (2g/L caseína; 1g/L Tween 20; 6,07g/L Tris; 8,57g/L NaCl). Se dejó agitando suavemente overnight. Se realizó la dilución del anticuerpo primario anti-histidina en buffer de bloqueo. La dilución fue de 1/1000. Se removió la membrana de la bandeja se colocó en una placa de vidrio con 5ml de dilución de anticuerpo primario. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se colocó la membrana sobre una bandeja y se lavó con 50ml de buffer de lavado (Tween 20 TBS) 15 minutos con agitación, repitiendo el proceso de 4 a 6 veces. Posteriormente se realizó la dilución del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito en buffer de bloqueo, y la misma fue 1/20000. Se colocó membrana nuevamente en placa de vidrio y se le agregó 20 ml de dilución de anticuerpo secundario dejando en agitación. Se Repitió el paso de lavado.

Se preparó *Working Solution* (la cual posee luminol, que es el sustrato de la peroxidasa) mezclando partes iguales de la solución *Luminol/enhancer* y *Stable Peroxide* (West Pico Quemiluminiscent Kit™, Pierce). Se colocó la membrana en placa de Petri y se agregó 4mL de *Working Solution*, incubando por 5 minutos. Se quitó la membrana y se la colocó sobre plástico protector, se secó brevemente pero con la precaución de que la membrana mantuviera humedad. Se cubrió la totalidad de la membrana con el protector plástico y se colocó el conjunto en un cassette para films de revelado tomando como referencia la posición de la membrana para posteriormente poder marcar posición de cada carril. Se colocó cuidadosamente una pieza de film encima de la membrana y se expuso por 30 y 60 segundos, 5, 15 y 30 minutos, 1 y 24 horas. Se reveló el film fotográfico incubándolo en solución de revelado (0,02% metilfenidona, 0,5% hidroquinona, 10% sulfito de sodio, 0,5% hidróxido de potasio, 6% tiosulfato de amonio) por 8 minutos y luego solución de fijado (15% tiosulfato de sodio, 5% sulfato de sodio) por 1 minuto.

PCR cuantitativa.

Se realizó procedimiento de PCR cuantitativa para la determinación de la expresión de los 16 CRKs de tomate. Los niveles de expresión de ARN mensajeros se determinaron mediante el método del $\Delta\Delta C_t$ (Livak Y Schmittgen 2001; Tevfik Dorak 2006). Las Master Mix se prepararon según Manual de QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN, Alemania.). Los primers y sus características se muestran en la tabla 5, y el ciclado utilizado se muestra en la tabla 6. Se realizaron 3 ensayos de PCR cuantitativa. El primero tuvo el objetivo de evaluar la capacidad de amplificación de los primers con nuestras muestras de ADNc. El segundo, se realizó para evaluar la efectividad en la amplificación de los primers, generando diluciones seriadas de la muestra de ADNc en $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ y $\frac{1}{16}$. El tercero para analizar los niveles de expresión de los CRKs de tomate.

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño amplicón
Solyc01g007960.2.1	7960	AATCTCTCGGTCGTGCTGT	220
Solyc01g007970.1.1	7970	TGAGTGCTGCTAGCTGAT	198
Solyc01g007980.2.1	7980	CGTGCTGATGCAATCGAT	195
Solyc01g007990.2.1	7990	ACTTCGATGCATCGAGTGT	205
Solyc02g067780.2.1	7780	ACGGCTGATGCTATGCATG	210
Solyc02g079990.2.1	9990	AGGAGCAGTGATCGACTAT	225
Solyc02g080010.2.1	80010	TGCGATCGATCGAATTGGT	199
Solyc02g080030.1.1	80030	AGTAGCTAGCTGATCGATG	207
Solyc02g080070.2.1	80070	AGGCTAGCGCTAGCTAGC	207
Solyc02g080080.2.1	80080	TCTGATCGACGATCGAATG	210
Solyc02g086590.2.1	6590	GCGATAGATGACGATCGAT	222
Solyc03g111540.1.1	1540	TCGATCGATGCTAGCAGCT	193
Solyc03g112730.2.1	2730	AGCTAGCATTGCTAGCTTGG	208
Solyc05g005070.2.1	5070	CGATCGATCGATCGATCATG	202
Solyc11g011870.1.1	1870	CATGCTAGCTAGCTAGCCCA	216

Tabla 5: Se muestran las primers utilizados para cada CRK, sus secuencias y el tamaño de amplicón generado por cada uno de ellos.

Número ciclos	Temperatura (c)	Tiempo (minutos)
1	94	5
	94	0,5
40	60	0,5
	72	0,5
1	72	7

Tabla 6: Ciclado utilizado para cada uno de los ensayos de PCR cuantitativa.

Referencias bibliográficas.

- Abramovitch, R. B., Anderson, J. C., and Martin, G. B. (2006). "Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 601-11.
- Acharya B, Raina S, Maqbool S, Jagadeeswaran G, Mosher S, Appel H, et al. (2007). Overexpression of CRK13, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant J*; 50: 488–499.
- Afzal, A. J., Wood, A. J., and Lightfoot, D. A. (2008). "Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense." *Mol Plant Microbe Interact*, 21(5), 507-17.
- Agrios GN. (2004). *Plant Pathology*. Ed.5. Academia Press, San Diego, CA. ISBN 0-12-044565-4.
- Aldabalde F, Dogliotti N. (2002). Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de papa. Publ. fagro.
- Alfano, J. R., and Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, 42, 385-414.
- Anderson RG, Deb d, Fedkenheuer k, McDowell J (2015). Recent Progress in RXLR Effector Research. *MPMI* Vol. 28, No. 10, 2015, pp. 1063–1072. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0022-CR>.
- Andolfo, G. (2015). Genetic variability and evolutionary diversification of membrane ABC transporters in plants. *BMC Plant Biol*. 15, 51.
- Ashby, A. M., M. D. Watson, G. J. Loake, and C. H. Shaw. (1988). Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C' toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol*. 170:41814187.
- Ausubel FM. Et al.,(2002). *Currents protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN:0-471-50338-X.
- Axtell, M. J., and Staskawicz, B. J. (2003). "Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4." *Cell*, 112(3), 369-77.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., and Dinesh-Kumar, S. P. (1997). "Signaling in plant-microbe interactions." *Science*, 276(5313), 726-33.
- Banerjee, A., Roychoudhury, A. (2017). Abscisic-acid-dependent basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plant abiotic stress. *Protoplasma*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-015-0920-4>.
- Basyuni B, Wati R, Baba S, Oku H. (2018). Characterization of cycloartenol synthase *KcCAS* promoter region from mangrove plant (*Kandelia obovata* Sheue, H. Y. Liu & J. Yong). *AIP Conf Proc*, 020040.
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P., and Briggs, S. P. (2008). "Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential." *PLoS Pathog*, 4(10), e1000192.
- Ballaré CL. (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. Elsevier. *Trends in Plant Science*. Vol 16.N 5. 1360-1385.
- Belkadir Y, Subramaniam R, Dangl JL. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current opinion in Plant Biology*. 7:391-399.
- Boller T, He SY. (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*. 2009 May 8; 324(5928): 742–744.
- Bolwell GP, Daudi A. (2009). Reactive Oxygen Species in Plant–Pathogen Interactions. *Signaling and Communication in Plants*, DOI 10.1007/978-3-642-00390.

- Bos, J. I., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R. R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S. C., Kamoun, S., and Birch, P. R. (2010). "Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21), 9909-14.
- Bourdais G, Burdiak P, Gauthier A, Nitsch L, Saloja rvi J, Rayapuram C, et al. (2015). Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genet*.11(7): e1005373.
- Brown, T. A., Jones, M. K., Powell, W., and Allaby, R. G. (2009). "The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent." *Trends Ecol Evol*, 24(2), 103-9.
- Burdiak P, Rusaczek A, Witoń D, Głó'w D, Karpiński S. (2015). Cysteine-rich receptor-like kinase CRK5 as a regulator of growth, development, and ultraviolet radiation responses in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp. Bot.* 66(11): 3325–3337.
- Cargile, B.J., Bundy, J.L., Freeman, T.W. & Stephenson, J.L. (2004). Gel based isoelectric focusing of peptides and the utility of isoelectric point in protein identification. *J. Proteome Res.* 3, 112–119.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J. G., and Staskawicz, B. J. (2010). "The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein." *Mol Plant Microbe Interact*, 23(1), 49-57.
- Chen, K., Du, L., and Chen, Z. (2003). Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 53(1-2), 61-74.
- Chen, K., Fan, B., Du, L., and Chen, Z. (2004). Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 56(2), 271-83.
- Chen Z. (2001). A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant Physiol*; 126: 473–476.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B and Staskawicz BJ. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803–814.
- Cohn J, Sessa G, Martin GB. (2001). Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* 13: 55-62.
- Conesa Ma, Muir D, Roldán C. (2017). Growth capacity in wild tomatoes and relatives correlates with original climate in arid and semi-arid species. *Envi. y Exp. Bot.* Volume 141, Pgs 181-190
- Cullis CA. (2004). *Plant genomics and proteomics*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-37314-1.
- Cymer, F., von Heijne, G. and White, S.H. (2015) Mechanisms of integral membrane protein insertion and folding. *J. Mol. Biol.* 427, 999–1022 CrossRef PubMed
- Dangl, J. L. y Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826-33.
- Dangl JL y Jones JDG. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- de Wit, P. J. (2007). "How plants recognize pathogens and defend themselves." *Cell Mol Life Sci*, 64(21), 2726-32.
- Delgado-Cerrone L, Alvarez A, Mena E, Ponce de Leon I, MontesanoM (2018) Genomewide analysis of the soybean CRK-family and transcriptional regulation by biotic stress signals triggering plant immunity. *PLoS ONE* 13(11): e0207438.
- Deschamps, S., Mudge, J., Cameron, C., Ramaraj, T., Anand, A., Fengler, K., Hayes, K., Llaca, V., Jones, T.J., and May, G. (2016). Characterization, correction and de novo assembly of an Oxford Nanopore genomic dataset from *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci. Rep.* 6: 28625.
- Desai P, Shrivastava N, Padh H. Production of heterologous protein in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv* 2010;28:427–35

- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., Kobe, B., and Ellis, J. G. (2006). "Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax re
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*, 11(8), 539-48.
- Dong J, Kharb p, Teng W, Hall T. (2001). Characterization of rice transformed via an Agrobacterium-mediated inflorescence approach. *New phyto*. Vol 25. pp 90-101.
- Edreva A. (2005). Patohgenesis related proteins: Research Progress in the last 15 years. *Gen. Apl. Plant. Physio*. 31(1-2), 105-124.
- Ellul P., García-Sogo B., Pineda B., Ríos G., Roig L.A. & Moreno V. (2003) The ploidy level of transgenic plants in Agrobacteriummediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 231–238
- España L, Heredia-Guerrero J, Segado P (2014). Biomechanical properties of the tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amounts of its components. *New Phytologist*. Vol 12. pp:12-22.
- Esquinas-Alcazar, José; Nuez Viñals, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. Nuez, Fernando, ed. *El cultivo del tomate*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 13-42. [ISBN 84-7114-549-9](#).
- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Plant Pathology*. Vol 11: 1-19.
- Flor HH (1971) Currents status of gene-for-gene. *Annu. Rev. Phytopatol*. 9: 275-296.
- Frary A y Earle ED, (1996).An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep*. 16:235-240.
- Ganguly M, Datta K, Roychoudhury A, Gayen D, Sengupta DN et al (2012) Overexpression of Rab16A gene in indica rice variety for generating enhanced salt tolerance. *Plant Signal Behav* 7:502–509
- Gao LL, Xue HW. (2012). Global analysis of expression profiles of rice receptor-like kinase genes. *Mol Plant.*; 5(1):143–53.
- Gebhardt G y Thomas R (2002). [Nutritive value of foods](#). United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service: *Home and Garden Bulletin*, n.º 72, Beltsville (Maryland): Nutrient Data Laboratory.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., and Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 60, 425-49.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P. C., Bollmann, S. R., Bos, J. I., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J. C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M. A., Fugelstad, J., Gilroy, E. M., Gnerre, S., Green, P. J., Grenville-Briggs, L. J., Griffith, J., Grunwald, N. J., Horn, K., Horner, N. R., Hu, C. H., Huitema, E., Jeong, D. H., Jones, A. M., Jones, J. D., Jones, R. W., Karlsson, E. K., Kunjeti, S. G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., Maclean, D., Chibucos, M. C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H. J., Morgan, W., Morris, P. F., Munro, C. A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzon, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D. C., Schumann, U. D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D. J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort,

- P. J., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B. C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P. R., Whisson, S. C., Judelson, H. S., and Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461(7262), 393-8.
- He P, Sheen J, Shan L. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* 9 (6): 1385-1396.
- 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.
- Heil M, Bostock RM. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann Bot (Lond)* 89: 503-512.
- Holton N, Caño-Delgado A, Harrison K, Montoya T, Chory J, Bishop GJ. (2007). Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 Is Required for Systemin-Induced Root Elongation in *Solanum pimpinellifolium* but Is Not Essential for Wound Signaling. *The Plant Cell*, Vol. 19: 1709–1717.
- Hooker, W. J. (1980). *Compendio de enfermedades de la papa*: CIP.
- Ifnan Khan, M.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Hu, J.; Liu, C.; Yang, S.; Hussain, A.; Furqan Ashraf, M.; Noman, A.; Shen, L. (2018). CaWRKY40b in Pepper Acts as a Negative Regulator in Response to *Ralstonia solanacearum* by Directly Modulating Defense Genes Including CaWRKY40. *Int. J. Mol. Sci*, 19, 1403.
- Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anshu U, Krol1 E, Elzenga2 JM, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal*. 62, 367–378.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 19(15), 4004-14.
- Kall, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.L. (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Res*, 35, W429-432.
- Kay, S., and Bonas, U. (2009). "How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant." *Curr Opin Microbiol*, 12(1), 37-43.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R. T. (2005). "Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells." *Mol Plant Microbe Interact*, 18(11), 1130-9.
- Kim, B., Hwang, I.S., Lee, H.-J. and Oh, C.-S. (2017) Combination of newly developed SNP and InDel markers for genotyping the Cf-9 locus conferring disease resistance to leaf mold disease in the tomato. *Mol. Breed.* 37, 59
- Knapp S, Peralta (2016). The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives M, Giovannoni, Bouzayen M, Zouine M, eds. *The tomato genome* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 7–21.
- Kuć J (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:7-12
- Kuć J (1995) Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:275-297
- Kuć J (1982) Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32:854-860
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 33:1870-1874.
- Leister, D. 2004, Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes, *Trends Genet.*, 20, 116–122.

- Li, H., Wang, L., and Yang, Z.M. (2015). Co-expression analysis reveals a group of genes potentially involved in regulation of plant response to iron-deficiency. *Gene* 554: 16–24.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lu K, Liang S, Wu Z, Bi C, Yu YT, Wang XF, Zhang DP. (2016). Overexpression of an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like protein kinase, CRK5, enhances abscisic acid sensitivity and confers drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 67(17): 5009–5027.
- Lu Y. Genome-wide identification and expression analysis of glycine-rich RNA-binding protein family in sweet potato wild relative *Ipomoea trifida*. *Gene*. 2019;686:177–86.
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J. (2012). Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*. Vol. 158, pp. 844–853.
- Mackey, D., Holt, B. F., 3rd, Wiig, A., and Dangl, J. L. (2002). "RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*." *Cell*, 108(6), 743-54.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* 54: 23-61.
- Mauch-Mani B, Mauch F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:409–414.
- McCormick S. et al., (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 5:81–84.
- Monaghan J, Zipfel C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol.* 15(4):349-57.
- Montesano, M., Koiv, V., Mae, A., and Palva, E. T. (2001). "Novel receptor-like protein kinases induced by *Erwinia carotovora* and short oligogalacturonides in potato." *Mol Plant Pathol*, 2(6), 339-46.
- Montesano M, Broader G, Palva T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant. Pathol.* 4 (1): 73-79.
- Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Frances J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int Microbiol* 5: 169-175.
- Mullins, E., Milbourne, D., Petti, C., Doyle-Prestwich, B. M., and Meade, C. (2006). "Potato in the age of biotechnology." *Trends Plant Sci*, 11(5), 254-60.
- Nakagawa H, Ohmiya K, Hattori T. (1996). A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J.* 9:217–27.
- Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. (2000). Oxford , Oxford Univ Press
- Oono R, Anderson C, Ford-Denison R (2011). Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic rhizobia triggers host sanctions that reduce fitness of their reproductive clonemates. *Proc. Royal soci.* Volume 278.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M. & Shiu, S. (2016). H. Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiol.* 171, 2294–2316.
- Panstruga, R., and Dodds, P. N. (2009). "Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens." *Science*, 324(5928), 748-50.
- Parniske, M. (1997). Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* 91, 821-832.
- Parniske M, Wulff BBH, Bonnema G, Thomas CM, Jones DA, Jones JDG. (1999). Homologues of the Cf-9 disease resistance gene (Hcr9s) are present at multiple loci on the short arm of tomato chromosome 1. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:93-102.

- Passricha N, Saifi S, Ansari MW, Tuteja N. (2017). Prediction and validation of cis-regulatory elements in 5' upstream regulatory regions of lectin receptor-like kinase gene family in rice. *Protoplasma*;254:669–684
- Peralta, I. E. y D. M. Spooner. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28:45-54.
- Peralta, I. E., S. Knapp y D. M. Spooner 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Rep. Tomato Genet. Coop.* 56: 6-12.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C,-Reyes AL, Van Wees CSM. (2012).Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012. 28:28.1–28.33.
- Ponce de León I, Montesano M. (2013). Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *Int. J. mol.* 4;14(2):3178-200.
- 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.
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., and Martin, G. B. (2007). "A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity." *Nature*, 448(7151), 370-4.
- Rushton, P.J. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15, 5690–5700 .
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, Vol. 8, 1809-1819.
- Sambrook J y Russel DW (2001).Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, New York.A8:52-55.
- Sazegari, S.; Niazi, A.; Ahmadi, F.S. (2015). A study on the regulatory network with promoter analysis for Arabidopsis DREB-genes. *Bioinformatics*, 11, 101.
- Shevchenko, A. Yu. et al. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.*Analytical chemistry*68 5: 850-8 .
- Shah J, Zeier J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Plant Sci.* 22; 4: 30.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Nurnberger, T., Martin, G. B., and Sheen, J. (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe*, 4(1), 17-27.
- Sharma K et al., (2009). An improved method for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato.*Journal of Biosciences* c34:121-129.
- Solovyev V, Kosarev P, Seledsov I, Vorobyev D (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol* 7 Suppl 1: S10.1–12.
- Soltis PS, Marchant DB, Van de Peer Y, Soltis DE (2015) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Genet Dev* 35: 119–125
- Speth, E. B., Lee, Y. N., and He, S. Y. (2007). "Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions." *Curr Opin Plant Biol*, 10(6), 580-6.
- Spooner DM, McLean K. (2005). A single domestication of potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 14694–14699, doi: 10.1073.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667.
- Takken FLW and Goverse A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15:1–10.
- Tang, H., Sezen, U., and Paterson, A. H. (2010). "Domestication and plant genomes." *Curr Opin Plant Biol*, 13(2), 160-6.

- Tevfik Dorak, M. E. (2006). *Real-time PCR*, New York: Taylor & Francis Group.
- Thomma B, Eggermont K, Penninckx I, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15107-15111.
- Tor M, Lotze MT, Holton N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 13, pp. 3645–3654.
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JLG. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, Vol. 141, pp. 373–378.
- Van der Biezen, E. A., and Jones, J. D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, 23(12), 454-6.
- van der Hoorn, R. A., and Kamoun, S. (2008). "From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors." *Plant Cell*, 20(8), 2009-17.
- van Hulten M, Pelsler M, van Loon LC, Pieterse MJ, Ton J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *PNAS*. Vol103. N 14.
- van Loon VL, Rep M, Pieterse CMJ. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. 44:135–62.
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, AbuQamar S, Xi Chen S, Salmeron J, Dietrich R, Hirt H, Mengiste T. (2006). The Membrane-Anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Plays Distinct Roles in Arabidopsis Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. *The Plant Cell*. Vol 18. 257-263.
- Vilaró F. (1990). Programa de mejoramiento genético de papa en Uruguay. Centro Internacional de la papa. INTA. PROCIPA. Cap 2: 19-29.
- Voinnet, O. (2001). "RNA silencing as a plant immune system against viruses." *Trends Genet*, 17(8), 449-59.
- Wang J, Wang J, Jin C, Tong Y, Wang T(2019) A R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 from grapevine (*Vitis vinifera* L.) regulates flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*
- Weller DM, Mavrodi DV, van Pelt JA, Pieterse CMJ, van Loon LC, Bakker PAHM. (2012). Induced Systemic Resistance in Arabidopsis thaliana Against Pseudomonas syringae pv. tomato by 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Pseudomonas fluorescens. *The American Phytopathologist Society*. Vol. 102, No. 4.
- Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141–143.
- White PJ, Broadley MR. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*. 92:487-513.
- Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G., and Desveaux, D. (2010). "The type III effector HopF2Pto targets Arabidopsis RIN4 protein to promote Pseudomonas syringae virulence." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), 2349-54.
- Wojtaszek. (1997). Oxidative Burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681-692.
- Wroblewski r, Tomczak R, Michelmore D. (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Proc. Plant. Sci.* Vol 12, pp 34-42.
- Wrzaczek, M., Brosche, M., Salojarvi, J., Kangasjarvi, S., Idanheimo, N., Mersmann, S., Robatzek, S., Karpinski, S., Karpinska, B., and Kangasjarvi, J. (2010). "Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in Arabidopsis." *BMC Plant Biol*, 10, 95.

- Wrzaczek M, Brosche´ M, Kangasja" rvi J. (2013). ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16(5): 575–82.
- Yu J, Ke T, Tehrim S, Sun F, Liao B, Hua W (2015) PTGBase: an integrated database to study tandem duplicated genes in plants. *Database (Oxford)* 2015: bav017.
- Zhou D, Xin Z, Yi Ling, Zhenhai Z, and Zhen S. (2010). [agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community](#) *Nucleic Acids Research Advance*. DOI 10.1093/nar/gkq310. *Nucl. Acids Res.* 38: W64-W70.