DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Estudio del comportamiento de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos de callos de *Cocos nucifera* L. expuestos a quitosano

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

Iván Alfredo Estrada Mota

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México



2008

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Estudio del comportamiento de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos de callos de Cocos nucl/are L. expuestos a quitosano

Tesis que para obtaner el grado de Doctor en Glancias presenta:

Ivén Alfredo Estrada Mota

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México

2008

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar y del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores.

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca doctoral otorgada a Iván Alfredo Estrada Mota (No. 170186) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Este trabajo fue financiado totalmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto No. 36168-B).

i

RECONDCIMIENTOS

del Centro de treaco en la Unidad de Bioquítaica y Biológia Molecular de Plantos José Juán Zuñige Aquílar y del Or Ignacia Rodrigo falas Flaras

Estor resu corresponde a los estudios realizados con una bece docroral olórgade a Iván Alfredo Estreda Alota (No. 170186) por el Consejo Nacional de Gianda () Tecnología.

cate vebajo fue financiado totalmente por al Caraejo Nacional da Ciencia y

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, por su dirección, asesoría, confianza y apoyo que me dio en la realización de esta tesis.

Al Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores por su asesoría, amistad y el gran apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, al Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, al Dr. Javier Plasencia de la Parra, a la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, a la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez, al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y al Dr. Tomás Augusto González Estrada, por sus sugerencias y revisión crítica con que enriquecieron este documento de tesis.

Al Dr. Hug Harries por su disposición, generosidad y por el tiempo dedicado a revisar el artículo de investigación.

Al Ing. José Luis Chan, por haber proporcionado los callos de cocotero empleados en este trabajo de tesis.

Al M. C. Ramón Souza Perera por su asistencia técnica.

A mis compañeros del laboratorio 26, que siendo gatitos nos veíamos al espejo y observábamos leones: Gabriel, Goretty, Eunice, Hernán, Elidé, Yumi, Manuel, Jaqueline y Juan Manuel, por su ayuda y compañerismo.

A mis compañeros del laboratorio 06: Miguel, Yeny, Fernando, Noemí, José, María Eugenia, Eduardo y Ligia, porque cuando llegué al laboratorio me hicieron sentir tan a gusto como en casa, y porque conservo de ahí amistades eternas.

A Juan, Marco, Ana Luisa, Efraín, Karen, Eliel, a mis profesores y demás compañeros del CICY por su ayuda.

No se puede terminar esta lista sin agradecer a José Juan amigo. Aunque pase el tiempo el seguirá siendo mi jefe y tutor. No puedo enumerar todo lo que aprendí de él, sería una lista copiosa. Le agradezco su amistad, su generosidad para conmigo y su asesoría. Creo que las personas buenas que el Altísimo nos pone en el camino, dejan una huella tan indeleble en el ser, que ni todo lo creado la puede borrar.

A Andras, du corazon nu allento ni tianto ni alegna. A Stivia, ni deber,

A mis padres Rosa Marta y José Luis, mi hoger mi sosiege

Al Santo Justo, Humitde, Menso, Bendito, Platoso Gracias por hacemie escalar y lieger. Me imundiste de effento cuando me scioceba.

Me damaste y lievaste cuando desvanecia.

Contenido

	Reconocimientos	i
	Agradecimientos	iii
	Dedicatoria	v
	Resumen	ix
	Abstract	xi
	Introducción	xiii
CAPÍTULO I.	Antecedentes	
	El cocotero	1
	Interacción planta-patógeno	5
	Los inductores y las respuestas de defensa	10
	Un enlace entre la percepción y la respuesta celular vegetal: La Cascada de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAP cinasas)	14
	Hipótesis y Objetivos	29
	Estrategia experimental	30
	Bibliografía	31
CAPÍTULO II.	Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies the abundance of defense-related transcripts in calli of <i>Cocos nucifera</i> L.	
	Abstract	45
	Introduction	46
	Materials and Methods	46
	Results and Discussion	50
	References	64
CAPÍTULO III.	Caracterización de las actividades de MAP cinasa en callos de Cocos nucifera L. inducidos con quitosano	,
	Introducción	71
	Materiales y Métodos	71
	Resultados y Discusión	75
	Bibliografía	79
CAPÍTULO IV.	Análisis de la expresión de MAP cinasas en callos de <i>Cocos nucifera</i> L. inducidos con quitosano	

	Introducción	81
	Materiales y Métodos	82
	Resultados y Discusión	84
	Bibliografía	86
CAPÍTULO V.	Clonación de secuencias de ADN complementario, correspondientes a ortólogos de MAP cinasas de Cocos <i>nucifera</i> L.	
	Introducción	89
	Materiales y Métodos	89
	Resultados y Discusión	98
	Bibliografía	112
CAPÍTULO VI.	Análisis de secuencias de ADN complementario, correspondientes a ortólogos de MAP cinasas de <i>Cocos nucifera</i> L.	
	Análisis de las secuencias de ADNc correspondientes a MAP cinasas de callo de cocotero de las variedades Alto del Atlántico y Enano Malayo	113
bray type bash	Análisis de las secuencias de ADNc correspondientes a los extremos 5' y 3' de MAP cinasas de hoja de cocotero variedad Alto del	
	Atlántico	117
	Conclusiones	131
CAPÍTULO VII.	Discusión general	133
CAPÍTULO VIII	Conclusiones Generales y Perspectivas.	141
	Apéndice	143
	(II, O.II). Consciousionidan da l'anna accivitation de M en contract de l'anna escrittant. Industrial	

tine de l'ontre madium L. (reladiona utomina

RESUMEN

La palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una especie tropical ecológica y económicamente importante. Esta palma es atacada por patógenos de diversa naturaleza, como son virus, viroides, hongos, protozoarios, nematodos y mollicutes. Dada su naturaleza epidémica, el Amarillamiento Letal (AL) es la enfermedad más seria que afecta a esta especie en América Central, el Caribe y África. El AL es una enfermedad devastadora restringida al floema y provocada por un fitoplasma. Aunque hay muchos estudios epidemiológicos para esta y otras enfermedades que afectan a la palma, la fisiología de la interacción cocotero-patógeno a nivel bioquímico y molecular ha sido poco estudiada y por lo tanto, es poco comprendida.

La modificación covalente de proteínas por fosforilación/desfosforilación es, probablemente, el mecanismo de transducción de señales más importante tras la percepción de estímulos extracelulares. Esta actividad la llevan a cabo Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAP cinasas), enzimas que constituyen una vía de comunicación intracelular conservada en eucariotes. La participación de la vía de las MAP cinasas después de la percepción del estrés biótico y abiótico ha sido demostrada en diversos modelos y especies vegetales de importancia económica. En el presente trabajo de investigación, se decidió evaluar si la presencia de un inductor de origen fúngico activa a las MAP cinasas de cocotero, con el objetivo de obtener una mejor comprensión de la interacción cocotero-patógeno.

Mediante un modelo de inducción de las respuestas de defensa, que consistió en el reto de callos de cocotero con el inductor de origen fúngico quitosano, se evaluó la respuesta de las MAP cinasas a nivel transcripcional y postraduccional. Mediante ensayos de cinasa en gel, inmunodetección e inmunoprecipitación, se determinó que una posible MAP cinasa de ~46 kDa se activa en respuesta a la presencia del inductor. Esta evidencia sugiere que esta cinasa podría participar en la transducción de la señal después de la percepción del inductor.

Por otra parte, utilizando ensayos de RT-PCR con cebadores degenerados diseñados a partir de regiones conservadas de MAP cinasas, se clonaron secuencias de ADNc de MAP cinasas de callo de cocotero, correspondientes a la región catalítica. Asimismo, ensayos de tipo RACE permitieron clonar secuencias de ADNc de genes de MAP cinasas de hoja de cocotero que corresponden a sus extremos 5' y 3'. Utilizando estas secuencias como sondas se determinó, mediante ensayos de expresión, que bajo las condiciones en las que se realizó el experimento, no se observaron cambios en la población de los ARN mensajeros correspondientes a MAP cinasas de cocotero como respuesta al tratamiento con el quitosano. Esto sugiere que uno de los niveles de regulación de la MAP cinasa que está involucrada en la señalización ante el inductor es el postraduccional.

RESUMEN

La painta de occoterio (Coreta nuclitare L.) ea una aspecie trouioal ecológica y acontenicamente importante. Esta painte las atecete por patógenos de diverse miturateza, como ean vinus, viroides hongos, protozoarios, nematostar y motipules Dada su naturateza aptólimica, el Amaritamiento Letal (AL) es la entervediat más ente que atecta e esta especie en América Central, el Cerba y Africa El AL es vina mitermodest devestadora matringida al lloanta y provocada por un ficiolesma, Acanque hay motiva estudios epidemiciógicos pera atela y consocada por un ficiolesma, atertaria y la painte, la falología de la ateracción occetero parte deta que atertario y motecular ha sido porce estadentes y por lo tento, es poco comprendida,

La modificación de covariante de proteinnas por fostoriación electritación estipérceptión de entimulos extracelutarias Esta actividad la fervan a cabo líndialmenta Démase Acrovades por Mitógeoos (MAP cintena), enzimas que consituyen una vía de comunicación intrecelutar conservada en exceptiona La participactar de la vía de de comunicación intrecelutar conservada en exceptiona La participactar de la vía de de comunicación intrecelutar conservada en exceptiona La participactar de la vía de de comunicación intrecelutar de la parcepción del estrite biotico y etidado na eldo democritaria en diventos modelos y especies vegetales de importante en eccentrato de presente tabaiso de investigadón, se decido evaluar si la presencia de un unitación de origen hingico activa e las MAP crinetes de occetaro, con el objetivo de inductor de origen hingico activa e las manación cosociano, con el objetivo de

Mediante un modelo de Inducción de las respuestas de dateres, que consistió en el reto de calina de occetaro con el inductor de origon lóngica quitoseno, se evatuó la respuesta de las MAP cineses a revel transcripcional y postruduccional. Mediante ansayos da cinese en gal, immunutetacción e immunopreciptación, se determinó que una posible MAP cinesa de -46 kDa se software en remusta e la presencia del inductor. Esta evidera sugiera que esta conasa podría participar en la transhocción de la sellar despuée de la preseción defi

Per otra parte, utilizando encaryos de RT-PCR con cebadores degenerados diveñedos e parte de regiones conservedar de MAP consent, sa cionarch mecuancias de ADNo de MAP cinasas de calo de cocoliaro, correspondentes a la región catalitica. Asimismo, enseyos de too RACE parmitieron donar encuencias de ADNo de genes do MAP cinasas de too RACE parmitieron donar encuencias de entremos 8 y 3. Utizando antes secuencias como ecidado que corresponden a sua entremos 8 y 3. Utizando antes secuencias como ecidado de los restancias el entremos 8 y 3. Utizando antes secuencias como ecidado de los ARM mensional entremos 8 y 3. Utizando antes secuencias como ecidado de los ARM mensional entremos de expresión, que bajo las campicacies en las que en restaño el economiento, no se observaran cambios en la pobleción de los ARM mensional econargondionaria en MAP cinasas de constito como respuesta al tratamiento con el quitorario. Esto sugtore que uno de los niveles de registación de las MAP cinasa que está involucionada en la señalización ante el las de registación de las MAP cinasa que está involuciona en la señalización ante el las inductores el las fueramientos con el está involuciona en la señalización ante el las inductores en el posteduraciones está involucionas en la señalización el los niveles de registación de las MAP cinasas que está involuciona en la señalización ante el las inductores en el posteduraciones está involucionas en la señalización el los niveles de registación de las MAP cinasas que está involucionas en la señalización el las inductores el el posteduraciones está involucionas en la señalización el las niveles de registación de las mais el inductores el está involucionas en la señalización el las niveles de registación de las elementes el está involucionas en la señalización el las niveles de registación de las elementes de está involucionas en las señalizaciones el las de las elementes de las elementes el está involucionas en las señalizaciones el las elementes elas elementes el está e

ABSTRACT

Coconut palm (Cocos nucifera L.) is an ecologically and economically important species in the tropics. Unfortunately, this palm is subjected to the attack of several disease-producing agents, including viruses, viroids, fungi, protozoa, nematodes and mollicutes. Lethal Yellowing (LY) has become the most serious and devastating disease in Central America, the Caribbean and Africa due to its epidemic nature. The LY causing agent, a phytoplasm, is located in the plant phloem. Even though, there are many epidemiological studies about LY and other coconut diseases, the basic physiology of coconut-pathogen interaction is poorly understood.

post-translational modification The covalent, of proteins bv phosphorylation/dephosphorylation is probably the most important signal transduction mechanism used after the perception of extracellular signals. One of the transduction pathways that uses this signaling mechanism comprises Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), enzymes that constitute one of the most conserved signaling pathways in eukaryotes. The role of the MAPK pathway after the perception of many biotic and abiotic stresses has been demonstrated in several plant models and also, in economically important crop species. Therefore, the main goal of this project is to determine if the presence of a fungal-derived elicitor activates the MAPKs. This work may constitute a step in the understanding of the physiology of coconut-pathogen interaction.

The imbibition of coconut calli with the fungal-derived elicitor chitosan was used as a model for the induction of defense responses and evaluating the behavior of MAPKs at the post-translational and transcriptional levels. By means of an *in situ* kinase gel assay and immunological techniques, it was found that a ~46 kDa MAPKlike enzyme was activated in response to the elicitor treatment. This suggests that a kinase may participate in the signal transduction after the perception of chitosan.

On the other hand, by means of the RT-PCR technique, and using degenerate primers flanking conserved motifs of plant MAPKs, we amplified and cloned cDNAs corresponding to the catalytic region of coconut calli MAP kinases. Furthermore we amplified and cloned 5' and 3' cDNA ends of coconut leaves MAPKs using RACE-like assays.

In order to evaluate modifications of mRNA populations of MAPK genes, we performed Northern blot assays using a MAPK cDNA sequence from coconut calli as a probe. The expression analyses revealed that there were no modifications of MAP kinases mRNA's population could be found in coconut calli treated with chitosan. This result suggests that the MAP kinase that responds after the elicitor treatment may be regulated, at least, at the post-translational level.

ABSTRACT

Coconut pairs (Cocos molene L) is an ecologically and economically important species or the tropics. Uniordanately, this pairs is subjected to the estack of winvers) diverse producing agents, excluding viruses viroids, I sngl, preload memolodes and molifoutes Laihel Yellowing (LY) has become from mode serious and developing discesse in Cantral America, the Cambbern and Africa due to its epidemic nature. The LY caluting agent, a phytoplasm, to located in the plant officers. Even developing there are many exidemiciological studies about LY and other occanut tobugh, there are many epidemiciological studies about LY and other occanut discesse, the basic physiology of coconst-pathogets interaction is story understood.

presignary/ation/dephatphorylation is proceedy the most an octant signal menduction mechanism used after the perception of extraoritular signal. One of the barraduction pathways that uses the signaling mechanism comprise Micagen-Activated Protein Knaws (MAPKs), enzymes that constitute on of the most comprised signaling pathways in extravities. The role of the MAPK pathway after the perception for many blotic and about attractive tract approximation of the most perception for many blotic and about attractive tract approximation of the most perception of the protect is to datamine if the presence of a tunget-terived atortaactivelets the MAPHs. This work may constitute a step in the under teriding of the activelets the MAPHs. This work may constitute a step in the under teriding of the offerences of a construction method on the tracter of a tunget-terived atortaactivelets the MAPHs. This work may constitute a step in the under teriding of the offerences.

The imbibilition of societud calls with the fungel-derived ellotte chitosan weat used as a model for the industrian of defense negotimes and maturing the cellswich of MAPKs at the post-translational and transcriptional levels. By make a of an an alter hinted get assay and minimunological techniques, it was found that a ~-0 kDa MAPKthe enzyme was activated in response to the ellotter treatment. This suggests that a hinted analysis is the central transmitter atom when the central and a suggests that a

On the other, hand, by means of the RT-PCR locknique, and using degenerate primers familing conserved motifs of paint MAPKs, we applied and cloned cDMAs corresponding to the catalytic region of cooprut call WAP timetes Furthermore we amplified and cloned 5' and 3' cDMA ands of occord, leaves MAPKs using RACE-like assays.

In order to evaluate modifications of mRMA populations of MATK genes, we nerformed Northern biot assays using a MAPK cDNA sequence from occoput call as a probe. The expression analysis revealed that there were no modifications of MAR identice mRMA a provisition could be found in coconul call treated with childrain. This result suggests that this MAP kinase that records after the eld to bectment may be repulsed, at items, of the post-treatational level.

INTRODUCCIÓN

Cocos nucifera L., conocida comúnmente como coco, palma de coco o cocotero, es tal vez uno de los árboles mejor reconocidos de los trópicos y uno de los más importantes económicamente hablando.

Cocos nucifera L. se cultiva en 100 países alrededor del mundo, alcanzando una superficie aproximada de 12 millones de Ha, donde se producen 50 billones de nueces de coco, las cuales producen 10 millones de toneladas métricas de copra (Taufikkurahman, 1993). Las plantaciones más extensas se encuentran en Filipinas, Indonesia y la India (Samosir *et al.*, 1999).

La importancia económica del cocotero radica en el número de empleos que genera debido a la producción de copra y su uso como materia prima para la obtención de derivados industriales. El endocarpio de la nuez tiene un uso extenso como carbón activado; el endospermo es una fuente importante de aceite y constituye la única fuente de ácidos grasos de cadena corta, como el ácido láurico. El aceite de coco es utilizado mundialmente en industrias, como las del jabón, de los alimentos y de los cosméticos, entre muchas otras (Hocher *et al.*, 1999).

En México, el cocotero representa la fuente de ingresos para miles de familias que participan en la cosecha, el procesado, la industrialización, la comercialización de fruta fresca y la fabricación de artesanías.

Como muchas de las especies vegetales de importancia agrícola, la palma de cocotero es atacada por múltiples organismos, entre los que se encuentran insectos, virus, bacterias, organismos tipo micoplasma y hongos; lo que mengua la cantidad y la calidad del fruto aprovechado. Ciertas enfermedades causadas por algunos patógenos son, inclusive, mortales para la palma, como la enfermedad denominada Amarillamiento Letal (AL), que ha arrasado con las poblaciones de cocotero y de otras palmas alrededor de la Península de Yucatán (INIFAP, 1997; Oropeza *et al.*, 1998). Actualmente el AL está presente en las costas del Golfo y del Caribe de México, y en la mayoría de los países de Centroamérica, en donde cientos de miles de palmas han muerto y millones se encuentran en riesgo, debido a que la variedad más común de cocotero, el Alto del Atlántico, es muy susceptible (Harries, 2001).

Para entender, y posteriormente incidir en la resolución del problema, no sólo del AL, sino de las enfermedades causadas al cocotero por patógenos de otra naturaleza, es necesario comprender la fisiología de la interacción planta-patógeno y la manera natural en que las plantas se defienden ante los microorganismos. Para conseguir este objetivo, es imprescindible conocer la manera en que los patógenos son percibidos por la planta, la forma en que la señal es comunicada al interior de la célula, y las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares, que se generan ante el ataque de un patógeno.

En diversos modelos vegetales, se ha observado que el reconocimiento de un potencial patógeno, o de un producto derivado del él dispara procesos de señalización que activan respuestas de defensa múltiples tanto a nivel local como sistémico; lo anterior resulta en el rápido establecimiento de una respuesta local, y en el desarrollo posterior de una resistencia sistémica ante patógenos no relacionados (resistencia sistémica adquirida, SAR, por sus siglas en inglés) (Scheel, 1998). En los últimos años, las evidencias experimentales confirman la importancia, la trascendencia y la participación de las proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas), como parte de las vías implicadas en la transducción de señales ante la percepción de los patógenos y los productos derivados de ellos (Suzuki y Shinshi, 1995; Adam *et al.*, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Desikan *et al.*, 1999; Romeis *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001; Tena *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo de tesis se pretende utilizar las técnicas bioquímicas y moleculares para determinar si existe una modificación a nivel transcripcional y postraduccional de las MAP cinasas en células de callos de cocotero, ante la percepción de patógenos; utilizando como modelo de inducción la adición de guitosano a callos de *Cocos nucifera* L.

Como muchas de las sevenas vegetales do montanto de vola a patria de contento es estada (or municies argenerato, estre las cas as encuenter municipal y la caladad de huio gravectado. Cavitas entermatadas de autores de devidant y la caladad de huio gravectado. Cavitas entermatadas de autores de devidant y la caladad de huio gravecadado cavitas entermatadas de autores de devidant y la caladad de huio gravecadado cavitas entermatadas de anteresida de contente entermanantes (AL), que te enterma entermatadas de intermadad de contente entermana electroles de la Pietras de Vicaste (MICAP - 500) concetes y en la mujora de la patente de Vicaste (MICAP - 500) Conten de Madria, y en la mujora de las geleses de Cartesemb de Cala y de clasida comente de pelítica feira entermana de Cartesemb de do dorda gen la versonal más esenda de accidem, el Alo de Alendado en en or espectado transec 2001).

Parte entendett, y panterconnente ecoliti las la recelución del problemia no selo del AL, anno de las entermensadas causedas el constano par país precisiones de otra insuluntezo en laboracero comprender la fabología de la transporto plar la patrigono y la manese natival en que las pantes na definidan ente los macango esences. Parte conserva ente adjetiva, se ingeneciados estados la manese en que la estiganos conserva en la plante, la forma en que la estal de commensa el natorero de la colluta y las relicioantes facilidades, bioquímicas y molocumos que se generam actés el estada en la conciencia facilidades produces y molocumos que se generam actés el estada en la conciencia.

(a) distaintaneous lo sub obstructs al es tabilitados activos acentros na atractación presente la las castrolas debición na els o casegolina lacintaria na critica lacol levis à ofisial estallaris sussibilitades de estatuaren revistre sus o casecularia a decet president eno ob atractivicatellare objeta la ne aluent revisión la conceleta.

Capítulo I

Antecedentes

1. EL COCOTERO

Descripción

Cocos nucifera L., conocido comúnmente como coco, palma de coco o cocotero, es tal vez uno de los cultivos mejor reconocidos de los trópicos y uno de los más importantes desde el punto de vista económico. El cocotero crece a lo largo de las costas arenosas de la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

La palma de coco es una planta polimórfica no ramificada, que en su etapa adulta puede alcanzar una altura de hasta 30 m. El tallo o tronco es columnar, recto o ligeramente curvado, un poco más grueso en la base, marcado en forma irregular por las cicatrices que dejan las hojas viejas al caer. El tronco termina en un penacho de hojas agrupadas densamente en el ápice, y en cada axila de las mismas, existen inflorescencias y racimos de coco en diferentes fases de desarrollo (Domínguez *et al.*, 1999).

Botánica

La palma de coco pertenece a la familia *Palmae*, a la subfamilia *Cocoideae* y es la única especie del género *Cocos*, de la cual se han desarrollado diferentes variedades y ecotipos. Es una especie diploide con 32 cromosomas (2n=32). En términos rigurosamente botánicos, el cocotero, por ser una monocotiledónea, no es un árbol, ya que su tallo no tiene una auténtica corteza, ramas, tejido vascular ni desarrollo secundario, características distintivas de las dicotiledóneas (Domínguez *et al.*, 1999).

Origen

El área de distribución natural del cocotero se desconoce, aunque se cree que este género se originó dentro de la región Indo-Malaya en el Pacífico Occidental (Parrotta, 1993) en donde se han encontrado evidencias de su presencia desde hace 28,000 años (Loy *et al.*, 1992). De esta región se diseminó a las áreas costeras de clima cálido húmedo, desde donde de manera natural, se dispersó hacia los continentes a través de las corrientes de agua de océanos, ríos y/o lagunas (Harries, 1978; Ashburner, 1994).

El hombre jugó un importante papel en la selección y la diseminación del cocotero, dado que prefinió los frutos con bajo contenido de mesocarpio, alto contenido de endospermo, una amplia cavidad interna y con gran cantidad del preciado líquido, que le servía para saciar su sed. Los melanesios y polinesios lo llevaron a la mayoría de las islas del Pacífico y a las costas occidentales de América del Sur (Ward y Bookfield, 1992); los malayos y los árabes lo llevaron al sureste de Asia, India y al este de África hacia el año 1000 A. C. (Shuiling y Harries, 1994). De ahí los portugueses y los españoles lo transportaron a África occidental y a las

costas orientales de América. La existencia del cocotero en territorio mexicano es posterior a 1539, ya que antes de esta fecha no se tienen registros de su presencia. El cocotero se introdujo en México por primera vez a las costas del Pacífico, procedente de las costas occidentales de Panamá y posteriormente, hubo introducciones de las Islas de Salomón y Filipinas. A las costas del Golfo de México, esta palma se introdujo de las Islas de Cabo Verde de África Occidental (Zizumbo, 1996).

Distribución actual

Hoy en día, el cocotero se localiza en el área pantropical, donde crece entre las latitudes 26° N y 26° S del Ecuador; fuera de estas latitudes su explotación comercial es muy difícil. Su adaptación está estrechamente relacionada con la latitud y la altitud sobre el nivel del mar: a latitudes menores, soporta mayores alturas, por lo que puede encontrarse a una altitud máxima de 600 msnm. Por encima de ésta, a cualquier latitud, solamente tiene valor como planta de ornato, ya que su producción de frutos se afecta notablemente (Domínguez *et al.*, 1999).

Cultivo e importancia económica

México era, hasta 1998 según el reporte de la FAO, el 7º productor de aceite de coco en el ámbito mundial, y el primero en América Latina, con un cultivo de alrededor de 200 mil Ha distribuidas en 13 entidades. En nuestro país, la importancia económica del cocotero radica en el número de empleos que genera, debido a la producción de copra y su uso como materia prima para la obtención de derivados industriales, como grasas, aceites, mantequilla, jabones, vinagres, alcoholes, etc. Adicionalmente, las fibras del fruto son utilizadas para hacer cordeles y tejer bolsas, mientras que las hojas y el tronco de la palma son utilizados como materiales de construcción (Persley, 1992). Además, en muchos casos, el cocotero representa la única fuente de ingresos para miles de familias que participan en la cosecha, el procesamiento, la industrialización, y la comercialización de fruta fresca y la fabricación de artesanías (Oropeza y Zizumbo, 1997; Domínguez, 1998).

Problemática del cocotero

En México, hasta antes de 1988, la superficie destinada para el cultivo del cocotero permaneció estable con 204,000 Ha (Hernández, 1990); a partir de ese año, la superficie nacional sembrada disminuyó drásticamente como consecuencia de la enfermedad del Amarillamiento Letal (AL) que afectó a toda la Península de Yucatán. Por esta razón, y debido a la poca rentabilidad económica actual del cocotero, actualmente se han eliminado plantaciones para establecer cultivos alternativos, como en el estado de Colima, donde esta especie se reemplazó por cítricos u otros frutales (Domínguez *et al.*, 1999).

Una de las causas principales por la que el productor no puede hacer del cultivo del cocotero una actividad redituable, es el bajo potencial de producción de los materiales usados. Además, el cultivo se desarrolla en áreas marginales. En la zona productora del Golfo de México y el Mar Caribe, el material cultivado no es lo suficientemente productivo y es susceptible al AL. En las costas del Pacífico

mexicano, los materiales tienen buen potencial de producción que puede ser mejorado, aunque es necesario sustituir las plantaciones existentes en las dos regiones productoras del país con materiales mejorados, resistentes a enfermedades, y que además, representen una opción rentable para el productor (Domínguez *et al.*, 1999).

La búsqueda de alternativas para mejorar al cocotero ha sido una constante en los diferentes países productores del mundo, con el objetivo de elevar la producción y la resistencia a plagas y enfermedades (Domínguez *et al.*, 1999). Como muchas de las especies vegetales de importancia económica para el hombre, la palma de cocotero es atacada por múltiples organismos, entre los que se incluyen insectos, virus, bacterias, organismos tipo micoplasmas, protozoarios y hongos El efecto de estos patógenos se traduce generalmente en una disminución de la cantidad y calidad del fruto. Y, en ocasiones, el ataque de algunos organismos es mortal para la palma, lo que ocasiona una disminución en las poblaciones (Frison *et al.*, 1993; Domínguez *et al.*, 1999).

Actualmente, la enfermedad más seria que afecta al cocotero en América Central, el Caribe, el Golfo de México y África es el Amarillamiento Letal (AL), una enfermedad devastadora provocada por un fitoplasma, el cual está restringido al floema (Dollet, 1999). Este patógeno es transmitido al tejido de las palmas por, al menos, un homóptero de la familia Cixiidae (*Myndus crudus* Van Duzee) cuando éste se alimenta del floema (Howard, 1983). En el interior de las palmas, el patógeno es transportado conjuntamente con el flujo del contenido del floema hacia los sitos de alta demanda de nutrientes, tales como las hojas en expansión, los frutos, la inflorescencia y los primordios vegetativos y reproductivos (Taufikkurahman, 1993; Córdova, 2000).

La enfermedad se desarrolla de acuerdo con las siguientes etapas:

- Caída prematura de la mayoría o todos los frutos, independientemente de su tamaño.
- Necrosamiento de las inflorescencias recién emergidas (normalmente de un color blanco-cremoso o amarillo).
- Amarillamiento de las hojas de mayor edad, avanzando esta coloración hacia arriba a lo largo de la corona foliar. En ocasiones, una sola hoja en la parte central de la corona se torna amarilla antes que las demás presagiando la enfermedad.
- Las hojas enfermas de aspecto turgente se tornan cafés, se secan y cuelgan hasta que caen.
- Caída de todas las hojas, por lo que el tronco adquiere un aspecto denominado "poste de teléfono".
- Las raíces se secan.

El poder destructivo del AL radica en su virulencia y en el hecho de que no ha podido ser controlado químicamente; por lo general, las palmas susceptibles mueren entre 3 y 6 meses después de la aparición de los primeros síntomas visuales (Zizumbo y Harries, 1990). Otras enfermedades que afectan en menor grado al cocotero, y que han sido descritas para América Latina, Sudámerica e Islas del Caribe, son:

1) La enfermedad del anillo rojo. Es causada por *Rhadinaphelenchus* cocophilus Cob., un nematodo que invade el centro del tallo de la palma, las raíces, el pecíolo y en algunos casos los frutos.

2) La pudrición del cogollo Enfermedad causada por *Phytophthora palmivora* (Butler), en la que el cogollo presenta en su base un color verde pálido, rodeado de un color más oscuro; esta característica continúa a través de la región central del cogollo hasta pudrirlo y desprenderlo de la base.

3) La marchitez de los cedros. Enfermedad asociada a protozoarios flagelados del género *Phytomonas*, los cuales se han encontrado asociados a bacterias como *Micrococus agilis y M. roseus*; en la enfermedad se observa amarillamiento y marchitez de las hojas, necrosis de inflorescencias, y pudrición acuosa, blanda y blanquecina del cogollo del cocotero (Domínguez *et al.*, 1999).

4) El decaimiento foliar. Enfermedad causada por el Virus del Decaimiento Foliar del Cocotero (CFDV, por sus siglas en inglés), un virus icosahédrico de 20 nm de diámetro que tiene una cadena sencilla de ADN circular de 1291 nucleótidos. En la enfermedad se observa clorosis y decaimiento de las hojas; en palmas susceptibles la planta muere entre los 6 meses a 2 años en que aparecen los síntomas de la enfermedad. Este padecimiento se ha observado, hasta reportes de 1993, en Vanuatu únicamente.

5) El cadang-cadang. Enfermedad causada por el viroide cadang-cadang del cocotero (CCCVd, por sus siglas en inglés), un ARN de cadena sencilla circular que forma una estructura en forma de bastón altamente estable debido al apareamiento de bases. En la enfermedad se observan frutos de forma circular, la aparición de puntos amarillos brillantes en las hojas, la necrosis de inflorescencias, el cese de producción de frutos y hojas, clorosis general y muerte de la palma (Frison *et al.*, 1993).

Para el control de estas enfermedades, se han utilizado diversas estrategias, de acuerdo a la naturaleza del patógeno:

- Aplicación de antibióticos a las palmas afectadas. Sin embargo, como en el caso del AL, la sintomatología reincide al interrumpir las aplicaciones, por lo que éstas se deben de realizar de forma constante.
- Control químico de los vectores. Dado que se elimina, al vector y a especies no relacionadas, esto resulta en un impacto ecológico más dañino. En ocasiones resulta imposible exterminar al vector por su amplia gama de hospedantes y distribución, incluso en áreas alejadas a las plantaciones de cocotero.
- Control cultural. Consiste en el corte y destrucción de palmas enfermas, inclusive de palmas que están rodeando a palmas enfermas, ya que pudiesen estar infectadas aún sin que presenten sintomatología alguna. De acuerdo a la magnitud del área afectada, esta medida podría resultar en grandes pérdidas, y debido al ciclo de vida tan largo de la palma, la

recuperación del productor, después de la repoblación, resulta en una larga e incosteable espera.

 Uso de materiales resistentes o tolerantes a la enfermedad. En general, ésta ha sido una de las formas más efectivas para enfrentar a las enfermedades. Sin embargo, se ha observado que las palmas tolerantes obtenidas por cruce de palmas tolerantes con susceptibles pueden perder esa condición (Domínguez et al., 1999).

Para entender y proponer medidas que ayuden al cocotero a contender contra sus patógenos, es necesario comprender los fenómenos que se presentan durante el proceso de interacción planta-patógeno y la manera en que las plantas, de manera natural, se defienden ante los microorganismos. Esto servirá de base para el uso acertado y dirigido de las herramientas disponibles que se aplicarán para ayudar a la planta a combatir a la enfermedad. La utilización de técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética para entender los mecanismos moleculares de protección a patógenos no se ha empleado en cocotero; no obstante, dichas metodologías han demostrado ser herramientas novedosas, exitosas y eficaces al ser utilizadas en animales, y más recientemente, en plantas para resolver problemas de susceptibilidad al ataque de hongos y bacterias (Song *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Hu y Reddy, 1997; Martin, 1999; Sakamoto *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000; Xing y Jordan, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2000; Innes, 2001; Bonas y Lahaye, 2002; Hammond-Kosack *et al.*, 2004).

2. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas son utilizadas como fuente de alimento y refugio por una amplia variedad de parásitos (virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos e inclusive otras plantas) (Odjakova y Hadjiivanova, 2001), pero una pequeña proporción de estos patógenos invaden de manera exitosa la planta hospedante causando enfermedad (Baker *et al.*, 1997). Aunque carecen de un sistema inmune parecido al de los mamíferos que responda y las proteja ante estos patógenos, las plantas han desarrollado otros mecanismos de defensa, los cuales pueden ser de tipo constitutivo ó inducible (Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

En las plantas se pueden distinguir dos tipos de resistencia ante los patógenos: la respuesta no específica ("non-host") y la respuesta específica de hospedero o de raza. En ambos casos, los procesos bioquímicos involucrados en la resistencia ante patógenos son muy similares (Somssich y Hahlbrock, 1998).

La resistencia de las plantas ante fitopatógenos se manifiesta por la imposibilidad del patógeno de crecer, multiplicarse y diseminarse en el hospedero, debido a una respuesta de defensa rápida conocida como Respuesta de Hipersensibilidad (HR) (Baker *et al.*, 1997; Odjakova y Hadjiivanova, 2001). La HR se caracteriza por una muerte localizada de las células y/o del tejido en donde ocurrió la infección (Dixon *et al.*, 1994). Como resultado, el patógeno permanece confinado en las lesiones necróticas cerca del sitio de infección, y el anillo de células que rodea a las lesiones necróticas puede constituir una barrera física ante

subsecuentes infecciones, fenómeno conocido como Resistencia Adquirida Localizada (LAR, por sus siglas en inglés) (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Baker *et al.*, 1997; Friting *et al.*, 1998). Esta respuesta local posteriormente produce una resistencia no específica en toda la planta conocida como Respuesta Sistémica Adquirida (SAR), que provee resistencia ante variados tipos de patógenos, incluso durante días (Ryals *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1997; Sticher *et al.*, 1997; Fritig *et al.*, 1998). Las modificaciones metabólicas en la LAR incluyen el reforzamiento de la pared celular a causa de la deposición y entrecruzamiento de polisacáridos, de proteínas, de glicoproteínas y de fenoles insolubles; la estimulación de vías de síntesis de metabolitos secundarios, algunas de las cuales producen metabolitos secundarios con actividad antibiótica (Ias fitoalexinas) y reguladores de la respuesta de defensa, como el ácido salicílico (SA), el etileno y metabolitos de origen lipídico; y por último, la acumulación de un amplio rango de proteínas y péptidos relacionados con la defensa ante patógenos (Hahn, 1996; Fritig *et al.*, 1998).

La Respuesta de Hipersensibilidad

La HR, que es generada ante la invasión de cualquier clase de patógeno, es la primera respuesta local, y es la característica más común asociada con la resistencia activa del hospedero (Jackson y Taylor, 1996; Baker et al., 1997). En la mayoría de los casos, la activación de la HR provoca la muerte de las células en el sitio de infección, lo cual resulta en la restricción del patógeno a pequeñas áreas que rodean a las células inicialmente infectadas. A nivel de toda la planta, la HR se manifiesta como lesiones necróticas pequeñas. El número de células afectadas por la HR es sólo una pequeña fracción del total en la planta, por lo que esta respuesta contribuye a la sobrevivencia de las plantas que sufren el ataque de un patógeno (Jackson y Taylor, 1996). Diversas líneas de evidencia sugieren que la muerte celular en la HR es una forma de muerte celular programada, ya que requiere de los procesos de transcripción y traducción, y está definida genéticamente (Pennell y Lamb 1997; Richberg et al., 1998; Lam et al., 2001). Aunque los detalles para la regulación y la ejecución de la HR no están aún bien comprendidos, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los flujos de iones, la fosforilación/desfosforilación de proteínas y la activación génica han sido implicadas en el proceso (Chandra et al., 1996; Jabs et al., 1996; Scheel, 1998; Martin, 1999).

La Respuesta Sistémica Adquirida

La SAR se aplica a una vía distinta de transducción de señales que desempeña un papel fundamental en la habilidad de las plantas para defenderse contra los patógenos (Ryals et al., 1996). Justo antes o al mismo tiempo que ocurre la HR, hay un incremento en la síntesis de varias familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) en las partes de las plantas infectadas por el patógeno. Se ha demostrado que muchas de estas proteínas poseen actividad antimicrobiana tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha observado, además que las proteínas PR son expresadas posteriormente en las partes de la planta que no tuvieron contacto directo con el microorganismo, lo que coincide con el desarrollo de una resistencia de larga duración y amplio espectro (SAR). Debido a esta

correlación, el incremento en la expresión de los genes PR es frecuentemente usado como un marcador para la SAR (Ryals et al., 1996; Klessig et al., 2000).

Reconocimiento del patógeno

El reconocimiento juega un papel central en las interacciones entre las plantas y sus patógenos. Los segundos, por ejemplo, deben ser capaces de reconocer la presencia de la planta hospedera en el ambiente, y frecuentemente deben reconocer características específicas en la superficie de la misma para lograr una penetración e infección exitosas. Los microorganismos que logran infectar deben también ser capaces de reconocer y allanar las respuestas de defensa de las plantas (Hahn, 1996). Por otro lado, las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados para detectar la multitud de patógenos potenciales en su ambiente y en consecuencia para activar sus mecanismos de defensa (Boller, 1995).

Los mecanismos de defensa inducibles (como la HR, la LAR y la SAR) se inician una vez que ocurre el reconocimiento específico del patógeno invasor por parte de la planta. En la resistencia "hospedero-específica", la percepción ocurre a través de receptores con alto grado de especificidad hacia el patógeno, codificados por genes que se expresan constitutivamente. Ilamados genes de resistencia a enfermedad [genes (R)]. Estos receptores están localizados tanto en la membrana plasmática como en el citosol (Martin, 1999; MacDowell y Dangl, 2000). Un gran repertorio de genes R no muy relacionados, todos con diferentes especificidades en cuanto reconocimiento, han sido hallados en una sola especie (Ellis et al., 2000). Cada gen R tiene capacidades de reconocimiento muy específicas y pone en funcionamiento mecanismos de resistencia cuando el patógeno invasor expresa el correspondiente gen de avirulencia (Avr). Los productos de los genes de avirulencia de diferentes patógenos son estructuralmente muy diversos, con diferentes funciones primarias en la biología de los organismos que los producen (Odjakova y Hadjijvanova, 2001). Un reconocimiento específico del agresor implica que por cada gen Avr exista su contraparte, un gen R en la planta, y se piensa que el reconocimiento es mediado por la unión receptor-ligando (Glazebrook, 1999). Cerca de 20 genes R, con especificidades diversas en cuanto al reconocimiento por ciertos genes Avr, han sido aislados de siete especies de plantas, entre las que se encuentran monocotiledóneas y dicotiledóneas. Estos genes son efectivos contra patógenos bacterianos, virales y fúngicos, e inclusive contra nematodos y áfidos (Martin, 1999).

Es de sorprender que los genes *R* codifiquen proteínas con ciertos dominios comunes, sin importar la gran diversidad en cuanto a la biología, la estructura y a los mecanismos patogénicos de los organismos causantes de enfermedad en las plantas (Odjakova y Hadjiivanova, 2001). En virtud de la conservación de estos dominios comunes, los genes *R* se han dividido en cinco clases:

I. Proteínas cinasas intracelulares

11.

Proteínas cinasas tipo receptor con un dominio extracelular de residuos repetidos ricos en leucina (LRR)

- III. Proteínas intracelulares LRR con un sitio de unión a nucleótido (NBS) y un motivo de "zipper" de leucina (LZ)
- IV. Proteínas intracelulares NBS-LRR con una región con similitud a las proteínas Toll y al receptor de interleucina-1 (TIR) de Drosophila y de los mamíferos
- V. Proteínas LRR extracelulares unidas a membrana (Martin, 1999; Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

Los genes *R* codifican proteínas que a la vez que determinan el reconocimiento de proteínas *Avr* específicas derivadas de patógenos e inician vías de transducción de señales que conducen a complejas respuestas de defensa (Zhou *et al.*, 1998; Del Pozo y Estelle, 1999; Martin, 1999). Los genes *R* que confieren resistencia a patógenos bacterianos, fúngicos y virales parecen utilizar rutas múltiples de señalización, algunas de las cuales convergen finalmente en efectores comunes, como las proteínas cinasas activadas por mitógenos [MAP cinasas] (Zhang y Klessig, 1998; Romeis, 1999; Zhang *et al.*, 2000).

Resistencia no específica

Este tipo de resistencia se presenta en todas las plantas que responden a patógenos potenciales sin una interacción aparente gen *R*/gen *Avr*, y se da por reconocimiento de moléculas "señal-específicas", derivadas del patógeno o de la pared celular de la planta, llamadas inductores exógenos o endógenos, respectivamente. Estos inductores son, por lo general, productos de bajo peso molecular sintetizados como tales o liberados a partir de precursores poliménicos durante la infección (Somssich y Hahlbrock, 1998). La estructura química de estos inductores es muy diversa y pueden ser glucoproteínas, péptidos u oligosacáridos. Algunos inductores de naturaleza proteica son producidos directamente por los patógenos bacterianos o fúngicos, mientras que algunos oligosacáridos biológicamente activos son liberados del patógeno y de las paredes celulares de las plantas por hidrolasas secretadas en ambos organismos. En este mecanismo se presentan complejos y aún no resueltos sistemas de percepción de estos inductores en la superficie de la célula vegetal, que activan múltiples vías de señalización de defensa intracelulares (Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

En conclusión, es posible que los mecanismos de respuesta de las plantas ante patógenos en la resistencia específica de hospedero o de raza, y en la no específica sean activados por interacciones ligando/receptor, en las cuales el gen *Avr* y los inductores derivados del patógeno o de la pared de la célula vegetal actúan como ligandos para receptores localizados en la membrana plasmática o en el citosol.

Transducción de la señal

El reconocimiento mediado por un receptor en el sitio de infección inicia los procesos de señalización celulares y sistémicos que activan múltiples respuestas de defensa a nivel local y sistémico, lo que resulta en el rápido establecimiento primero de una respuesta local y el desarrollo posterior de la SAR (Scheel, 1998).

Una vez que ocurre el reconocimiento del patógeno, las primeras reacciones detectables en las células en la planta son la apertura de canales iónicos específicos (Somssich y Hahlbrock, 1998) en otras palabras, cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática que ocasionan una entrada de calcio y de protones al interior de la célula y una salida de potasio y cloruro (McDowell y Dangl, 2000). Los flujos de iones inducen una producción de especies reactivas de oxígeno en la superficie de la membrana plasmática, tales como el ión superóxido ($\cdot O_2$), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH), probablemente vía la acción de una NADPH oxidasa asociada a la membrana plasmática y/o de peroxidasas localizadas en el apoplasto (Somssich y Hahlbrock, 1998). Estas reacciones iniciales de tipo transitorio son, al menos en parte, prerreguisitos para la ocurrencia de más eventos de transducción de señales, con el consecuente establecimiento de una compleja red de señalización que genera la respuesta de defensa global (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Esta red incluye numerosos cambios, tanto en la actividad metabólica como en la polaridad de la membrana, en las concentraciones de Ca⁺⁺ y H⁺ citosólicos y en la actividad de varias enzimas reguladas alostéricamente, como las NADPH oxidasas, las fosfolipasas, las fosfatasas y las proteínas cinasas (Yang et al., 1997).

El papel del calcio en la transducción de señales asociada a la percepción de patógenos fue demostrado en experimentos con inhibidores de canales de calcio, que previenen el incremento de las concentraciones de calcio citosólicas, observándose un retraso en el desarrollo de la HR. Las proteínas G-heterotriméricas y la fosforilación/desfosforilación de proteínas están probablemente involucradas en la transferencia de señales desde el receptor hacia los canales de calcio, los cuales a su vez activan reacciones posteriores en las cascadas de transducción de señales (Legendre *et al.*, 1992).

Los cambios arriba mencionados, que ocurren de manera rápida, probablemente tienen efectos inmediatos en varias vías metabólicas. Por ejemplo, los cambios en el flujo de iones ocasionan una producción localizada de ROS y óxido nítrico, los cuales fungen como segundos mensajeros para la inducción de la respuesta de hipersensibilidad y la expresión de genes de defensa (Piffanelli *et al.*, 1999). Por otro lado, se cree que las fosfolipasas específicamente inducidas actúan dentro de membranas sobre ácidos grasos no saturados unidos a lípidos, lo que resulta en la liberación de ácido linolénico, el cual sirve como sustrato para la producción de ácido jasmónico, de jasmonato de metilo y de moléculas relacionadas a través de una serie de pasos metabólicos (Mueller, 1997; Somssich y Hahlbrock, 1998). Se ha visto que estos metabólitos y sus precursores actúan como moléculas-señal bajo varias condiciones, incluyendo el ataque por patógenos (Yang *et al.*, 1997).

Aunque una rápida y elevada generación de ROS dependiente de NADPH oxidasas probablemente genere un estrés oxidativo severo en las células de la planta afectada e implique el establecimiento de medidas para limitar el daño tisular (Somssich y Hahlbrock, 1998), la explosión oxidativa es un componente central de la maquinaria de defensa en plantas (Lamb y Dixon, 1997; Alvarez *et al.*, 1998). Se ha reportado que la explosión oxidativa que ocurre durante las interacciones planta-

patógeno es inducida a través de una cascada de proteínas cinasas (Suzuki *et al.*, 1999) y hay evidencias de que la muerte celular mediada por MAP cinasas está asociada con la producción de H_2O_2 en *Arabidopsis* (Ren *et al.*, 2002). En general, las ROS de la explosión oxidativa vía la cascada de proteínas cinasas han sido implicadas como una señal que promueve la transducción que guía a múltiples fenómenos, entre ellos las respuestas de defensa y la muerte celular hipersensible (Doke *et al.*, 1996; Low y Merida, 1996). Por otra parte, el incremento de H_2O_2 en la superficie de la célula de la planta promueve el entrecruzamiento oxidativo, mediado por peroxidasas, de proteínas estructurales en la pared celular, y con ello, el reforzamiento de esta barrera física contra el ingreso del patógeno (Scheel, 1998).

Aunque las altas concentraciones locales de ROS podrían participar en la muerte tanto del patógeno como de la célula vegetal afectada (muerte celular hipersensible) (Bestwick *et al.*, 1997; Lamb y Dixon, 1997), pequeñas dosis de las mismas podrían actuar como señales para la inducción de mecanismos de destoxificación que involucran a las superóxido dismutasas, a las glutation-S-transferasas y a la activación de otros mecanismos de defensa en células vecinas (Wojtaszek, 1997; Somssich y Hahlbrock, 1998).

En resumen, los indicios sugieren que un sistema general de defensa en las plantas puede estar definido por la activación específica de un receptor celular tras su unión con un patógeno (Wang *et al.*, 1996), la subsiguiente inducción de un sistema de transducción de señales (Zhang y Klessig, 1997), y finalmente, la promoción de una serie de respuestas locales y sistémicas (Ligterink *et al.*, 1997).

3. LOS INDUCTORES Y LAS RESPUESTAS DE DEFENSA

El vocablo "inductor" proviene de la palabra inglesa "elicitor", que en un principio se usó para denominar a las moléculas y otros estímulos que inducen la síntesis y la acumulación de productos antimicrobianos (fitoalexinas) en células vegetales; en la actualidad, el vocablo se utiliza comúnmente para describir a moléculas que estimulan cualquier mecanismo de defensa en plantas (Hahn, 1996). Ejemplos de los diversos mecanismos de defensa causados por éstos incluyen la síntesis y acumulación de fitoalexinas antimicrobianas, la inducción de la muerte celular (necrosis hipersensible), la producción de glucosil-hidrolasas capaces de atacar los polímeros de superficie de los patógenos, la síntesis de proteínas inhibitorias de enzimas degradativas producidas por los patógenos, la producción de ROS (explosión oxidativa) y la modificación de la pared celular por la deposición de callosa, glucoproteínas ricas en hidroxiprolina y/o lignina (Hahn, 1996). Para que puedan generarse toda esta gama de respuestas de defensa es necesario, como primer paso, el reconocimiento del inductor por parte de receptores en la célula vegetal. Ahora bien, en los últimos años la atención se ha centrado en identificar la manera en la que las células vegetales perciben y transducen estas señales biológicas para activar respuestas de defensa.

at the function of the second statement of the second

Presentación y liberación de los inductores

Como primer paso, las moléculas inductoras activas deben ser liberadas por los patógenos invasores (bacterianos o fúngicos), antes de o durante la invasión. Estos productos pueden ser componentes integrales de la superficie celular microbiana (β -glucanos, quitina o quitosano) que requieren de la actividad enzimática del hospedero (por ejemplo, β -glucanasa y/o quitinasa) para su liberación, o pueden ser sintetizados y liberados por el patógeno *in planta* como respuesta a señales de parte del hospedero (Dixon *et al.*, 1994).

Reconocimiento del inductor

Las plantas tienen sistemas de quimiopercepción extremadamente sensibles para sustancias señal derivadas de microorganismos. Entre las sustancias microbianas que las plantas pueden percibir a concentraciones de 10⁻¹²-10⁻¹⁰ M están los oligosacáridos, los lipo-oligosacáridos, los péptidos, los glucopéptidos y sustancias lipofílicas, como el ergosterol. En muchos casos, los sistemas de percepción de las plantas reconocen con alto grado de especificidad a las moléculas, que son características de hongos y bacterias. Se han reportado sitios específicos de unión para moléculas señal de origen microbiano en células vegetales intactas y en membranas plasmáticas aisladas; estos sitios probablemente funcionan como receptores. Es necesario hacer notar que la quimiopercepción de sustancias microbianas no sólo podría tener un papel en la defensa activa y en la respuesta ante patógenos, sino también en la simbiosis y en la adquisición de información básica por parte de la planta de los microbios del medio ambiente (Boller, 1995).

Los inductores fúngicos estructuralmente caracterizados incluyen: los β glucanos β 1 \rightarrow 6, 1 \rightarrow 3 de las paredes celulares de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, la quitina y el quitosano, los glucopéptidos que contienen cadenas laterales de manosa:N-acetilglucosamina liberados de la invertasa de levadura por hidrólisis con α -quimiotripsina, las proteínas elicitinas no glucosiladas de 10 kDa y el producto peptídico de gen *Avr*9 de *C. fulvum*, el único inductor específico de raza. El inductor de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* que provoca la producción de fitoalexinas en células en cultivo de perejil, no es un glucano, sino una proteína rica en cisteina de M₄42 kDa (Parker *et al.*, 1991). Los inductores bacterianos estructuralmente caracterizados incluyen las proteínas harpin de 35-45 kDa de *Pseudomonas syringae* y *Erwinia amylovora*, y el inductor lipooligosacárido liberado de una bacteria gram negativa que expresa el gen *AvrD* de *P. syringae* pv. *tomato* (Dixon *et al.*, 1994). Con base en el objetivo del presente trabajo, sólo se mencionarán oligosacáridos.

Oligosacáridos

Los oligosacáridos son los prototipos de señales microbianas reconocidos por las células vegetales y están entre las primeras moléculas que han sidos caracterizadas en detalle (Boller, 1995; Hahn, 1996). Estas moléculas inducen la acumulación de fitoalexinas [productos antimicrobianos de bajo peso molecular] (Boller, 1995). Como se mencionó, los inductores de este tipo caracterizados a la fecha incluyen fragmentos de oligosacáridos de hongos (hepta-β-glucósidos, la oligoquitina o quitina y el oligoquitosano o quitosano) y los polisacáridos de la pared celular vegetal (oligogalacturónidos) (Hahn, 1996).

Hepta-β-glucósidos

Los glucanos con la habilidad para inducir la acumulación de fitoalexinas en tejidos de soya fueron detectados por primera vez en los filtrados de cultivos de *Phytophthora sojae*, un oomiceto fitopatogénico, y después, fueron purificados de extractos de levadura. Estos inductores están compuestos de residuos β -glucosilo en posiciones 3-, 6-, y 3, 6-, una composición muy similar a la de los glucanos, que son los constituyentes mayoritarios de diversas paredes de micelio. Glucanos similares pueden ser liberados de las paredes de los micelios de *P. sojae* por hidrólisis parcial, tanto química como enzimática. Los glucanos activos como inductores también pueden ser liberados al medio de cultivo al germinar las zoosporas de *P. sojae*, lo que sugiere que no se necesitan mecanismos degradativos por parte del hospedero para explicar la liberación de los inductores en la interacción entre el patógeno y la planta (Hahn, 1996).

Se han reportado β -glucanos cíclicos unidos a través de enlaces 1,6-1,3-, secretados por el simbionte bacteriano de la soya *Bradyhizobium japonicum*, como inductores activos de la acumulación de fitoalexinas en cotiledones de soya, aunque a concentraciones significativamente más altas que la de los glucanos fúngicos (Hahn, 1996).

El oligoglucósido más pequeño que es activo como inductor fue purificado de una mezcla de oligoglucósidos generados por hidrólisis ácida de paredes de micelios. Es un hepta- β -glucósido ramificado con un esqueleto de cinco residuos β -glucosilo (1 \rightarrow 6) enlazados y con dos residuos β -glucosilo terminales unidos en el C-3 de los anillos de glucosa segundo y cuarto (Hahn, 1996).

Oligómeros de quitina

La quitina es un homopolímero lineal de N-acetilglucosaminas unidas por enlaces β-1,4. Es el mayor componente polisacárido de las paredes de los micelios incluyendo las de los hongos fitopatógenos, así como del exoesqueleto de los artrópodos. No es producido por las plantas y por ende puede usarse para la detección de hongos e inclusive de invertebrados (Boller, 1995; Hahn, 1996). La quitina, una macromolécula insoluble, induce lignificación cuando es inyectada en hojas de trigo (Pierce y Ride, 1982; Baber et al., 1989) y cuando se aplica a células en suspensión de pino (Lesney, 1989). Además, genera la producción de fitoalexinas cuando es añadida a cultivos de células de arroz (Ren y West, 1992). En estos sistemas, las quitinasas vegetales probablemente liberan oligómeros de quitina solubles que pueden ser percibidos por la planta (Boller, 1995). Estudios de estructura-actividad usando oligómeros purificados de quitina indican que aquellos con un grado de polimerización (DP) menor a cuatro no son activos, mientras que los oligómeros con un DP ≥ 6 son activos. Existen algunas variaciones entre las plantas en cuanto al mínimo DP de oligoquitinas que inducen una respuesta; así, el arroz responde a oligoquitinas DP \geq 6, mientras que células de tomate responden a

un DP ≥ 4 . Algunos estudios sugieren que la percepción de los fragmentos de quitina ocurre en la superficie celular de las células responsivas al inductor (Hahn, 1996). De esta manera, la inducción de la producción de fitoalexinas en cultivos de células en suspensión de arroz por oligómeros de quitina con un DP ≥ 6 se acompaña de una rápida y transitoria despolarización de la membrana (Kuchitsu *et al.*, 1993). Además, se ha reportado la inducción de especies reactivas de oxígeno en cultivos de células en suspensión de arroz por oligómeros de quitina con un DP ≥ 6 se acompaña de una rápida y transitoria despolarización de la membrana (Kuchitsu *et al.*, 1993). Además, se ha reportado la inducción de especies reactivas de oxígeno en cultivos de células en suspensión de arroz por oligómeros de quitina con un DP entre 7 y 8 (Kuchitsu *et al.*, 1995).

El quitosano (2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosa) es la forma N-desacetilada de la quitina. Los oligómeros del quitosano son activos como inductores en diversas plantas (Walker-Simmons *et al.*, 1983; Kendra y Hadwiger, 1984; Walker-Simmons y Ryan, 1984; Conrath *et al.*, 1989; Kauss *et al.*, 1989; Hadwiger *et al.*, 1994). Una característica particular es que el quitosano y sus fragmentos no son activos en aquellas plantas en donde los oligómeros de la quitina son activos (Hahn, 1996).

Transducción de la señal

Hace unos años, debido a la rápida respuesta de las células vegetales a las oligoquitinas, y en general, a los inductores, se sugirió que entre la percepción y la activación de las respuestas de defensa mediaba una vía de transducción de señales (Dixon y Lamb 1990). Un paso significativo hacia la comprobación de tal premisa fue el aislamiento y caracterización de proteínas que se unen específicamente a las quitinas. Los estudios que demostraron la presencia de tales proteínas en la membrana plasmática de células vegetales fueron reportados por Shibuya et al. (1993) y Baureithel et al. (1994), quienes trabajaron con células en suspensión de tomate y arroz, respectivamente. Posteriormente, se determinó que cinasas tipo receptor que tienen en su región extracelular motivos de unión a carbohidratos (por ejemplo: LysM, L-lectinas, Lectinas tipo C y PAN), podrían tener un papel en la unión de componentes de paredes celulares y glucoproteínas, quizá en la regulación de la estructura de paredes celulares vegetales o en la respuesta de la planta ante patógenos (Shiu y Bleecker, 2001). Entre estos dominios, el LysM fue identificado primero en enzimas involucradas en la degradación de paredes celulares bacterianas, y se sabe que une polímeros que contienen Nacetilglucosamina (Birkeland, 1994; Bateman y Bycroft, 2000). Se piensa que las Llectinas actúan como proteínas de defensa involucradas en el reconocimiento de glucanos provenientes de patógenos, y por lo tanto, los receptores tipo cinasas Llectinas podrían participar en la detección de los mismos (Bateman y Bycroft, 2000). Además, un dominio relacionado con actividad de guitinasa identificado en un receptor tipo cinasa de Nicotiana tabacum (CHRK1) está también implicado en la unión de los componentes de paredes celulares de origen fúngico (Kim et al., 2000).

Fosforilación y desfosforilación de proteínas

Diversas líneas de evidencia han demostrado que la participación de las proteínas cinasas en las respuestas de defensa generadas por los inductores es un proceso esencial. Lo anterior se hizo manifiesto con el uso de inhibidores de proteínas cinasas, como son el K-252a y la estaurosporina. Al emplear estos

inhibidores, se observó que el bloqueo de la fosforilación de proteínas inhibía la alcalinización del medio, así como la aparición de la actividad de PAL, la explosión oxidativa, la expresión de genes de defensa y la producción de etileno (Grosskopf *et al.*, 1990; Felix *et al.*, 1991; Viard *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995), respuestas que se observaban después de la percepción de un patógeno. En vista de la efectividad en el uso de los inhibidores de cinasas, incluso durante el curso de la inducción, se sugirió que la continua fosforilación y desfosforilación de proteínas era necesaria para el mantenimiento del estado de inducción (Felix *et al.*, 1991).

Varios estudios demuestran cambios rápidos en los patrones de fosforilación de proteínas nucleares, citoplásmicas y de membrana, los cuales son producidos por inductores (Grab *et al.*, 1989; Dietrich *et al.*, 1990; Farmer *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1991; Bolwell, 1992; Viard *et al.*, 1994). En muchos casos estos cambios son dependientes de la presencia de Ca⁺⁺ y revertidos tras la eliminación del inductor (Grab *et al.*, 1989, Dietrich *et al.*, 1990; Suzuki y Shinshi, 1995).

4. UN ENLACE ENTRE LA PERCEPCIÓN Y LA RESPUESTA CELULAR VEGETAL: LA CASCADA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAP CINASAS)

A fin de que las células respondan y se adapten a las circunstancias externas, los cambios en el ambiente extracelular deben ser comunicados de una forma específica del exterior hacia el interior de la célula: citosol y núcleo, a fin de que en éste último puedan darse los cambios en la expresión génica requeridos como respuesta al estímulo que se percibió. Durante el curso de la evolución, las células han desarrollado diversos mecanismos para regular la expresión génica, así como la actividad de los productos de dichos genes. Estrechamente asociado a muchos de estos mecanismos están los procesos de fosforilación por proteínas cinasas específicas, y de desfosforilación por proteínas fosfatasas (Hunter, 1995; Hardie, 1999). La activación y la desactivación de enzimas a través de la fosforilación/desfosforilación por cinasas y fosfatasas permite una transducción de la señal rápida y específica, con la consecuente amplificación del estímulo externo (Brown et al., 1997). Un mecanismo particular de transducción de señales es la cascada de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAP cinasas), la cual desempeña un papel importante en todos los organismos eucariotes en donde se ha estudiado, incluvendo levaduras, gusanos, moscas, ranas, mamíferos y plantas (Morris, 2001).

Definición y organización

La cascada de las MAP cinasas es una vía de transducción de señales que conecta diversos receptores/sensores con respuestas celulares y nucleares (Tena *et al.*, 2001). Es un bloque básico en la señalización celular, conservado en todos los eucariotes, y se ha confirmado su participación en procesos como la regulación del crecimiento y la muerte celular, la diferenciación celular, la regulación del ciclo celular y la respuesta ante estrés (Wrzaczek y Hirt, 2001; Jonak *et al.*, 2002). La cascada de las MAP cinasas está organizada en módulos. El módulo mínimo está

compuesto de tres cinasas correspondientes a una vía de activación secuencial (Hirt, 2000; Jonak *et al.*, 2002) (Figura 1.1).

Las primeras cinasas del módulo son las MAP cinasas cinasas cinasas (MAPKKK) (Widmann et al., 1999), las cuales son las enzimas estructuralmente más heterogéneas de la cascada (Wrzaczek y Hirt, 2001). Estas proteínas contienen diferentes motivos estructurales como los dominios homólogos a pleckstrina (PH), dedos de zinc, cierres de leucina, sitios de unión a proteínas G y numerosos sitios de fosforilación en residuos de tirosina y serina/treonina (Garrington y Johnson, 1999). Del mismo modo, los mecanismos de activación de las MAPKKK son diversos, y van desde la fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) o por MAPKKKcinasas, como la Ste20 de levaduras, hasta la activación vía interacción con las proteínas G o con sistemas de dos componentes (Wurgler-Murphy y Saito, 1997; Millner, 2001). Otros modos potenciales de activación incluyen la oligomerización y la relocalización subcelular. Las MAPKKK son cinasas de serina/treonina que cuando son activadas, fosforilan y por tanto, activan a la siguiente cinasa del módulo, la MAPK cinasa (MAPKK) (Widmann et al., 1999). Se sabe que ciertas MAPKKKs están involucradas en múltiples cascadas MAPK (Gustin et al., 1998) y en otras vías de proteínas cinasas (Lee et al., 1997).



Figura 1.1. Organización secuencial de la Cascada de las MAP cinasas. (Tomado de Hirt, 2000).

Las MAPKKs, el segundo miembro de la cascada MAPK, son cinasas duales que son activadas por las MAPKKS mediante la fosforilación en dos residuos serina/treonina en el motivo conservado SXXXS/T (Alesi *et al.*, 1994; Zheng y Guan, 1994); sin embargo, en plantas, se cree que el motivo es S/T-X₃₋₅-S/T (Yang *et al.*, 2001; Jonak *et al.*, 2002). Estas enzimas reconocen y fosforilan el motivo Thr-X-Tyr en la asa de activación del tercer miembro de la cascada, las MAP cinasas (Gartner *et al.*, 1992). Esto apunta a que las MAPKKs actúan como proteínas cinasas duales; sin embargo, en plantas no está del todo comprobado si existen enzimas duales o si la fosforilación la realizan por separado cinasas de serina/treonina y cinasas de tirosina. Por otro lado, no se conoce otro sustrato de las MAPKKs más que las MAP cinasas (Serger *et al.*, 1992); y además, las MAPKKs pueden fosforilar a más de una MAP cinasa una vez activadas (Cardinale *et al.*, 2002).

Las MAP cinasas son las cinasas finales en el módulo y todas tienen en común, en el dominio catalítico. 11 subdominios característicos de las proteínas cinasas de serina/treonina (Hanks et al., 1988). Además, dentro del sitio activo se encuentra el asa de activación (T-loop) entre los subdominios VII y VIII (Zhang et al., 1995; Ichimura et al., 2002), caracterizada por el motivo dual de fosforilación altamente conservado TxY (Payne et al., 1991; Gartner et al., 1992). La fosforilación, tanto en los residuos de tirosina y treonina por la MAPKK es un requisito para la activación completa de la MAP cinasa y la accesibilidad al sitio de unión del sustrato (Canagarajah et al., 1997). Las MAP cinasas activas pueden fosforilar sustratos en el citosol, o ser transportadas al núcleo, ya sea mediante transporte activo o pasivo (Lenormand et al., 1993; Ligterink et al., 1997; Khokhlatchev et al., 1998; Adachi et al., 1999; Volmat et al., 2001). Los sustratos de las MAP cinasas incluyen enzimas como son otras proteínas cinasas, fosfatasas, fosfalipasas, proteínas asociadas con el citoesqueleto y factores de transcripción (Treisman, 1996; Widmann et al., 1999). Los sustratos de las MAP cinasas son fosforilados en residuos de serina o treonina, los cuales están rodeados por residuos de prolina. Se ha determinado en ensayos in vitro que, para que un péptido pueda ser sustrato de las MAP cinasas, la prolina Cterminal debe de estar localizada advacente al residuo de treonina, mientras que la prolina N-terminal debe de estar separada de la treonina por al menos un aminoácido (González et al., 1991).

La especificidad y la eficiencia de la transducción de la señal se logran a través de proteínas estructurales o accesorias, las cuales unen o atan ciertas combinaciones de MAPKKKs, IMAPKKs y MAP cinasas (Printen y Sprague, 1994; Posas y Saito, 1997; Xu y Cobib, 1997; Schaeffer *et al.*, 1998; Whitmarsh y Davis, 1998). Además, se logra una mayor especificidad por la presencia de dominios de anclaje en activadores (MAPKKs), inactivadores (fosfatasas) y los sustratos de las MAP cinasas (*Jacobs et al.*, 1999; *Tanoue et al.*, 2000). Estos dominios de anclaje consisten en un agrupamiento de aminoácidos cargados positivamente situados aparte del dominio catalítico (Wrzaczek y Hirt, 2001).

La revisión que se presenta a continuación versa acerca del último miembro de la cascada de las MAP cinasas abordando, principalmente, su participación en la señalización ante diversos tipos de estrés en modelos vegetales.

Clasificación en plantas

En 2002, un grupo de expertos en MAP cinasas (Ichimura et al., 2002) analizó el genoma completo de Arabidopsis thaliana (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) e identificó 20 genes que codifican posibles MAP cinasas. 10 genes que codifican MAPK cinasas y 60 que codifican MAPKK cinasas. El grupo de MAPK analizó las secuencias por métodos filogenéticos y propuso una sola nomenclatura para las MAP cinasas y las MAPK cinasas de Arabidopsis (MPK y MKK. respectivamente). Además, del análisis comparativo de las secuencias de MAP cinasas de A. thaliana, se identificaron características estructurales y motivos-firma determinados que permitieron dividir a estas MAP cinasas (MPKs) en al menos 4 subgrupos (A-D) (Figura 1.2). La comparación del motivo conservado TxY, el cual es fosforilado por las MAPK cinasas, clasifica a las MPKs de Arabidopsis en dos subtipos: el TEY y el TDY, que contienen el motivo TEY o TDY en el sitio de fosforilación, respectivamente. El subtipo TEY puede ser clasificado a su vez en tres grupos: el grupo A, el grupo B y el grupo C, mientras el subtipo TDY forma un grupo más distante, el grupo D (Figura 1.2) (Ichimura et al., 2002). Se ha encontrado que las MPKs del grupo A están implicadas frecuentemente en respuestas ante estímulos ambientales y hormonales (Seo et al., 1995; Mizoguchi et al., 1996; Munnik et al., 1999; Kovtun et al., 2000; Nühse et al., 2000; Ichimura et al., 2000; Desikan et al., 2001; Yuasa et al., 2001; Zwerger y Hirt, 2001; Zhang y Klessig, 2001). Las MPKs del grupo B, aunque han sido menos estudiadas, parecen estar involucradas en respuestas ante estrés de tipo ambiental y en división celular (Calderini et al., 1998; Bögre et al., 1999; Ichimura et al., 2000; Petersen et al., 2000; Desikan et al., 2001). Hasta la fecha, la información perteneciente a las MPKs del grupo C es limitada, aunque el análisis de microarreglos detectó una expresión regulada por el ciclo circadiano de MPK7 (Schaffer et al., 2001). Las MPKs del grupo D tienen la notable característica de poseer el motivo TDY en su asa de activación (T-loop) y una región C-terminal extendida, con respecto a las MPKs de los otros grupos; asimismo, carecen del dominio CD localizado en la región C-terminal, que también se encuentra en las MPKs de los otros tres grupos. Las evidencias sugieren que los miembros del grupo D están involucrados en la señalización ante estrés de tipo biótico (He et al., 1999; Schoenbeck et al., 1999). Las MPKs que pertenecen a los Grupos A y B poseen un dominio CD conservado a través de la evolución en la extensión C-terminal (Tanoue et al., 2000). El dominio CD funciona como un sitio de anclaje para las MAPK cinasas, las fosfatasas y los sustratos de las MPKs. Este dominio contiene la secuencia de aminoácidos [LH][LHY]Dxx[DE]xx[DE]EPxC (en donde x representa cualquier aminoácido) que incluye dos residuos ácidos adyacentes (D y E), cruciales para la interacción con un grupo de aminoácidos básicos (K y R) observado en las MAPK cinasas. De manera similar, los residuos hidrofóbicos (L, H y Y) en el dominio CD se unen a los residuos (LxLxL) del sitio de anclaie en las MAPK cinasas.

El dominio CD en las MPKs del grupo C parece estar modificado o ausente en la secuencia de las MPKs del grupo D (Ichimura *et al.*, 2002). Cabe destacar que el grupo de MAPK (Ichimura *et al.*, 2002) no incluye a MHK (*Arabidopsis* Makhomologous kinase, por sus siglas en inglés) y sus homólogos (dos miembros) como MPKs, aunque incluso ellos tienen el motivo TEY en su T-loop y muestran en su secuencia un porcentaje alto de similitud con las MPKs. Las razones por las que el grupo de MAPK no las incluyó son: i) MHK muestra un alto porcentaje de similitud, tanto con las MPKs como con las cinasas tipo CDC2, ii) no se conocen hasta ahora las características bioquímicas de MHK y iii) las secuencias de MHK carecen del dominio CD observado en la mayoría de las MPKs. Sin embargo Jonak *et al.* (2002) reportaron a MHK y sus homólogos como un quinto grupo entre las MPKs.

ta liniculato coi las MAPK ciname, clasifica a las MPRE de Aviologante en doi sentage para las MAPK closeses, las fosfeitantes y da susteprise de à e MPIGs. Falle

For an investigation of the MPHs deligning C particle addition modificiation of automatic in the succession delian MPHs deligning (column) at al., 20021 Calcy reseltance que el gruppi de MAPK ((childrene et el., 2002) no fractuye a MPHs (del microbio) estimatihomologica formede pas auto legite en inglés) y sub homologies (des microbios) estimat.



Figura 1.2. Árbol filogenético y estructura de las proteínas cinasas activadas por mitógenos de plantas. Se muestra la organización de dominios funcionales y motivos incluyendo el motivo de fosfonilación (TxY) de cada una. Para identificar la especie de origen de cada MPK, un acrónimo que refiere a cada especie se incluye antes del nombre de cada proteína: As, Avena sativa; At, Arabidopsis thaliana; Ca, Capsicum annuum; Car, Cicer arietinum; Ee, Euphorbia esula; Ib, Ipomoea batatas; Ms, Medicago sativa; Nt, Nicotiana tabacum; Os, Oryza sativa; Pa, Prunas armeniaca; Pc, Petroselinum crispum; Ph, Petunia × hybrida; Ps, Pisum sativum; Ta, Triticum aestivum; Zm, Zea mays. (Tomado de Ichimura et al., 2002).

Función de las MAP cinasas

Con base en los datos hasta ahora citados, puede deducirse que las MAP cinasas fungen como mediadores intracelulares de información, ya que se transportan del citoplasma al núcleo y viceversa. Entre sus sustratos se encuentran diversos tipos de factores de transcripción. En consecuencia, las MAP cinasas representan el enlace mecanístico entre la transferencia de información al interior de la célula y la respuesta transcripcional en el núcleo (Hirt, 2002). Además de fosforilar sustratos localizados en el citoplasma, la activación de las MAP cinasas promueve su transporte y transferencia hacia el núcleo, y por lo tanto, la modulación de los factores de transcripción que conduce a alteraciones en la expresión génica de forma estímulo-dependiente (Treisman, 1996; Wilkinson y Millar 1998).

Las MAP cinasas y la señalización ante estímulos extracelulares

Aunque las MAP cinasas originalmente fueron asociadas con procesos de diferenciación y de re-entrada al ciclo celular (ERKs), ahora se sabe que también participan en la transducción de una amplia variedad de señales extracelulares, entre las que destacan diferentes tipos de estrés, como el hídrico (p38, HOG1) (Brewstwer et al., 1993; Han et al., 1994), el mecánico (JNK1) (Kyriakis et al., 1994) y el osmótico (Pöping et al., 1996).

Se ha demostrado que las MAP cinasas de plantas forman parte del mecanismo de percepción de fitoreguladores como las auxinas (Mizoguchi *et al.*, 1994; Kovtun *et al.*, 1998), el etileno (Ecker, 1995) y las giberelinas (Huttly y Phillips, 1995), y que están relacionadas con la protección contra el daño mecánico (Seo *et al.*, 1995), el frío y la desecación (Monroy *et al.*, 1993; Jonak *et al.*, 1996), y el estrés osmótico (Pöping *et al.*, 1996). Estudios recientes muestran claramente que las cascadas en que participan las MAP cinasas son uno de los puntos de convergencia después de la percepción de diversos patógenos y de productos derivados de ellos (Yang *et al.*, 2001).

Aunque los genes que codifican MAP cinasas en plantas han sido clonados por homología funcional (Covic y Lew, 1996), la demostración de su activación *in vivo* e *in vitro* ha sido caracterizada universalmente mediante el ensayo de cinasa en gel. Esta herramienta experimental ha permitido la identificación de la actividad de MAP cinasa en células de tabaco (Mizoguchi *et al.*, 1994), en protoplastos de cebada (Knetsch *et al.*, 1996) y en hojas de alfalfa (Bogre *et al.*, 1997). Empleando esta metodología se han clonado dos MAP cinasas de *Nicotiana tabacum* que son activadas como consecuencia de herida (Zhang y Klessig, 1998b) y por la adición exógena de ácido salicílico, una molécula mediadora de los sistemas generales de defensa en las plantas (Zhang y Klessig, 1997).

En el CICY se ha determinado, mediante esta estrategia, que la actividad de MAP cinasa se modifica ante la presencia de aluminio en cultivos celulares de *Coffea arabica* L. (Arroyo-Serralta *et al.*, 2004) y que su actividad se reduce en cultivos de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* cuando estos son expuestos al frío y a condiciones de inanición (Islas-Flores *et al.*, 2004).

Lo anterior confirma que, al menos una parte de los integrantes de la familia de las MAP cinasas, está involucrada en la señalización frente al estrés biótico así como al abiótico y representa, probablemente, uno de los puntos de convergencia en la intrincada red de señalización celular que participa en la respuesta de defensa (Zhang y Klessig, 2001). (**Figura 1.3**).



Figura 1.3. Convergencia de varios estímulos en la vía de transducción de las MAP cinasas. La cascada de las MAP cinasas está implicada en la señalización que conlleva a respuestas de defensa de plantas que están bajo diversos tipos de estrés biótico y abiótico, incluyendo invasión por patógenos, herida, alta salinidad, alta o baja osmolaridad, temperaturas extremas, sequía, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), ozono y radiación ultravioleta (UV). Moléculas señalizadoras que participan en la defensa como el acido salicílico y la sistemina también activan a las MAP cinasas. (Tomado de Zhang y Klessig, 2001).

Señalización de estímulos de tipo biótico (ataque de patógenos)

Diversas líneas de investigación sugieren que el reconocimiento, por parte de las plantas, de patógenos potenciales o productos derivados de ellos (inductores), es seguido por una cascada de señalización intracelular que da lugar a reacciones de defensa, tales como la acumulación de ROS o explosión oxidativa (Apostol *et al.*, 1989; Jabs *et al.*, 1997), el reforzamiento de la pared celular y la respuesta hipersensible, lo que conduce a la muerte celular localizada en los sitios

de infección (Hammond-Kosack y Jones, 1996; van Loon, 1997; Baker et al., 1997; Fritig et al., 1998). Las respuestas de defensa también incluyen la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con el ataque de patógenos (proteínas PR) y la síntesis de fitoalexinas (Nurnberger et al., 1994; Hahn, 1996; Ryals et al., 1996; Sticher et al., 1997; van Loon, 1997; Fritig et al., 1998). Por otra parte, se ha observado en diversos modelos, que la inducción de estas respuestas de defensa es, en muchos de los casos, el resultado de la interacción entre productos derivados de los patógenos (inductores) y receptores vegetales (Meskiene y Hirt, 2000). A partir de esta observación, gran parte de la investigación se ha encaminado a elucidar los componentes de las vías de señalización que participan en la inducción de las respuestas de defensa. Ahora se sabe que los cambios en los patrones de fosfoproteínas, las proteínas G, los flujos de iones, la homeostasis del calcio y la formación de especies reactivas de oxígeno desempeñan papeles importantes en la señalización (Yang et al., 1997). Diversas evidencias han demostrado que los cambios rápidos en los patrones de fosforilación de proteínas nucleares, citoplásmicas y de membrana son producidos por inductores (Grab et al., 1989; Dietrich et al., 1990; Farmer et al., 1991; Felix et al., 1991; Bolwell, 1992; Viard et al., 1994) y que en muchos casos, estos cambios son dependientes de la presencia de Ca⁺⁺ y revertidos tras la eliminación del inductor (Grab et al., 1989. Dietrich et al., 1990; Suzuki y Shinshi, 1995).

Inicialmente, con la evidencia sobre los cambios en el estado de fosforilación de proteínas en células tratadas con inductores, y que la eliminación de estos cambios podía lograrse con inhibidores de proteínas cinasas, fue posible postular que las señales producidas por los inductores eran transducidas vía cascadas de proteínas cinasas en células vegetales, aún cuando no se conociera la identidad ni la función de tales proteínas (Suzuki y Shinshi, 1995); lo anterior se apoyó con el reporte de que la fosforilación de proteínas era necesaria para la activación de los genes de defensa en células de tabaco tratadas con un inductor fúngico (Suzuki et al., 1995). Así, el primer trabajo que describió la participación de las MAP cinasas en la transducción de señales ante la percepción de inductores fue el reportado por Suzuki y Shinshi (1995). En dicho trabajo se observó que el tratamiento de células de tabaco con un inductor derivado de las paredes celulares del oomiceto Phytophtora infestans ocasiona una activación rápida y transitoria de una cinasa de 47 kDa. Esta activación se observó por el aumento en la capacidad del polipéptido de 47 kDa para fosforilar los residuos de serina y/o treonina de la proteína básica de mielina (MBP); además, el inhibidor de proteínas cinasas, estaurosporina y el bloqueador de los canales de calcio, el ion Gd3+, inhibieron la activación de la proteína cinasa de 47 kDa. Con base en estos resultados se concluyó que esta proteína cinasa, con todas las características de una MAP cinasa, podría formar parte de la vía de la transducción de la señal generada por el inductor.

Actualmente, líneas de investigación sugieren que la vía de las MAP cinasas es activada por inductores de diferente naturaleza, y que la cascada de las MAP cinasas está asociada con la inducción de las respuestas de defensa (Jonak *et al.*, 2002). En células en suspensión de alfalfa, cuatro MAP cinasas (SIMK, MMK2, MMK3 y SAMK) son activadas por el inductor de origen fúngico "YE" (yeast elicitor) y
por inductores específicos presentes en "YE" [quitina, ergosterol, glucano β -(1,3)], pero no por un glicopéptido derivado de la invertasa de levadura (Cardinale *et al.*, 2000). Hasta ahora, no se ha identificado otro estímulo externo que active a MMK2 y MMK3, en tanto que SIMK y SAMK son activadas por varios tipos de estrés abiótico (Jonak *et al.*, 2002). Recientemente, el mecanismo de activación de estas cuatro cinasas fue elucidado, encontrándose que dos MAPK cinasas de alfafa, SIMKK y PRKK, activan a diferentes MAP cinasas en respuesta al inductor "YE": SIMKK activa SIMK y MMK3, mientras PRKK activa SIMK, MMK3 y SAMK (Cardinale *et al.*, 2002). En este trabajo los autores suginieron que una MAPK cinasa aún no definida es responsable de la activación de MMK2 por el inductor fúngico.

En células en suspensión de tabaco, el ácido salicílico (SA), un metabolito secundario que juega un papel importante en la señalización ante el ataque de patógenos y es capaz de activar diversas respuestas de defensa en plantas (Yang et al., 1997), activa, de manera temporal, a una MAP cinasa de 48 kDa, designada como SIPK (SA-induced proteín kinase) (Zhang v Klessig, 1997), SIPK v otra MAP cinasa de 42.8 kDa, designada como WIPK (wounding-induced protein kinase), se activan al tratar células en suspensión de tabaco con diferentes inductores como la parasiticeína, criptogeína y un inductor derivado de las paredes celulares del oomiceto patogénico Phytophthora parasitica (Seo et al., 1995; Zhang y Klessig, 1998; Zhang et al., 1998; Lebrun-Garcia et al., 1998). Por otro lado, células de tabaco que expresan el gen de resistencia de tomate Cf-9, responden a la proteína Avr9. activándose dos MAP cinasas, una de 46 kDa v la otra de 48 kDa. identificadas como WIPK y SIPK, respectivamente, mediante el uso de anticuerpos específicos (Romeis et al., 1999). Estos resultados sugieren que las MAP cinasas desempeñan un papel como intermediarios en las respuestas de defensa que involucran la interacción específica de raza o especie "gen a gen". En este modelo, tanto SIPK como WIPK fueron activadas, en células tratadas con Avr9, de una forma dependiente de Cf-9. Asimismo, el gen wipk aumentó su expresión por el tratamiento, aunque no se observó acumulación de la proteína (Romeis et al., 1999). Además de que SIPK es activada por un inductor de origen oomicético y SA, esta cinasa, al igual que WIPK, se activan al infectar plantas de tabaco con el virus del mosaico del tabaco (TMV) de forma dependiente del gen N (Zhang y Klessig. 1998a). Asimismo, se ha observado que la infección con TMV ocasiona una elevación de los niveles del transcrito de WIPK, y que esta acumulación precede a un incremento de la proteína, lo cual precede a la activación de WIPK (Zhang y Klessig, 1998a). Estos resultados sugieren que la activación de WIPK por TMV requiere, además de la fosforilación (modificación post-traduccional), de la transcripción de novo y de la traducción (Meskiene y Hirt, 2000). Contrario a lo encontrado con SIPK, la activación de WIPK es independiente de SA, va que la activación de WIPK inducida por TMV no se alteró en líneas de tabaco transgénicas que expresaban el gen NahG y en las cuales las respuestas de defensa mediadas por SA, estaban bloqueadas (Gaffney et al., 1993; Zhang y Klessig, 1998a). Por otro lado, Yang et al. (2001) presentaron evidencia de que una MAPK cinasa, nombrada NtMEK2, que está involucrada en las respuestas de defensa, puede activar SIPK y WIPK. En este trabajo la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de

NtMEK2 indujo la muerte celular, de manera similar a la que ocurre en la respuesta hipersensible (HR); este fenómeno fue precedido por la activación endógena de SIPK y WIPK. Además, se observó la expresión, dependiente de la cascada NtMEK2-SPK/WIPK, de los genes *hmgr* (que codifica a la hidroximetil glutaril-CoA reductasa) y *pal* (que codifica a la fenilalanina amonio liasa) (Yang *et al.*, 2001), enzimas clave en la vía de biosíntesis de una gran cantidad de metabolitos secundarios, entre ellos las fitoalexinas y el SA. Por otra parte, mediante el silenciamiento génico inducido por el virus PVX (VIGS), (Jin *et al.*, 2003) se demostró que la supresión de los tres componentes conocidos de la vía NtMEK2-SPK/WIPK disminuye la resistencia, dependiente del gen N, de plantas de tabaco ante el TMV. Esta evidencia, junto con el hecho de que tanto SIPK como WIPK son activadas por el TMV en una manera dependiente de la interacción específica gen a gen, permite concluir que la vía NtMEK2-SPK/WIPK puede jugar un papel positivo en la resistencia mediada por el gen N, posiblemente a través de la regulación de la muerte celular en la respuesta hipersensible.

Además de los inductores de origen fúngico o viral, los inductores bacterianos "harpins" también activan una cinasa tipo MAPK en tabaco (Adam *et al.*, 1997), que es idéntica a SIPK (Hoyos *et al.*, 1998).

Usando cultivos de células en suspensión de Arabidopsis como modelo, se observó que el inductor bacteriano de origen proteináceo "harpin" (derivado de Pseudomonas syringae pv. syringae) activa a las MAP cinasas AtMPK4 y AtMPK6 (Desikan et al., 1999; Desikan et al., 2001) y que tanto el inductor de origen eubacteriano flo22 (un péptido derivado del dominio más conservado de la proteína flagelina), como los inductores de origen fúngico xilanasa (del hongo Trichoderma viride) y fragmentos de quitina, junto con inductores de origen vegetal (oligogalacturónidos), inducen la activación de AtMPK6 (Nühse et al., 2000). Por otro lado la inactivación mediante transposones de otra MAP cinasa de A. thaliana, MPK4, produio la mutante mpk4 que, de manera inesperada, mostraba una mayor resistencia a patógenos, además de resistencia sistémica adquirida (SAR) encendida de manera constitutiva, elevados niveles de SA y la expresión constitutiva de genes relacionados a patogénesis (genes PR) (Petersen et al., 2000). Estudios con doble mutantes indicaron que la expresión de SAR en la mutante mpk4 es dependiente de elevados niveles de SA, lo sugiere que MPK4 es un regulador negativo de las respuestas de defensa mediadas por SA (Figura 1.4). Por el contrario, las respuestas ante estrés de tipo abiótico, como elevada salinidad o choque térmico, no se alteraron en la mutante mpk4, y respondieron de manera normal ante diferentes fitoreguladores. Sin embargo, los genes regulados por ácido jasmónico (JA) PDF1.2 y THI2.1 no se indujeron en la mutante mpk4 después del tratamiento con jasmonato de metilo (MeJa), lo que indicaba que MPK4 participa en la expresión génica mediada por JA.

Otro ejemplo, en el que la casada de las MAP cinasas al parecer regula de manera negativa a las respuestas de defensa, se observa en la mutante *edr1* que contiene una mutación en un posible gen de MAPKK cinasa que perteneciente a la subfamilia CTR1 (Frye *et al.*, 2001). EDR1 pertenece al grupo de las MAPKK cinasas tipo Raf, y también funciona en la resistencia ante patógenos, por ejemplo

contra el hongo Erysiphe cichoracearum. La mutante edr1 fue aislada durante la búsqueda de mutantes con elevada resistencia a patógenos y codifica una proteína truncada sin el dominio de cinasa de EDR1. Aunque en ausencia del patógeno, las respuestas de defensa no se inducen en la mutante edr1, su inducción ocurre más rápidamente en la mutante que en las plantas silvestres, lo que sugiere que EDR1 es también un regulador negativo de las respuestas de defensa (Figura 1.4) (Frye et al., 2001). En este contexto, es probable que ante el ataque de un patógeno ocurran dos eventos señalización para inducir las respuestas de defensa en plantas: uno está encaminado a inhibir reguladores negativos, tales como EDR1, y el otro, está encaminado a activar reguladores positivos (Bent, 2001; Frye et al., 2001, Tena et al., 2001). La cascada de MAP cinasas en A. thaliana, activada por el péptido flo22, componente de la flagelina, es un ejemplo en el se activan reguladores positivos. Asai et al. (2002), combinaron un enfogue genético que identificó al gen FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE2) como un posible receptor de la proteína flagelina, con un ensayo de expresión temporal con diversas MAPKK cinasas, MAPK cinasas y MAP cinasas para examinar los papeles de los componentes de la vía de MAP cinasas en la respuesta de defensa. Los resultados del trabajo colocan a AtMPK3 y AtMPK6 por abajo de las MAPK cinasas AtMKK4 y AtMKK5, y a la MAPKK cinasa AtMEKK1 por abajo del receptor FLS2 (Figura 1.4)

A second second second second second and second se second sec



Figura 1.4. Representación esquemática de las vías de MAP cinasas involucradas en las repuestas de defensa en A. thaliana. La mutante MAPK *mpk4* y la mutante MAPKKK *edr1* muestran elevada resistencia ante el ataque de patógenos, indicando que regulan de manera negativa la respuesta ante los patógenos. La percepción del inductor peptídico de origen bacteriano fig22 por el receptor FLS2, que tiene con un dominio intracelular de cinasa y un extracelular de regiones ricas en leucina, origina la activación de la cascada de MAP cinasa, que consiste de MEKK1, MKK4/5 y MPK3/6, seguido por la inducción transcripcional de WRKY22/29. (Tomado de Jonak *et al.*, 2002).

Asai et al. (2002) sugieren que los objetivos blanco de la vía de MAP cinasa son dos factores de transcripción de la familia WRKY (WRKY22 y WRKY23). La sobreexpresión temporal con AtMEKK1 truncada, así como de AtMPKK4 y AtMPKK5 o con WRKY29 confieren resistencia a hojas de *A. thaliana* a la infección por el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* o el patógeno fúngico *Botrytis* cinerea (Asai et al., 2002). Hasta la fecha no se sabe si el receptor FLS2 activa AtMEKK1, si AtMEKK1 interactúa con y activa específicamente a AtMKK4 y a AtMKK5, y cómo AtMPK3 y AtMPK6 están conectados con los factores de transcripción WRKY22 y WRKY23.

Sustratos de las MAP cinasas

Con respecto a los sustratos de las MAP cinasas de plantas, hasta hace poco no se conocían sus identidades. Se creía que entre ellos figuraban factores de transcripción, dado que la evidencia experimental de su transporte hacia el núcleo. una vez activadas, sugerían este hecho (Jonak et al., 2002). Un de los primeros estudios fue hecho en pereiil, en donde un inductor derivado del oomiceto Phytophthora sojae activó a una MAP cinasa (ERMK) en células en suspensión, y la proteína subsecuentemente se transportó al núcleo (Ligterink et al., 1997). Adicionalmente, la percepción del inductor peptídico de origen bacteriano flo22 por el receptor FLS2 en A. thaliana, origina la activación de la cascada de MAP cinasa, que consiste de MEKK1, MKK4/5 y MPK3/6, seguida por la inducción transcripcional de WRKY22/29 (Asai et al., 2002). Recientemente se reportó que una MAP cinasa de arroz (BWMK1) fosforila a un factor de transcripción, OsEREBP1. La MAP cinasa tiene en su dominio catalítico el motivo de fosforilación TDY, en lugar del motivo más común, TEY, y además, tiene un dominio C-terminal extendido, el cual es esencial para su actividad de cinasa y su transporte al núcleo (Cheong et al., 2003). En este caso, se encontró que la MAP cinasa fosforila a OsEREBP1 (el cual se une a la caja GCC (AGCCGCC) de varios promotores de genes PR), lo que provoca un aumento en la afinidad in vitro del factor a este elemento en cis del ADN. Mediante ensavos de co-expresión temporal de BWMK1 y OsEREBP1 en protoplastos de Arabidopsis, se observa una elevación de la expresión del gen reportero β-glucuronidasa guiado por la caja GCC. Además, en plantas de Nicotiana tabacum que sobreexpresan a BWMK1, se observó la expresión de varios genes PR a niveles más altos que en las plantas silvestres. lo cual redundó en una elevada resistencia a patógenos (Cheong et al., 2003). Por otra parte, en células de tabaco se encontró que el silenciamiento de genes, que codifican a las MAP cinasas NTF6/NRK1 o a las MAPK cinasas MEK1/NQK1, mediante VIGS, atenuaban la resistencia al TMV mediada por el gen N. También se determinó que esta resistencia estaba comprometida en plantas en las cuales la expresión de los factores de transcripción WRK1-WRK3 y MYB1 estaba disminuida (Liu et al., 2004). Lo anterior confirma que estos factores de transcripción podrían estar regulados por la cascada de las MAP cinasas. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión constitutiva de NtMEK2 indujo la muerte celular y que este fenómeno fue precedido por la activación endógena de SIPK y WIPK. Además, se observó la expresión, dependiente de la cascada NtMEK2-SPK/WIPK, de los genes hmgr y pal (Yang et al., 2001). Para identificar el o los factores de transcripción involucrados en la activación de estos genes, Kim y Zhang (2004) utilizaron el ensayo del cambio en la movilidad en gel usando extractos nucleares en plantas que sobreexpresaban a NtMEK2 constitutivamente activa. Ellos observaron un fuerte incremento en la actividad de unión a la caja W, no dependiente de la fosforilación, y un incremento en la

expresión de genes WRKY. Estos resultados sugirieron que el incremento en la actividad de unión a la caja W después de la activación de SIPK/WIPK es el resultado de la activación genes WRKY y que la cascada NtMEK2-SPK/WIPK está involucrada en la expresión de genes que van desde factores de transcripción hasta genes de defensa más abajo en la ruta de señalización durante las respuestas de defensa. (Kim y Zhang, 2004) Por último, mediante ensayos de doble híbrido se identificó al substrato de MPK4 en *A. thaliana*, MKS1. Además, mediante la misma técnica se determinó que MKS1 interactúa con los factores de transcripción WRKY25 y WRKY33. Mediante ensayos *in vitro* se demostró que estos factores de transcripción que MKS1 puede funcionar como una proteína adaptadora de MPK4 a sus sustratos WRKY25 y WRKY33.

a deletable of the model whereas all wooden blocking out to be were and splaulity a further model and satisfies on animation a banking and construction and you if the elements of family proving on the following day

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Si en las plantas, la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos es una de las vías de transducción de señales que se activa después de la percepción de patógenos o productos derivados de ellos, entonces, la exposición de callos de cocotero al inductor quitosano ocasionará la transcripción de los genes y/o modificará actividades de MAP cinasa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la adición de quitosano en concentraciones que promueven respuestas de defensa en callos de cocotero, induce la expresión de los genes y/o modifica actividades de MAP cinasa.

Objetivos Particulares

- 1. Clonar secuencias de ADNc de MAP cinasas de cocotero.
- Analizar la expresión diferencial de ARN mensajeros de MAP cinasas en callos de cocotero, en ausencia de inductor y en presencia de quitosano en concentraciones que promueven respuestas de defensa.
- Detectar y analizar actividades putativas de MAP cinasa en callos de cocotero, en ausencia y en presencia del inductor.
 - 3.1 Determinar la actividad de cinasa in vitro.
 - 3.2 Determinar si la(s) actividad(es) detectadas corresponden a actividades de MAP cinasa mediante ensayos de Inmunodetección e Inmunoprecipitación empleando anticuerpos específicos dirigidos contra MAP cinasas activadas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi M., Fukuda M. and Nishida E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. EMBO J. 18:5347-5358
- Adam A. L., Pike S., Hoyos M. E., Stone J. M., Walker J. C. and Novacky A. (1997). Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol*. 115:853-861
- Alessi D. R., Saito Y., Cambell D. G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall C. J. and Cowley S. (1994). Identification of the sites of MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74^{raf-1}. *EMBO J.* 13:1610-1619
- Alvarez M. E., Pennel R. I., Meijer P. J., Ishikawa A., Dixon R. A. and Lamb C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92:773-784
- Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N. H. T., Zhu S., Qiu J-L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M-A, Nielsen H. B., Hirt H., Somssich I., Mattsson O. and Mundy J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* 24:2579-2589
- Apostol I., Heinstein P. F. and Low P. S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90:109–116
- Arabidopsis Genome Initiative, The (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408:796–815
- Arroyo-Serralta G. A., Kú-González A., Hernández-Sotomayor S. M. T. and Zúñiga-Aguilar J. J. (2004). Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiol. Biochem.* 43:27–35
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M. and Sheen J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977-983
- Ashburner G. R. (1994). Characterization, collection and conservation of *Cocos nucifera* L. in The South Pacific. PhD thesis. Univ. of Melbourne, Australia, pp 75
- Baber M. S., Bertram R. E. and Ride J. P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:3-12
- Baker B., Zambryski P., Staskawics B. and Dinesh-Kumar S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733
- Bateman A. and Bycroft M. (2000). The structure of a LysM domain from E. coli membrane bound lytic murein transglycosylase D (MltD). J. Mol. Biol. 299:1113-1119
- Baureithel K., Felix G. and Boller T. (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitin fragments and a nod factor of *Rhizobium. J. Biol. Chem.* 269:17931-17938

- Bent A. F (2001). Plant mitogen-activated protein kinase cascades: negative regulatory roles turn out positive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:784-786
- Bestwick C. S., Brown I. R., Bennett M. H. R. and Mansfield J. W. (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. Plant Cell* 9:209-221
- Birkeland N. K. (1994). Cloning, molecular characterization, and expression of the genes encoding the lytic functions of lactococcal bacteriophage phi LC3: a dual lysis system of modular design. *Can. J. Microbiol.* 40:658-665
- Bögre, L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H. and Heberle-Bors E. (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11:101–113
- Bögre L., Ligterink W., Meskiene I., Barker P. J. and Heberle-Bors E. (1997). Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9:75-83
- Boller T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46:189-214
- Bolwell G. P. (1992). A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultured cells of French bean. *Phytochemistry*. 31:4081-4086
- Bonas U. and Lahaye T. (2002). Plant disease resistance triggered by pathogenderived molecules: refined models of specific recognition. Curr. Opin. Microbiol. 5:44-50
- Brewster J. L., De Valoir T., Dwyer N. D., Winter E. and Gustin M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760-1763
- Brown G. C., Hoek J. B. and Kholodenko B. N. (1997). Why do protein kinase cascades have more than one level? *Trends Biochem. Sci.* 22:288
- Calderini O., Bögre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E. and Wilson C. (1998). A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. J. Cell Sci. 111:3091–3100
- Canagarajah B. J., Khokhlatchev A., Cobb M. H. and Goldsmith E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90:859-869
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T. and Hirt H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. J. Biol. Chem. 275: 36734-36740
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F. and Hirt H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 14: 703-711
- Chandra S., Martin G. B. and Low P. S. (1996). The Pto kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:13393-13397

- Cheong Y. H., Moon B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Kim M. C., Kim I. H., Park C. Y., Kim J. C., Park B. O., Koo S. C., Yoon H. W., Chung W. S., Lim C. O., Lee S. Y. and Cho M. J. (2003). BWMK1, a Rice Mitogen-Activated Protein Kinase, Locates in the Nucleus and Mediates Pathogenesis-Related Gene Expression by Activation of a Transcription Factor. *Plant Physiol.* 132:1961–1972
- Conrath U., Domard A. and Gauss H. (1989). Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 8:152-155
- Córdova I. (2000). Estudio de la distribución intraplanta y dispersión del amarillamiento letal en el cocotero mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, pp 28
- Covic L. and Lew R. R. (1996). Arabidopsis thaliana cDNA isolated by functional complementation shows homology to serine/threonine protein kinases. Biochim. Biophys. Acta 1305:125-129
- Del Pozo J. C. and Estelle M. (1999). Function of the ubiquitin-proteosome pathway in auxin response. *Trends Plant Sci.* 4:107-112
- Desikan R., Clarke A., Atherfold P., Hancock J. T. and Neil S. J. (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defense responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta* 210:97-103
- Desikan R., Hancock J. T., Ichimura K., Shinozaki K. and Neil S. J. (2001). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. Plant Physiol. 126:1579-1587
- Dietrich A., Mayers J. E. and Hahlbrock K. (1990). Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. J. Biol. Chem. 265:6360-6368
- Dixon R. A., Harrison M. J. and Lamb C. J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32:479-501
- Dixon R. A. and Lamb C. J. (1990). Molecular communication in the interactions between plants and microbial pathogens. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41:339-367
- Doke N., Miura Y., Sanchez L. M., Park H-J., Noritake T., Yoshokawa H. and Kawakita K. (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense. *Gene* 179:45-51
- Dollet M. (1999). Conventional and molecular approaches for detection and diagnosis of plant diseases: application to coconut. In: Oropeza C., Verdeil J. L., Ashburner G. R., Cardeña R. and Santamaría J. M. (Eds.) Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 35. Current Advances in Coconut Biotechnology. Kluwer Academic Press, The Netherlands, pp 163-182
- Domínguez S. (1998). Logros de investigación del cocotero en México. 1ra. Reunión Nacional de Palma de Cocotero. Acapulco, Guerrero, México, pp 35-45
- Domínguez C. E., López J. I., Castillo R. y Ruíz P. (1999). EL COCOTERO Cocos nucifera L. Manual para la producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Num. 6. Tabasco, México, pp 132

- Ecker J. R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268:667-675
- Ellis J., Dodds P. and Pyor T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:278-284
- Farmer E. E., Moloshok T. D., Sacton M. J. and Ryan C. A. (1991). Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. J. Biol. Chem. 266:3140-3145
- Felix G., Grosskopf D. G., Regenass M. and Boller T. (1991). Rapid changes of protein phosphorilation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8831-8834
- Frison E. A., Putter C. A. J. and Diekmann M. (Eds.) (1993). FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of coconut germplasm. FAO/IBPGR, Rome, Italy pp 10
- Fritig B., Heitz T. and Legrand M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. Curr. Opin. Immunol. 10:16-22
- Frye C. A., Tang D. and Innes R.W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:373-378
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H. and Ryals J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754–756
- Garrington T. P. and Johnson G. L. (1999). Organization and regulation of mitogenactivated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:211-218
- Gartner A., Nashmyth K. and Ammerer G. (1992). Signal transduction in Saccharomyces cerevisiae requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. Genes Dev. 6:1280-1292
- Glazebrook J. (1999). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. Curr. Opin. Plant Biol. 2:280-286
- Gonzalez F. A., Raden D. L. and Davis R. J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. J. Biol. Chem. 266:22159-22163
- Grab D., Feger M. and Ebel J. (1989). An endogenous factor from soybean (*Glicine max.* L.) cell cultures activates phosphorylation of a protein which is dephosphorylated *in vivo* in elicitor-challenged cells. *Planta* 179:340-348
- Grosskopf D. G., Felix G. and Boller R. (1990). K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors in vivo and their microsomal protein kinase in vitro. FEBS Lett. 275:177-180
- Gustin M. C., Albertyn J., Alexander M. and Davenport K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast Sccharomyces cerevisiae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1264-1300
- Hadwiger L. A., Ogawa T. and Kuyama H. (1994). Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7:531-533
- Hahn M. G. (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. Ann. Rev. Phytopathol. 34:387-412

Hammond-Kosack K. E. and Jones J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791

- Hammond-Kosack K. E., Urban M., Baldwin T., Daudi A., Rudd J., Keon J., Lucas J., Maguire K., Kornyukhin D., Jing H., Bass C. and Antoniw J. (2004). Plant pathogens: how can molecular genetic information on plant pathogens assist in breeding disease resistant crops. Wheat Pathogenesis Programme, Plant-Pathogen Interactions Division, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK pp 27
- Han J., Lee J. D., Bibbs L. and Ulevitch R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811
- Hanks S. K., Quinn A. M. and Hunter T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52
- Hardie D. G. (1999). Plant protein serine threonine kinases: classification and functions. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:97-131
- Harries, H. C. (1978). The evolution, dissemination and classification of Cocos nucifera L. Bot. Rev. 44:265-319
- Harries, H. (2001). Centre for information on coconut lethal yellowing (CICLY) http://www.cicy.mx/dir acad/cicly/main.html
- He C., Fong S. H. T., Yang D. and Wang G-L. (1999). BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:1064–1073
- He Z., Wang Z. Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P. and Chory J. (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. Science 288:2360-2363
- Hernández R. F. (1990). Variabilidad del germoplasma de palma de coco, Cocos nucifera L. en el Trópico Mexicano. In: Robert M. and Zizumbo D. (Eds.) La problemática del amarillamiento letal del cocotero en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, pp 123-137
- Hirt H. (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:2405-2407
- Hirt H. (2002).A new blueprint for plant pathogen resistance. Nature Biotech. 20:450-451
- Hocher V., Verdeil J. L., Rival A. and Hamon S. (1999). Application of *in vitro* techniques to the conservation and propagation or coconut palms. In: Oropeza C., Verdeil J. L., Ashburner G. R., Cardeña R., Santamaría J. M. (Eds.) Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 35. Current Advances in Coconut Biotechnology. Kluwer Academic Press, The Netherlands, pp 267-278
- Howard F.W. (1983). World distribution and possible geographical origin of palm lethal yellowing disease and its vectors. FAO Plant Protection Bulletin 31:101-113.
- Hoyos M. E., Zhang S., Johal G. S., Klessig D. F., Hirt H., Pike S.M. and Novacky A. J. (1998). Is harpin-activated protein kinase related to salicylic acid- or fungal elicitor-induced kinases? *Plant Physiol. Suppl.*:46–47

- Hu X. and Reddy A. S. (1997). Cloning and expression of a PR-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol. Biol.* 34:949-959
- Hunter T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the ying and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236
- Huttly A. K. and Phillips A. L. (1995). Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinases and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 27;1043-1052
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T. and Shinozaki K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. Plant J. 24:655–665
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang Z., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y. and Walter J. C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7:301-308
- INIFAP (1997). Datos básicos de los cultivos más importantes en Veracruz y Tabasco. Documento. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Golfo Centro, pp 73
- Innes R. W. (2001). Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense. Trends Plant Sci. 6: 392-394
- Islas-Flores I., Zúñiga-Aguilar J. J., Rodríguez-Zapata L. C., Carrillo-Pech M., Baizabal-Aguirre V. M., Minero-García Y. and Hernández-Sotomayor S. M. T. (2004). MAP kinase-like activity in transformed *Catharanthus roseus* hairy roots varies with culture conditions such as temperature and hypo-osmotic shock. *Plant Physiol. Biochem.* 42:65-72
- Jabs T., Dietrich R. A. and Dangl J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. Science 273:1853-1856
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K. and Scheel D. (1997). Elicitorstimulated ion fluxes and O²⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4800–4805
- Jackson A. O. and Taylor C. B. (1996). Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* 8:1651-1668
- Jacobs D., Glossip D., Xing H., Muslin A. J. and Kornfeld K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. Genes Dev. 13:163-175
- Jin H., Liu Y., Yang K-Y., Kim C. Y., Baker B. and Zhang S. (2003). Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant Journal* 33:719-731
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterik W., Barker P. J., Huskisson N. S. and Hirt H. (1996). Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 93:11274-11279

Jonak C., Ökrész L., Bögre L. and Hirt H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:415-424

- Kauss H., Jeblick W. and Domard A. (1989). The degree of polymerization and Nacetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharantus roseus*. *Planta* 178:385-392
- Kendra D. F. and Hadwiger L. A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8:276-281
- Khokhlatchev A. V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E. and Cobb M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93:605-615
- Kim Y. S., Lee J. H., Yoon G. M., Cho H. S., Park S. W., Suh M. C., Choi D., Ha H. J., Lui J. R. and Pai H. S. (2000). CHRK1, a chitinase related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol.* 123:905-915
- Kim C. Y. and Zhang S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *The Plant Journal* 38:142-151
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E. and Silva H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:8849-8855
- Knetsch M. L. W., Wang M., Snaarjagalska B. E. and Heimovaaradijkstra S. (1996). Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase-activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8:1061-1067
- Kovtun Y., Chiu W-L., Tena G. and Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:2940–2945
- Kovtun Y., Chiu W-L., Zeng W. and Sheen J. (1998). Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395:716-720
- Kuchitsu K., Kikuyama M. and Shibuya N. (1993). N-acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 174:79-81
- Kuchitsu K., Kosaka H., Shiga T. and Shibuya N. (1995). EPR evidence for generation of hydroxyl triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188:138-142
- Kyriakis J. M., Banerjee P., Nikolakaki E., Bai T., Rubie E. A., Ahmad M. F., Avruch, J. and Woodgett J. R. (1994). The stress-activated kinase subfamily of c-jun kinases. *Nature* 369:156-160
- Lamb C. and Dixon R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:251-275
- Lam E., Kato N. and Lawton M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853

- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A. and Pugin A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* 15:773-781
- Lee F. S., Hagler J., Chen Z. J. and Maniatis T. (1997). Activation of the IκBα kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 88:213-222
- Legendre L., Heinstein P. F. and Low P. S. (1992). Evidence of participation of GTPbinding proteins in elicitation of rapid oxidative burst in cultured soybeans cells. J. Biol. Chem. 267:20140-20147
- Lenormand P., Sardet C., Pages C., L'Allemain G., Brunet A. and Pouyssegur J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblast. J. Cell Biol. 122:1079-1088
- Lesney M. S. (1989). Growth responses and lignin production in cell suspensions of Pinus elliottii 'elicited' by chitin, chitosan or mycelium of Cronnartium quercum f.sp. fusiforme. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19:23-31
- Ligterink W., Kroj T., Nieden U. z., Hirt H. and Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276:2054-2057
- Liu Y.; Schiff M. and Dinesh-Kumar S. P. (2004). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 38:800-809
- Low P. S. and Merida J. R. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant.* 96:533-542
- Loy T. H., Spriggs M. and Wickler S. (1992). Direct evidence for human use of plants 28,000 years ago: starch residues on stone artifacts from the northern Solomon Islands. Antiquity 66:898-912
- Martin G. B. (1999). Functional analysis of plant disease genes and their downstream effectors. Curr. Opin. Plant Biol. 2:273-279
- McDowell J. M. and Dangl J. L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25:79-82
- Meskiene I. and Hirt H. (2000). MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.* 42:791-806
- Millner P. A. (2001). Heterotrimeric G-proteins in plant cell signaling. New Phytol. 151:165-174
- Mizoguchi T., Gotoh Y., Nishida E., Yamaguchi-Shinozaki N., Iwasaki T., Kamada H. and Shinozaki K. (1994). Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5:111-122
- Mizoguchi, T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K. and Shinozaki K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 765–769

Monroy A. F., Castonguay Y., Laberge S., Sarhan F., Vezina L. P. and Dhindsa R. S. (1993). A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol.* 102:873-879

Morris P. C. (2001). MAP kinase signal transduction pathways in plants. New Phytol. 151:67-89

Mueller M. J. (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant.* 100:653-663

Munnik, T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A. and Hirt H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20:381–388

Nühse T., Peck S. C., Hirt H. and Boller T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J. Biol. Chem.* 275:7521-7526

Numberger T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W. R., Hahlbrock K. and Scheel D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449–460

Odjakova M. and Hadjiivanova C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. Bulg. J. Plant Physiol. 27:101-109

Oropeza C. and Zizumbo D. (1997). History of lethal yellowing in Mexico. In: Eden Green S. J., Ofon F. (Eds.) International Workshop on lethal yellowing-like disease of coconut, Elmina, Ghana. Natural Resources Institute, U. K., pp 20-26

Oropeza C., Zizumbo D. y Piña J. (1998). Amarillamiento letal. Gaceta Protege (Pemex) No. 6, pp 3-5

Parker J. E., Schulte W., Hahlbrock K. and Scheel D. (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f.sp. glycinea elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:19-27

Parrotta J. A. (1993). Cocos nucifera L. Coconut, coconut palm, palma de coco. LA: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. New Orleans, pp 152

Payne D. M., Rossomando A. J., Martino P., Erickson A. K., Her J. H., Shabanowitz J., Hunt D. F., Weber M. J. and Sturgill T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). EMBO J. 10:885-892

Pennell R. I. and Lamb C. (1997). Programmed cell death in plants. Plant Cell 9:1157-1168

Persley G. F. (1992) Replanting the tree of life. C.A.B. International, Wallingford U. K., pp 9-10

Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B. and Mundy J. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell 103:1111–1120

- Pierce R. B. and Ride J. P. (1982). Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. *Physiol. Plant. Pathol.* 20:119-123
- Piffanelli P., Devoto A. and Schulze-Lefert P. (1999). Defense signaling pathways in cereals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:295-300
- Pöping B., Gibbons T. and Watson M. D. (1996). The Pisum sativum MAP kinase homologue (PsMAPK) rescues the Saccharomices cerevisiae hog1 deletion mutant under conditions of high osmotic stress. Plant Mol. Biol. 31:355-363
- Posas F. and Saito H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. Science 276:1702-1705
- Printen J. A. and Sprague G. F. (1994). Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* 138:609-619
- Ren D., Yang H. and Zhang S. (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis. J. Biol. Chem.* 277:559-565
- Ren Y-Y and West C. A. (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (Oryza sativa L.) by chitin. Plant Physiol. 99:1169-1178
- Richberg M. H., Aviv D. H. and Dangl J. L. (1998). Dead cells do tell tales. Curr. Opin. Plant Biol. 1:480-485
- Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D. F., Hirt H. and Jones J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11:273-287
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willitis M. G., Molina A., Steiner H. Y. and Hunt M. O. (1996).Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819
- Sakamoto K., Tada Y., Yokozeki Y., Akagi H., Hayashi N., Fujimura T. and Ichikawa N. (1999). Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. *Plant Mol. Biol.* 40:847-855
- Samosir Y., Godwin L. and Adkins S. (1999). The use of osmotically active agents and absisic acid can optimize the maturation of coconut somatic embryos. In: Oropeza C., Verdell J. L., Asburner G. R., Cardeña R., Santamaría J. M. (Eds.). Current plant science and biotechnology in agriculture. Kluwer Academic Publishers, pp 341-353
- Schaeffer H. J., Catling A. D., Eblen S. T., Collier L. S., Krauss A. and Weber M. J. (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281:1668-1671
- Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M. and Wisman E. (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis. Plant Cell 13:113–123
- Scheel D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction Curr. Opin. Plant Biol. 1:305-310
- Schoenbeck M. A., Samac D. A., Fedorova M., Gregerson R. G., Gantt J. S. and Vance C. P. (1999). The alfalfa (*Medicago sativa*) TDY1 gene encodes a

mitogen-activated protein kinase homolog. Mol. Plant Microbe Interact. 12:882-893

- Seo S., Okamoto M., Seto H., Ishizuka K., Sano H. and Ohashi Y. (1995). Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. Science 270:1988-1991
- Serger R., Ahn N. G., Posada J., Munar E. S., Jensen A. M., Cooper J. A. Cob M. H. and Krebs E. G. (1992). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activators(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. J. Biol. Chem. 267:14373-14381
- Shibuya N., Kaku H., Kuchitsu K. and Maliarik M.J. (1993). Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. FEBS Lett. 329:75–78
- Shiu S. H. and Bleecker A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. Sci. STKE 113:RE22
- Shuiling M. and Harries H. C. (1994). The coconut palm in East Africa 1. East African Tall. Princes 38:4-11
- Somssich I. and Hahlbrock K. (1998). Pathogen defense in plants –a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3:86-90
- Song W. Y., Wang G. L., Chen L. L., Kim H. S., Pi L-Y, Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W. X., Zhu L. H., Fauquet C. and Ronald P. (1995). A receptor kinaselike protein encoded by the rice disease resistance gene Xa21. *Science* 270:1804-1806
- Sticher L., Mauch-Mani B. and Metraux J. P. (1997). Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 35:235-270
- Suzuki K., Fukuda Y. and Shinshi H. (1995). Studies on elicitor-signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 36:281-289
- Suzuki K. and Shinshi H. (1995). Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7:639-647
- Suzuki K., Yano A. and Shinshi H. (1999). Slow and prolonged activation of p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol.* 119:1465-1472
- Tanoue T., Adachi M., Moriguchi T. and Nishida E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2:110-116
- Taufikkurahman L. (1993). Coconut statistical Yearbook 1992. Asian and Pacific coconut community, pp 2
- Tena G., Asai T., Chiu W. L. and Sheen J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:392-400
- Treisman R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. Curr. Opin. Cell Biol. 8:205-215
- van Loon L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesisrelated proteins. *Eur J. Plant Pathol.* 103:753–765

- Viard M-P., Martin F., Pugin A., Ricci P. and Blein J-P. (1994). Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 104:1245-1249
- Volmat V., Camps M., Arkinstall S., Pouysségur J. and Lenormand P. (2001). The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. J. Cell Sci. 114:3433-3443
- Walker-Simmons M., Hadwiger L. and Ryan C. A. (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110:194–199
- Walker-Simmons M. and Ryan C. A. (1984). Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves. Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. *Plant Physiol.* 76:787–790
- Wang X., Zafian P., Choudhary M. and Lawton M. (1996). The PR5K receptor protein kinase from Arabidopsis thaliana is structurally related to a family of plant defense proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2598-2602
- Ward G. and Brookfield M. (1992). The dispersal of the coconut did it float or was it carried to Panamá? *Journal of Biogeography* 19:467-480
- Whitmarsh A. J. and Davis R. J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23:481-485
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B. and Johnson G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Phys. Rev.* 79:143-180
- Wilkinson M. G. and Millar J. B. A. (1998). SAPKs and transcription factors do the nucleocytoplasmic tango. *Genes Dev.* 12:1391–1397
- Wojtaszek P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. 322:681-692
- Wrzaczek M. and Hirt H. (2001). Plant MAP kinase pathways: how many and what for? Biol. Cell 93:81-87
- Wurgler-Murphy S. M. and Saito H. (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* 22:172-176
- Xing T. and Jordan M. (2000). Genetic engineering of plant pignal transduction mechanisms. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:309-318
- Xu S. and Cobb M. H. (1997). MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 272:32056-32060
- Yamaguchi T., Yamada A., Hong N., Ogawa T., Tadashi I. and Shibuya N. (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell* 12:817-826
- Yang K. Y., Lui Y. and Zhang S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:741-746

- Yang Y. O., Shah J. and Klessig D. F. (1997). Signal perception and transduction in defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639
- Yuasa T., Ichimura K., Mizoguchi T. and Shinozaki K. (2001). Oxidative stress activates AtMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol*. 42:1012–1016
- Zhang S., Du H. and Klessig D. F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitins from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10:435-449
- Zhang S. and Klessig D. F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9:809-824
- Zhang S. and Klessig D. F. (1998a). Resistance gene N-mediated *de novo* synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7433-7438
- Zhang S. and Klessig D. F. (1998b). The tobacco wounding-activated mitogenactivated protein kinase is encoded by SIPK Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7225-7230
- Zhang S. and Klessig D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci. 6:520-527
- Zhang S., Lui Y. and Klessig D. F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitins. *Plant J.* 23:339-348

Zhang J., Zhang F., Ebert D., Cobb M. H. and Goldsmith E. J. (1995). Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* 3:299-307

- Zheng C. F. and Guan K. L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* 13:1123-1131
- Zhou J., Tang X., Federick R. and Martin G. (1998). Pathogen recognition and signal transduction by the Pto kinase. *J. Plant Res.* 111:353-356
- Zizumbo D. (1996). Coconut history in México. Genetic Resources and Crop Evolution 43:505-519
- Zizumbo D. and Harries H. C. (1990). Variedades y disponibilidad de germoplasma de Cocos nucifera L. en México. In: Robert M. and Zizumbo D. (Eds.) La problemática del amarillamiento letal del cocotero en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, pp 103-123
- Zwerger K. and Hirt H. (2001). Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biol. Chem.* 382:1123–1131

- Yang Y. O., Etun J. and Keasalg D. F. (1997). Signal protection and barreduction in defense misponeet. Genes Dev. 11:1623–1633
- Yuasa T., Iommura K., Mizogoofii T and Shinozaki K. (2001). Oxidative stress ectivates AMPKS, an Arabidopsis homologue of MAP shales. Plant Call Physiol. 42 1012–1010
- Zhang S., Du H. and Klessig D. F. (1998). Activation of the lobacco SIP knase by both a call (well-derived carbohydrate elicitor and purified proteineeous elicities from Phytophthere sop. Plant Cell 10:435-449.
- Zhang S. and Klossig D. F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kC MAP sonasa in tolutico. Plant Call 9:809-824
- Zhang S. and Klessig D. F. (1968a). Resistance gans N-mediated dr. www synthesis and activision of a tobarco mitogen-activitied protein kinese by tobaccu mease yous intection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 7433-7438
- Zhang S and Klessig D F (1998b), The tobacco woulding-activated mitogenactivated protein kinase is encoded by BIPK Proc. Null. A and Sci. USA 95:7225-7230
- Zhang E and Klossug D. P. (2001), MAPK cascades in plant definite signaling. Timods Plant Sci 6:520-527
- Energi E. Lui Y and Klessig D. F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation strong the induction of call death by fumal elicities. Phys.J. 23:339-348
- Zhang J., Zhang F., Ebert D., Cobb M. H. and Goldmith E. J. (1995). Activity of the MAP kinase ERIC is controlled by a flexible surface loop. Structure 3 299-307.
- Zhang C. F. and Guan K. L. (1994). Advation of MEK family kinese requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. EMSO J. 13:(123-1131)
- Drow J., Tang X., Federick R. and Martin G. (1998). Pathogen moogh ion and algorith transduction by the Pto Kinase. J. Plant Ros. 111:353-356
- Southba D (1996) Coconut history in Maxico, Genetic Resources and Crop Evolution 43:505-519
- Actimited D and Himmin H C. (1990) Variadaides y disocnibitated de gemooplasme de Cocos matiene L en México. In: Robert M and Zozumbe D. (Edit.) La problemàtica del amartitamianto letal del cocolerto en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, Múxico, pp. 103-123.
- Zwerger K and Hirt H (2001) Recent advances in plant MAP Knase gnalling Blot Chem, 382 1123-1131

Capítulo II

Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of Cocos nucifera L.

Gabriel Lizama-Uc*, Iván A. Estrada-Mota*, María Goretty Caamal-Chan, Ramón Souza-Perera, Carlos Oropeza-Salín, Ignacio Islas-Flores and José Juan Zúñiga-Aguilar

*Both authors contributed equally to this work.

This chapter was published in Physiological and Molecular Plant Pathology (2007) 70:130-141

KEYWORDS

Cocos nucifera L., differential display, chitosan, plant-pathogen interaction.

ABBREVIATIONS

MAPK, mitogen-activated protein kinase; MBP, myelin basic protein; AOX, mitochondrial alternative oxidase; SA, salicylic acid; MeJA, methyl jasmonate; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; AC, activated charcoal; TTC, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride; dp, degree of polymerization; SN, supernatant; RT, room temperature.

ABSTRACT

As the study of coconut defense responses against pathogenic microorganisms is hampered by the absence of suitable model systems, we investigated if imbibition of coconut calli with chitosan could be used *in vitro* to simulate the molecular interactions that occur with pathogens. Our results showed that calli imbibition with 10 mg·mL⁻¹ chitosan caused the accumulation of hydrogen peroxide, and stimulated a β -1,3-glucanase activity with an Rf near 0.1. In addition, in-gel kinase assay and specific immunoblotting showed that a ~46 kDa MAPK-like protein was activated shortly after elicitation and remained in this state for at least 80 min. Chitosan addition also differentially modified the expression of some genes, whose DNA sequence showed high similarities to receptor-like kinases (RLKs), *Verticillium*-like protein, and mitochondrial alternate oxidase 1b. Addition of salicylic acid to the calli also modified transcript abundance for these genes, while methyl jasmonate did not seem to influence their expression, implying that they could be involved in defense responses. These results strongly suggest that elicitation of coconut tissues cultivated *in vitro* constitutes a suitable alternative to characterize

both biochemical and molecular interactions that occur between the coconut palm and its associated pathogens.

1. INTRODUCTION

Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is an ecologically and economically important species in the tropics. Unfortunately, this palm is subject to attack by several disease-producing agents, including viruses [1], viroids [2], mollicutes [3], protozoa [4], fungi [5], and nematodes [6]. Some diseases become epidemic, e.g., in the recent years, the "Atlantic Tall" variety has been almost totally eliminated from the coasts of the Yucatan Peninsula and its abundance diminished along the Gulf of Mexico because of the Lethal Yellowing (LY) disease [7]. Even though there are many epidemiological studies for this and other coconut diseases, the basic physiology of coconut-pathogen interaction is poorly understood. In addition, there are no data regarding the coconut's biochemical resistance/susceptibility to pathogens, nor have the genes involved in the establishment of disease resistance been identified. Some factors that traditionally restrict these analyses include the coconut's long life cycle, the large size of the whole palm, and the lack of an efficient *in vitro* propagation system.

In vitro plant tissue cultures have shown its feasibility as alternative models to the study of intact plants, as they maintain the basic physiology to respond to the addition of both elicitors [8] and signaling intermediates [9] that induce the expression of genes involved in the defense against plant pathogens. In this way, *in vitro* elicitation of defense responses using general elicitors have been successfully applied to several plant species including *Oryza sativa* [10], *Hordeum vulgare* [11], *Lycopersicon peruvianum* [12], *Pinus sylvestris* [13], etc., and could be attempted in coconut. Unfortunately, working with *in vitro* tissue cultures of coconut and other palms has proven to be extremely difficult, to our knowledge only cell suspension cultures from other palms like *Elaeis guineensis* Jacq. [14] and *Phoenix dactylifera* L. have been established [15].

In spite of this, protocols for coconut regeneration from *in vitro* embryogenic calli have been optimized recently with the use of activated charcoal [16,17]. Thus, *in vitro* coconut calli culture has emerged as a potential model to gain insights into the coconut-pathogen interactions. As the use of *in vitro* tissue cultures is a reasonable way to work aseptically with susceptible or endangered plant species, the main goal of this study was to evaluate whether elicitation of coconut calli could be a suitable alternative to study plant defense mechanisms, including the activation of signaling cascades and the induction of defense-related genes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant materials and treatments

Calli from Cocos nucifera L., var. "Atlantic Tall" were cultured in vitro according to Chan et al. [16]. Three-month-old calli were used in all experiment

treatments, which were repeated at least three times with three replications each. To determine the optimal chitosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) concentration for elicitation, calli were vacuum infiltrated (650 mm Hg, negative pressure) for 20 min with different concentrations of chitosan (0, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg·mL⁻¹), then total proteins were extracted at different periods (0, 4, 12, 16 and 24 h after treatment) and activity of β -1,3-glucanases was evaluated as described below. The activation of MAP kinases was evaluated after calli were vacuum infiltrated for 20 min with control buffer or 10.0 mg·mL⁻¹ chitosan, then total proteins were extracted at different periods (0, 5, 10, 20, 40, 60, 70, and 80 min), and MBP-kinase activity was determined as described below.

To evaluate the effects of elicitation on gene expression, calli were exposed for 20 min to different concentrations of either chitosan (10.0 mg·mL⁻¹), salicylic acid (SA) (0, 5, 50, and 500 mM) or methyl jasmonate (MeJA)(0, 50, and 500 μ M). After these periods, calli were rinsed with control buffers and incubated further for 2 and 4 h at room temperature (RT), and then total RNA was extracted, pooled and analyzed by reverse northern blotting as described below. For corroboration of the gene expression patterns, two negative controls were applied: first, "untreated" calli were neither vacuum infiltrated nor exposed to any solution (labeled "U" in Figs. 2.7 and 2.8); second, "control" calli were vacuum-infiltrated for 20 min with the correspondent control buffers (labeled "C" in Figs. 2.7 and 2.8).

Chitosan stock solution was prepared according to Benhamou and Thériault (1992) [18], and the chitosan working solutions were prepared from this stock after adjusting the pH at 5.5 using 2.5 N NaOH. Dilutions of SA (Sigma) were prepared from a 500 mM stock solution prepared in water. MeJA stock solution (50 mM) was prepared in ethanol and working solutions were obtained by final dilution in 1% (v/v) ethanol.

2.2 Protein extraction

Coconut calli that were subjected to the different chitosan treatments were frozen in liquid nitrogen and homogenized in 1 mL of extraction buffer per g of tissue (50 mM HEPES-Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1 μ M aprotinin, 1 μ M leupeptin, 5 mM DTT, 20% transcinnamic acid, 20% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)). Cell extracts were centrifuged at 19 500 × g for 30 min at 4 °C. The supernatant (SN) was recovered, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used. The protein concentration in the samples was measured by the method of Bradford [19], using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

2.3 β-glucanase assays

β-glucanase assays were conducted according to Pan *et al.* [20]. Briefly, protein extracts (35 µg) from calli exposed to different chitosan treatments were fractionated by native polyacrylamide gel electrophoresis. After a 5 min wash with 0.05 M sodium acetate, gels were incubated for 1 h at 40 °C in the same solution supplemented with 13.3 mg mL⁻¹ laminarin (SIGMA); then enzymatic activity was

revealed by addition of 0.075% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) in 1M NaOH. Gels were heated in a microwave oven for 10 s and photographed. Software from a Kodak EDAS 290 system was used to determine the relative band intensities.

2.4 Quantification of hydrogen peroxide production

Coconut calli were vacuum-infiltrated for 20 min with 10 mg·mL⁻¹ chitosan, then call samples were collected at different periods (0, 2 and 4 h) and ground in homogenization with 1 mL of 10 mM 2nitrogen. After liquid morpholinoethanesulfonic acid (MES), pH 6.5, per g of tissue, samples were centrifuged at 14 000 x g for 5 min at RT, and total H2O2 was determined in the supernatant with a modification of the procedure described by Messner and Boll [21]. Briefly, 200 uL of supernatant were quickly mixed at RT with freshly prepared reaction buffer (10 mM MES, pH 6.5; 20 µM phenol red; 10 ng mL¹ horseradish peroxidase (SIGMA)) in a final volume of 1 mL. The reaction was stopped after 3 min by addition of 20 µL NaOH (0.5N). H2O2 molar concentration in samples was determined by measuring the absorbance decrement at 558 nm resulting from the H₂O₂-dependent peroxidase-catalyzed oxidation of phenol red (SIGMA). As control, production of H2O2 was evaluated in a mixture of supematants pooled from "untreated" and "control" calli, generated as described above. Every experimental point was repeated independently three times, with three calli each. attrative the pH at 6.6 Using 2.5 N MpDH. DB/0cmit b

2.5 In-gel kinase assays

In-gel kinase assays were conducted as described by Arroyo-Serralta et al. [22] with some modifications. Shortly, 12.5 µg of sample proteins were loaded onto 15% SDS-PAGE [23] containing 0.5 mg·mL⁻¹ MBP (Invitrogen Life Technologies), which were added to the gel just before polymerization. After electrophoresis, SDS was removed by washing the gel four times with buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 20% 2-propanol) for 30 min each at RT; the gel was then equilibrated by washing it three times in buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 5 mM βmercaptoethanol) for 30 min each at RT. Proteins were denatured with 8 M urea in buffer B for 1 h at RT, followed by an overnight re-naturation step at 4 °C in buffer B containing 0.04% tween 20 (five changes). Subsequently the gel was incubated for 60 min at RT in 20 mL of reaction buffer (40 mM HEPES-KOH pH 7.5, 1.5 mM EGTA, 1.5 mM EDTA, 5 mM DTT, 12 mM MgSO4). The gel was incubated 60 min in reaction buffer supplemented with 5 µM ATP and 2.96 MBg of [y-32P]ATP (110 TBg mmol⁻¹, Amersham Biosciences). Reaction was terminated by washing the gel with a solution containing 5% trichloroacetic acid and 1% sodium pyrophosphate. The unincorporated [y-32P]ATP was removed by washing the gel with the same solution until the washing solution was determined to contain no more radioactivity. Finally, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue, dried, and exposed to a film.

2.6 Immunoblotting

Levels of bis-phosphorylated, activated MAP kinase in protein fractions from chitosan-treated and untreated calli were determined as described by Arroyo-Serralta *et al.* [22], except for the use of anti pERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204) (Santa Cruz Biotechnology), according to the following procedure. A 12.5 µg sample of total protein was fractionated in a 15% SDS-PAGE [23]. Electrophoresed proteins were electroblotted onto PVDF (Amersham). The membrane was blocked for 1 h at room temperature in PBST buffer, pH 7.5 (10 mM monobasic sodium phosphate, 10 mM dibasic sodium phosphate, 140 mM NaCl, and 0.1% tween 20) containing 5% non-fat milk, and then washed twice (15 min each) in PBST. The membrane was incubated for 2 h at RT with primary antibodies diluted 1:3 000 with PBST, and then washed twice with PBST (15 min each). After 1 h incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:5 000 with PBST, the membrane was washed three times with PBST solution (15 min each). Positive bands were detected using a chemiluminescence method (ECL Western Blotting System, Amersham) and revealed by exposing to a film (Kodak).

2.7 RNA isolation, differential display (DD) and RT-PCR amplification

Total RNA was isolated from each sample using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. For differential display, 2 ug of total RNA from each sample (see below) were incubated with oligo-dT primer for 60 min at 42 °C; then reverse transcriptase was denatured by heating 5 min at 70 °C. PCR was carried out with 1 µL single-strand cDNA aliquots using four different. combinations of downstream (T) and upstream (P) primers (T1:P10, T6:P10, T4:P10. and T1:P1 from the Clontech Delta® Differential Display kit) under the following conditions: 94 °C 5 min. 40 °C 5 min. 68 °C 5 min. 1 cvcle: 94 °C 2 min. 40 °C 5 min. 68 °C 5 min, 2 cycles; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 68 °C 2 min, 25 cycles. For comparison of product patterns, 5 uL of PCR products were fractionated in denaturing 5% polyacrylamide/8 M urea sequencing gels in 0.5X TBE buffer, at 70W for 2.75 h. Gels were stained with silver nitrate according to the protocol of Bassam et al. [24]. Differentially abundant cDNA bands were excised from the gel and the successfully PCR-reamplified bands were ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega) and sequenced. Each sequence was subjected to BLAST comparison [25], using the NCBI WEB facility. To clearly differentiate modifications in cDNA populations produced by the chitosan treatment from those produced by the procedure itself (which includes addition of buffers and vacuum application), an aliguot of total RNA pooled from "untreated" and "control" calli (as described above) was reverse transcribed and PCR amplified as a single "control" reaction. Every RT-PCR amplification was performed twice from two independent experiments.

2.8 Effects of chitosan, SA and MeJA on gene expression

Corroboration of the DD patterns of isolated clones, and gene expression analysis in SA- and MeJA-treated coconut calli were performed by a modification of the method described by Patel *et al.* [26]. In brief, 2 µg of total RNA from four independent calli that were not vaccuum-infiltrated (U), or vacuum-infiltrated with either control buffers (C.), chitosan (Ch), salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), or from different tissues of non-elicited plantlets were reverse transcribed using oligo-dT, then each single-strand cDNA was PCR amplified with the corresponding T-P primer combination (T1:P1 for clones G1 and G2; T4:P10 for clone G1-C). The resulting double-strand cDNA populations were size fractionated by agarose gel electrophoresis, blotted to nylon membranes and hybridized separately with each digoxigenin-labeled probe with the method of Church and Gilbert [27]. Positive hybridizations were detected by enhanced chemiluminescence (CSPD[®], Roche Diagnostics).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chitosan application to coconut calli promotes the increment of a β -1,3-glucanase activity.

It has been observed that chitosan oligomers are able to activate defense in different plant species [28,29,30,31]. Therefore, our first goal was to determine whether addition of chitosan could also trigger defense responses when added to in vitro coconut calli. The "effective" concentration of chitosan has been demonstrated to be specific for the different plant models employed, ranging from ug mL⁻¹ [32,33] to mg mL⁻¹ [34,35]. In addition, specific studies directed to analyze the effects of the molecular weight of chitosan on its elicitation capacity found that lower molecular weights of 1 335 Da (6-9 dp) [34] and 5 000 Da (22-33 dp) [32] exerted the highest elicitation; so we used acid deacetylated crab shell chitosan, the dp of which was not noted, but was likely to be between 6 and 11 [36]. We cultivated coconut calli in the presence of activated charcoal (AC), and is known that when AC is added to plant tissue culture media, it can adsorb chemicals added or released to the medium reducing their effective concentration [37]. For instance, Ebert and Taylor [38] demonstrated that more than 99% of exogenous auxin was adsorbed by AC, while Nomanbhay and Palanisamy [39] found that AC interacted with chitosan, reducing its free concentration considerably. Therefore, some chemicals must be added in excess to compensate their adsorption in AC [40,41], and we speculated that relatively higher concentrations of chitosan should be applied to elicitate the coconut tissues, to circumvent the presence of activated charcoal in the culture medium. In order to determine the most effective chitosan concentration to induce a defense response, we vacuum infiltrated in vitro coconut calli with control buffer or with increasing concentrations of chitosan (0, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg mL⁻¹) for 20 min. Protein samples isolated from each treatment were then collected at different intervals (0, 4, 8, 12, 16, and 24 h). These range of concentrations were chosen because although the minor concentration we used (500 µg mL¹) is 10 fold higher than the optimal concentration observed in some reports [32], it is indeed 4 or 6 fold lower than others used in the absence of AC [18,42]. We evaluated the activation of B-1.3-glucanases, which are PR-2 group proteins that have been broadly accepted as an effective parameter of defense induction in plants [43,44]. Fig. 2.1 shows the results obtained with protein extracts obtained after 8 h treatment. We detected a

unique band of activity with an Rf value of ~0.1, which was present in the control treatment (Fig. 2.1A, lane 1). The activity of this band was not appreciably modified when elicitor was added in concentrations below 5.0 mg mL⁻¹ (Fig. 2.1A, lanes 2 and data not shown); however, the activity clearly increased more than 50% when a concentration of 10.0 mg mL⁻¹ was used (Fig. 2.1A, lane 3). Remarkably, only when we applied the highest chitosan concentration the B-1.3-glucanase activity did rise above basal levels. This effect was not due to an increment in the osmolarity as the osmotic pressure of the chitosan solution was not so different when compared with the osmolarity of buffer alone (-0.68 and -0.70 MPa, respectively). Under this chitosan concentration, the increment in B-1,3-glucanase activity from calli was detected from at least 4 h, reached a peak between 12 and 16 h, and then began to decrease by 24 h after treatment application (Fig. 2.2A, lanes 2 to 5). Since the increment in the B-1,3-glucanase activity after chitosan application strongly suggested that these elicitation conditions were adequate to set up the defense response, we decided to analyze whether the elicitation process could activate the MAP kinase pathway and also if it was able to modify gene expression.



Fig. 2.1. Effect of the chitosan concentration in the induction of β -1,3-glucanase activities in Cocos nucifera calli. Protein extracts (35 µg) isolated 8 h after calli were exposed for 20 min to different chitosan concentrations, were fractionated by native electrophoresis in a 12% polyacrylamide gel and β -1,3-glucanase activity was evaluated in the gel as described in the experimental procedures. A, a representative photograph of the activity gels; B, bars represent mean values of densitometric units ± SD of three independent experiments; C, Coomassie staining of a parallel gel.



Fig. 2.2. Effect of the chitosan incubation period in the induction of β -1,3-glucanase activities in Cocos nucifera calli. Protein extracts (35 µg) isolated at different periods after calli were exposed for 20 min to 10 mg mL⁻¹ chitosan, were fractionated by native polyacrylamide electrophoresis. Detection of β -1,3-glucanase activity was assessed as described in experimental procedures. A, a representative photograph of the activity gels; B, bars represent mean values of densitometric units ± SD of three independent experiments; C, Coomassie stairing of a parallel gel.

3.2 Addition of chitosan to coconut calli activates a 46 kDa MAPK-like protein.

Activity of β -1,3-glucanase as well as the activity of most of the PR proteins are generally regulated at the transcription level through the induction of gene expression exerted by signaling intermediates [45]. Protein phosphorylation is one of the most widely distributed covalent modifications that regulate signaling cascades, including the eukaryotic broadly conserved MAP kinase pathway [46]. With the aim of determining if MAP kinases could be involved in chitosan signaling in coconut cells, the activation of myelin basic protein (MBP) phosphorylating enzymes was explored in calli cell extracts. As illustrated in Fig. 2.3, in-gel kinase activity assays revealed the presence of two MBP-kinases of ~42 and ~46 kDa, respectively. The activity of the ~46 kDa kinase showed a slight increase after 5 min of elicitation, increased significantly by 10 min and reached a maximum by 20 min (Fig. 2.3A, lanes 6 through 8), and remained activated for at least 80 min (Fig. 2.3A, lanes 13 to 16). This activity had a much lower increase when calli were treated with chitosan control buffer (Fig. 2.3A, lanes 1 to 4 and 9 to 12). The ~42 kDa kinase activity seemed to be unresponsive to the chitosan treatment.



Fig. 2.3. Treatment with chitosan increments the activity of a ~46 kDa MAP kinase-like protein in Cocos nucifera calli. Protein extracts (12.5 μ g) isolated at different periods after calli were exposed (+) or not (-) to 10 mg mL⁻¹ chitosan, were fractionated in a 15% SDS-PAGE, then in-gel kinase assay was performed in the presence of [γ -³²P]-ATP and MBP as substrates. A, 7 h-exposed autoradiography film; B, Coomassie staining of the same gel before autoradiographic exposition; MW, prestained protein ladder broad range (BIO-RAD).

Since the MBP is not an exclusive MAPK substrate, we analyzed the same protein extracts with specific antibodies raised against the bisphosphorylated MAPK signature TEY peptide (anti pTEpY antibodies). MAPK becomes active only after both threonine and tyrosine residues in this tripeptide motif are phosphorylated [47], thus a positive immunodetection in protein extracts should reflect the existence of MAPK(s) that were activated *in vivo* [48]. Fig. 2.4 shows that anti pTEpY antibody detected a ~46 kDa band in protein extracts between 10 and 20 min after calli elicitation, and remained immunodetectable by 80 min (Fig. 2.4A, lanes 7 to 8, and 14 to 17). This ~46 kDa band was not appreciably observed in control treatments (Fig. 2.4A, lanes 1 to 4, and 10 to 13). This kinetic of activation clearly parallels the behavior of the ~46-kDa kinase activity observed in the in-gel kinase assay. It is evident the detection of three additional bands in the immunoblot. Immunodetection of these bands was persistent even after the concentration of tween 20 was

increased up to 0.6% and 1M NaCl was included in the washes. However, these bands did not display MBP-kinase activity *in vitro* (compare results in Fig. 2.3A with Fig. 2.4A), which suggested they were the result of nonspecific binding of either the primary or the secondary antibody. To discard this latter possibility, we cut two disparate extra lanes from the membrane and incubated them separately with the secondary antibody only. As can be seen in lanes 9 and 18 in Fig. 2.4A (corresponding to 20 min incubation with buffer or chitosan solution, respectively), the secondary antibody positively cross-reacted with the 3 protein bands that lack kinase activity, but did not bind to the ~46 kDa protein. This demonstrates that detection of the three "extra" bands in lanes 1 to 8, and 10 to 17 in Fig. 2.4A was the result of nonspecific recognition associated with the secondary antibody. In contrast, the ~46 kDa band is the only one recognized specifically by the anti pTEpY primary antibody.



Fig. 2.4. MAP kinase-specific antibodies cross-react with a ~46 kDa chitosan-inducible protein in Cocos nucifera calli. Protein extracts (12.5 µg) isolated at different periods after coconut calli were exposed (+) or not (-) to 10 mg mL⁻¹ chitosan were fractionated in 15% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and reacted with antibodies directed against the MAPK pTEpY motif (Santa Cruz Biotechnology). A, a representative immunoblotting result; B, Ponceau red-staining of electroblotted proteins; MW, position of prestained protein ladder broad range (BIO-RAD).

Another element that validates the specificity of the MAP kinase immunodetection is the fact that the deduced amino acid sequences from several cDNAs that we have isolated from non-elicited and chitosan-elicited coconut calli posses the TEY signature motif that distinguishes MAP kinases (EMBL acc. nos. <u>AJ555489</u>, <u>AJ555490</u>, and <u>AJ555491</u>), then it is reasonably possible that some of the encoded MAPK proteins are present in the cell extracts from both elicited and non-elicited coconut calli; furthermore, short tracks at the amino and carboxy sides of

the TEY sequence in all coconut MAP kinases are highly conserved with mammalian ERK1/2 (Fig. 2.5), which in a bis-phosphorylated state were used to generate the antibody. While we cannot yet discern which of the proteins coded by the cDNA clones are detected by the antibody, it should be remembered that MAPKs become active only after they are bis-phosphorylated in the TXY motif; thus, the anti pTEpY antibody does not detect kinase activity but "activated" enzymes. Since we found that primary antibody cross-reacted only with protein extracts obtained from chitosan-treated calli, but not with the control cell extracts, our result implied that the pTEpY epitope was present only after calli were elicitated with chitosan (Fig. 2.4A, lanes 7 to 8, and 14 to 17). This result suggested MAPK became active after the chitosan treatment, a finding that matched perfectly with the behavior displayed by the MAPK enzymatic activity (Fig. 2.3A, lanes 6 to 8, and 13 to 16).

The following observations strongly suggest that the ~46 kDa bands detected by both in-gel kinase assay and immunoblotting are the same and could correspond to a coconut MAP kinase: its recognition by a specific anti-MAP kinase antibody raised against a bis-phosphorylated motif; the capacity to phosphorylate MBP; and its rapid activation after elicitation (which is typical of classical MAP kinases). These findings are in agreement with previous results that demonstrated the activation of MAPK after chitosan elicitation in other plant species [49,50], and constitutes solid evidence that chitosan addition also promotes the activation of this signal transduction pathway in coconut calli.

	180	190	200	210	220	230
	-		!			I
AJ555489	CDLKICD	FGLARTT		VVTRWYRAPE	LLLNSSEYT	AIDVWSVGCI
AJ555490	CDLKICD	FGLARTT	ETDEMTEN	VVTRWYRAPE	LLLNSSEYT	AIDGGLVGCI
AJ555491	CDLKICD	FGLARTT	ETDEMTEN	VVTRWYRAPE	LLLNSSEYT	AIDVWSVGCN
ERK	CDLKICD	FGLARIADP	HOHTGET TE	VATRWYRAPE	IMLNSKGYT	CSIDIWSVGCI
ERKZ	CDLKICD	FGLARVAI)PI	DHDHTGFITE	VATRWYRAPE	IMLNSKGYT	SIDIWSVGCI

Fig. 2.5. Deduced amino acid sequences of MAP kinase cDNAs from *C. nucifera* share a high degree of identity with mammalian ERK1 and ERK2. Deduced amino acid sequences from three coconut cDNA clones were aligned to fragments of human ERK sequences using the MultAlin program [71]. ERK1, a fragment of the human ERK1 amino acid sequence; ERK2, a fragment of the human ERK2 amino acid sequence; *AJ555489, AJ555490*, and *AJ555491*, fragments of *C. nucifera* MAP kinase deduced amino acid sequences. Perfect matches and conserved amino acid substitutions are in red. The MAP kinase TEY specific signature is boxed.

3.3 Chitosan addition differentially modifies the abundance of transcripts in Cocos nucifera calli

As has been established, one of the major MAPK actions after being activated is to relocate to the nucleus [51] where they induce differential gene expression through activation of specific transcription factors [52]; this enables the

establishment of biochemical responses that contend with a defined extracellular environment. In order to explore if chitosan treatment also alters defense-related gene expression in the coconut calli system, we applied the RNA differential display technology (DD)[53] to compare RNA populations obtained from coconut calli exposed or not to chitosan. Since increments in the activity of β-1,3-glucanase were detected from at least 4 h after incubation and these should be the result of gene induction, we decided to evaluate changes in gene expression in the 0 to 4 h period. DD was executed with four P-T primer combinations, and results obtained with the P1 and T10 primer combination (5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACC-GTCC-3' and 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTAA-3', respectively) are shown in Fig. 2.6. Results revealed the amplification of many sharp bands that ranged between 200 and 1000 bp in control as well as in treated samples. While the amount of most bands did not change, there were several cDNA segments whose abundance was notably modified under the chitosan treatment: some were enhanced (labeled "c"). and others were repressed (labeled "b") or their concentration diminished (labeled "a"). From a total of 21 bands with observed differences in intensity, 12 were successfully PCR-reamplified and cloned, but only 8 displayed consistency with the original fragment size. Corroboration of the observed expression patterns for six probes and an analysis of their expression in plant adult tissues were made.

Ally 2.2 Linearity and an activity of MAP in the activity from C. restricts along a right segment of identify with measurable ERR's and ERR's Deduced aroun with sign with the MutAin gappine (11) ERR's a sugment of the summer ERR's around oth segments and ERR's a fragment of the furnity ERR's a sugment of the summer ERR's and ERR's a fragment of the furnity ERR's as sugment of the summer ERR's and ERR's a fragment of the furnity ERR's as sugments of the summer ERR's and ERR's a fragment of the furnity ERR's as sugments of the summer ERR's and ERR's a fragment of the furnity ERR's as sugments of the summer ERR's and ERR's a fragment of the furnity ERR's as a sugment of the summer ERR's and ERR's a fragment of the furnity ERR's as a sugment of the summer ERR's and a substance and a substantion are shown on the sum of the sum of the sum of the summer ERR's and summer and an and substantion are shown and the sum of the sum of the summer and summer and substantion are shown on the sum of the sum of the summer and summer and summer and summer and sum of the sum of the summer and summer and summer and summer and sum of the sum of the sum of the summer and summer and summer and summer and sum of the sum of the sum of the sum of the summer and summer and summer and summer and sum of the summer and summer and summer and summer and sum of the sum of the

5.1 Children addition altreaminedy modifies the alumnmony of transmission in Encode mechanics and

An her back antique to the cost of the major MMM where a law terms allow to the terms of the state of the sta





The hybridization signals confirmed the mRNA level differences predicted by the differential display (Fig. 2.7) for three clones (G1, G1-C and G2), while the remaining gave non-reproducible results (data not shown). According to these results, selected clones could be organized in two groups, one whose transcripts were initially present (G1-C, Fig. 2.7b) and two that were absent (G1 and G2: Figs. 2.7a and 2.7c, respectively) in calli grown under normal conditions. Fig. 2.7 shows that transcript levels for Clone G1 were absent in untreated calli (lane 1a), but concentrations increased in the control treatment and slightly more again when chitosan was added (lanes 3a and 2a, respectively). On the other hand, clone G2 displayed a similar behavior, it was absent in untreated calli (lane 1c) and presented a small amount of transcript when buffer was vacuum infiltrated (lane 3c), but level in calli exposed to chitosan was considerably higher (lane 2c). Since both control and chitosan treatments include vacuum infiltration, the RNA level observed in control treatments could be the result of an additional stress exerted by vacuum application. However, vacuum was applied also when samples were infiltrated with salicylic acid (SA), and there are some SA concentrations at which no modification in G1-C or G2 expression was observed with respect to the "untreated" calli (compare lane 3b with 1b, and lane 5c with 1c in Fig. 2.8). Then, it is possible that vacuum did not affect appreciably the expression of selected genes. Interestingly, the hybridization analysis revealed that G1 and G2 clones were not expressed under non-elicited conditions in differentiated plantlet organs, including roots, shoots and leaves (Fig. 2.7, lanes 4, 5, and 6), which indicates they were strictly inducible by the stress treatment. With respect to the clone expressed normally in plantlet tissues (G1-C, see Fig. 2.7), its expression was almost absent in shoots (lane 5b) and displayed a noticeable repression in the presence of chitosan (lane 2b).

As can be seen in Fig. 2.7, the control treatment also produced a minor modification in the transcript levels for some clones. This might be explained by the fact that the treatment includes vacuum application of a neutralized acid solution; in consequence, there is a possibility that these clones could be moderately induced by abiotic in addition to biotic stresses.

Equal amounts of RNA used for amplification were confirmed by visual inspection of the ribosomal RNA bands in agarose gels (Fig. 2.7e) and by RT-PCR amplification of a coconut actin transcript (EMBL acc. no. <u>AA123456</u>) (Fig. 2.7d).

(new hera) RT-PCR presents when size frequentiate and address as describes in mission and methods for DNA conservictions haven 1, 2, 2, 9, and 7, cDNA providence a constant for DNA conservictions haven 1, 2, 2, 9, and 7, cDNA providence constant RMA (posted from "untrovind" and "convert call, two tang, tense 4, 8, 8, 8 are to collect providence employed from the relation of the test, tens tang, tense 4, 8, 8, 8 are to a relative data with objective from the relation of the test, tens tang, tense 4, 8, 8, 8 and the test, test, and the relative of the test for test, tense to the test of the test with objective from the relative of the test test, tense with makenet and the test of test of test of the test of the test test and the test of the test with objective of the test of the test test test and the test of test of test of test of the test of test of the test test and the test of test of the test of test of test of the test test of the test of the test of test of test of the test of test of the test of the test of test of test of the test of test of the test of test of the test of test of test of test of the test of test of the test of the test of test of


Fig. 2.7. Expression levels of chitosan-modified transcripts in tissues of adult plant. Two µg of RNA samples isolated from different tissues were reverse transcribed and amplified by PCR with T1:P1 primer combination as described. RT-PCR products were size fractionated in 1.1% agarose gels and blotted to nylon membranes, and then hybridized individually with the isolated clones labeled with digoxigenin. a to c, autoradiographies of the hybridized membranes; d, RT-PCR amplification of a coconut transcript for actin; e, ethidium bromide staining as control of RNA concentration; U, "untreated" calli (see materials and methods); Ch, chitosan-treated calli. C, "control" calli (see materials and methods); R, root; S, stem; L, leaf.

According to a BLAST comparison [25], the "E" value suggested that DNA sequences from the three chitosan-modified clones were almost identical to Oryza sativa putative receptor-like kinase (G1, EMBL acc. no. <u>AM076489</u>), Arabidopsis thaliana alternative oxidase 1b (G1-C, EMBL acc. no. <u>AM167527</u>), and Lycopersicon esculentum disease resistance gene (G2, EMBL acc. no. <u>AM076490</u>) (Table I).

Table 1

Analysis of diffe	rentially expressed	mRNA sequences is	iolated from elicitor-t	reated coconut calli by	differential display
-------------------	---------------------	-------------------	-------------------------	-------------------------	----------------------

Clone	EMBL accession no.	cDNA size (bp)	Sequence homology	Data base match (accession no.)	E value
GI	AM076489	225	O. satira putative receptor-like protein kinase	ABA96476	3 × 10 30
GI-C	AM167527	192	A. thaliana mitochondrial alternative oxidase 1b	DQ056603	3 × 10 30
G2	AM076490	531	L. esculentum Verticillium with disease resistance gene	AF272366	6 × 10 32

3.4 Abundance of chitosan-modified transcripts are modified differentially by salicylic and jasmonic acids

It has been shown that pathogen attack can trigger at least two defense pathways, one involving SA and one involving JA and ethylene [54]. SA has been shown to play a crucial role in the induction of HR [55] and the establishment of systemic acquired resistance (SAR)[56]. The molecular mechanism by which SA could induce a defense response has been investigated principally in *A. thaliana*; in that model, SA induces SAR through the activation of NPR1 transcription factor, which in turn promotes expression of PR genes [57]. On the other hand, JA has been proposed as a signal transducer in tissue cultures incubated with pathogen elicitors [58], and was demonstrated to activate several genes including those coding defense proteins like thionin [59], and PDF [60] in a SA-independent pathway. Since PR gene expression mediated by NPR1 is a cross-talk point between the SA and JAethylene signaling pathways that confer resistance to pathogens [61], we wanted to know if the transcripts induced differentially by chitosan were also modified by SA and MeJA, which may help in understanding either they are related to defense.

C. nucifera calli were exposed to different concentrations of SA (Fig. 2.8A) and MeJA (Fig. 2.8B), then transcript levels were evaluated by reverse northern blot. Transcript abundance for clone G1 was increased with 50 mM SA (Fig. 2.8A, lane 5a); G1-C abundance decreased with all SA concentrations (Fig. 2.8A, lanes 4b to 6b); and G2 was enhanced with 500 mM SA (Fig. 2.8A, lane 6c). Transcript levels for the three clones seemed not to be affected by the addition of MeJA (Fig. 2.8B, lanes 10, 11, and 12). Notoriously, the two genes with no expression in non-induced calli or adult tissues, but actually induced by chitosan treatment (G1 and G2) were also induced by SA but not appreciably by MeJA treatments (compare Figs. 2.8A and 2.8B), whereas clone G1-C that was normally expressed in non-induced calli and adult tissues, was repressed by addition of chitosan or SA, and was not affected by MeJA as well. This behavior implies the possibility that if their gene products are involved in the coconut-pathogen interaction, they could be regulated in a SAdependent, MeJA-independent pathway. In particular, clone G1, seems to be a receptor-like kinase (RLK), a membrane integral protein that switches-on signal transduction pathways after the binding of numerous extracellular signals that include pathogen-derived molecules (i.e., Xa21D, Wang et al. [62]). The second clone. G2. has close similarity to the tomato Verticillium wilt resistance gene that codifies a membrane receptor with no apparent enzymatic activity (Ve from tomato has been proposed as the R gene responsible for gene-for-gene specific interaction with Verticillum dahliae [63]). The third clone, G1-C, whose transcript levels were

reduced by the chitosan treatment, is guite similar to A. thaliana and N. tabacum mitochondrial alternative oxidases (AOX); when expression of the corresponding soybean and pea genes is inhibited, a stimulation of the mitochondrial H2O2 production occurs, then it was proposed that this enzyme operates as a non-coupled anti-oxygen defense mechanism [64]. Also, Amirsadeghi et al. (2006)[65] demonstrated that the lack of AOX in transgenic N. tabacum was accompanied by an increase in some antioxidant defenses. In that study, the authors suggested that susceptibility to cell death from signaling molecules like SA and nitric oxide (NO) is dependent upon the steady-state cellular level of reactive oxygen species (ROS) and that AOX levels clearly contribute to this steady state. According to these reports, if the observed chitosan-mediated repression of clone G1-C in coconut calli was related to defense, it should be accompanied by an increment in ROS, which is a physiological event that allows the establishment of the defense response [66]. To verify this hypothesis, we measured the total concentration of hydrogen peroxide produced by calli in the same elicitation period (0-4 h) when reduction of G1-C expression was found. The results obtained showed that vacuum-infiltration with control buffer produced a stepwise increment in the production of total H₂O₂ (See Fig. 2.9, white columns). However, when compared to control, vacuum-infiltration with chitosan produced a much higher H₂O₂ increment (up to 3 fold) after 2h of treatment (Fig. 2.9, grey columns). The total H2O2 content in both control and chitosan treatments seemed to be equal after 4 h of infiltration. Consequently, though there is again a certain level of response when control treatments were applied, an early oxidative burst was present only after calli were infiltrated with chitosan. This result corresponded well with the chitosan- and SA-induced repression of clone G1-C, which occurred between 0 and 4h after application of treatments (compare Fig. 2.9 with Figs. 2.7 and 2.8).

statute of states in the property of the property states which the property of the property of



Fig. 2.8. Effect of SA and MeJA in the expression of the cDNAs isolated from Cocos nucifera calli. Two µg of total RNA isolated at 2 and 4 h after coconut calli were vacuuminfiltrated for 20 min with different concentrations of salicylic acid (A) or methyl jasmonate (B), were pooled for each treatment, reverse transcribed and amplified by PCR with the corresponding P-T primers. RT-PCR products were size fractionated in 1.1% agarose gels and blotted to nylon membranes, and then they were hybridized individually with each isolated clone labeled with digoxigenin. Lanes 1, 2, 7, 8 and 9, chitosan treatments as a reference; lanes 3 to 6, salicylic acid (SA) treatments; lanes 10 to 12, methyl jasmonate (MeJA) treatments; U, "untreated" calli (see materials and methods); C, "control" calli (see materials and methods); a to f, autoradiographies of the hybridized membranes. Lower panel is ethidium bromide staining as control of RNA concentration.



Fig. 2.9. Chitosan induces the production of hydrogen peroxide in Cocos nucifera calli. Concentration of total H_2O_2 in cell extracts was measured by the phenol red oxidation method [21] at 0, 2 and 4 h after application of the different treatments. Grey columns, H_2O_2 in cell extracts from calli vacuum-infiltrated for 20 min with 10 mg·mL⁻¹ chitosan; White columns, H_2O_2 in a pool of cell extracts from "untreated" and "control" calli. All experiments were repeated three times with three calli each. Results are expressed as mean value \pm SD.

In summary, the differential modification of gene expression supports the hypothesis that chitosan addition to coconut calli might be able to activate defense responses against pathogens. Research concerning the physiological and molecular relationships between the coconut palm and its associated pathogens has been traditionally overlooked due to several causes, and has focused mostly in disease diagnosis [67] or in the detection of the pathogens by means of PCR-based techniques [68,69]. In this sense, using *in vitro* tissue cultures could be a suitable alternative to study the plant-pathogen relationships at molecular and biochemical levels. The evidence obtained in this work demonstrated the activation of signal transduction intermediates (i.e. MAPK pathway), the differential expression of defense-related genes (notoriously, the suppression of AOX and the induction of Verticillium wilt resistance gene, an R gene), the induction of PR proteins (i.e. β -1,3-glucanases), and the generation of an oxidative burst as a result of chitosan addition.

To our knowledge, the results presented here identify, for the first time, a coconut signaling intermediate, or molecular product induced expressly once a pathogen-derived signal is perceived. It is well known that perception of general

elicitors can lead to the activation of broad-spectrum specific responses [70]; therefore, the model employed in this study constitutes an excellent alternative to identify and analyze signal transduction intermediates and molecular products that help the coconut palm to resist different pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Dr. Hugh Harries for the critical reading of the manuscript, and the technical assistance from Ing. José Luis Chan and M.C. Lizbeth Castro Concha. This work was supported by CONACyT 36168-B. IAEM, GLU and MGCC had CONACyT fellowships 170186, 130228, and 204985, respectively.

REFERENCES

- Rohde W, Randles JW, Langridge P, Hanold D. Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. Virol 1990;176:648–51.
- Hanold D, Randles JW. Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. Plant Dis 1991;75:330–5.
- [3] Howard FW, Barrant CI. Questions and answers about lethal yellowing disease. Principes 1989;33:163–71.
- [4] Parthasarathy MV, van Slobbe WG, Soudant C. Hartrot or Fatal wilt of palms.
 1. Coconuts (Cocos nucifera). Principes 1978;22:3–14.
- [5] Joseph T, Radha K. Role of *Phytophthora palmivora* in bud rot of coconut. Plant Dis Reptr 1975;59:1014–7.
- [6] Griffith R. Red ring disease of coconut palm. Plant Dis 1987;71:193-6.
- [7] Oropeza C, Zizumbo-Villarreal D. The history of lethal yellowing in Mexico. In: Eden-Green SJ and Ofori F, editors. Proc Int Wkshp Lethal Yellowing-like diseases of Coconut, Elmina, Ghana. 1997, p. 69–76.
- [8] Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Nelly SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. Biochem J 1998;330;115–20.
- [9] Felix G, Boller T. Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in Lycopersicon peruvianum cells. Plant J 1995;7:381–9.
- [10] Kuta DD, Gaivaronskaya LM. Ca²⁺ and reactive oxygen species are involved in the defense responses of rice callus culture to rice blast disease. Afr J Biotech 2004;3:76–81.

- [11] Maksimov IV, Cherepanova EA, Surina OB, Sakhabutdinova AR. The effect of salicylic acid on peroxidase activity in wheat calli cocultured with the bunt pathogen *Tilletia caries*. Russ J Plant Physiol 2004;51:480–5.
- [12] Stratmann J, Scheer J, Ryan CA. Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β-glucan elicitor in suspension-cultured Lycopersicon peruvianum cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:8862–7.
- [13] Shein V, Andreeva ON, Polyakova GG, Zrazhevskaya GK. Effect of pine callus elicitation by the *Fusarium* strains of various pathogenicity on the content of phenolic compounds. Russ J Plant Physiol 2003;50:634–9.
- [14] Teixeira J B, Söndahl MR, Nakamura T, Kirby EG. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. Plant Cell Tiss Org Cult 1995;40:105– 11.
- [15] Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. Plant Cell Rep 2003;21:517–24.
- [16] Chan JL, Saénz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 1998;17:515–21.
- [17] Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferrieá N, et al. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. Ann Bot 2001;88:9–18.
- [18] Benhamou N, Thériault G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Physiol Mol Plant Pathol 1992;41:33–52.
- [19] Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- [20] Pan SQ, Ye XS, Kuc J. A technique for detection of chitinase, beta-1,3glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. Phytopathol 1991;81:970–4.
- [21] Messner B, Boll M. Cell suspension cultures of Spruce (*Picea abies*): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). Plant Cell Tiss Org Cult 1994;39:69-78.
- [22] Arroyo-Serralta G, Kú-González A, Hernández-Sotomayor SMT, Zúñiga-Aguilar JJ. Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPKlike protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. Plant Physiol Biochem 2005;43:27–35.

- [23] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680–5.
- [24] Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1991;196:80–3.
- [25] Altschul SF, Gish W, Millar W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. J Mol Biol 1990;215:403–10.
- [26] Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, et al. TNFConvertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: Isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF1. J Immunol 1998;160:4570–9.
- [27] Church GM, Gilbert W. Genomic Sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:1991–5.
- [28] Kendra DF, Hadwiger LA. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. Fungal Gen Biol (Exp Mycol) 1984;8:276–81.
- [29] Conrath U, Domard A, Kauss H. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. Plant Cell Rep 1989;8:152–5.
- [30] Kauss H, Jeblick W, Domard A. The degrees of polymerization and Nacetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. Planta 1989;178:385–92.
- [31] Hadwiger LA, Ogawa T, Kuyama H. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. Mol Plant Microbe Interact 1994;7:531–3.
- [32] Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. J Plant Physiol 2005;162:937–44.
- [33] Mason ME, Davis JM. Defense response in slash pine: Chitosan treatment alters the abundance of specific mRNAs. Mol Plant Microbe Interact 1997;10:135–7.
- [34] Vasyukova NI, Zinov'eva SV, Il'inskaya LI, Perekhod EA, Chalenko GI, Gerasimova NG, et al. Modulation of plant resistance to diseases by watersoluble chitosan. Appl Biochem Microbiol 2001;37:103–9.
- [35] Klepzig KD, Walkinshaw CH. Cellular response of loblolly pine to wound inoculation with bark beetle-associated fungi and chitosan. Resch. Pap. SRS– 30. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. Asheville, NC, U.S; 2003, p. 1–9.

- [36] Pitta-Alvarez SI, Giulietti AM. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida* Effect of medium pH and growth phase. Plant Cell Tiss Org Cult 1999;59:31–8.
- [37] Pan MJ, van Staden J. The use of charcoal in in vitro culture-A review. Plant Growth Reg 1998;26:155-63.
- [38] Ebert A, Taylor HF. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell Tiss Org Cult 1990;20:165–72.
- [39] Nomanbhay SM, Palanisamy K. Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. Elect J Biotech 2005;8:43–53.
- [40] Van Winkle S, Jonson S, Pullman GS. The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. Plant Cell Rep 2003;21:1175–82.
- [41] Van Winkle SC, Pullman GS. Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. Plant Cell Rep 2005;4:201–8.
- [42] Benhamou N, Kloepper JW, Tuzun S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. Planta 1998;204:153– 68.
- [43] Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-βglucanase activity. EMBO J 1987;6:3209–12.
- [44] van de Locht U, Meier I, Hahlbrock K, Somssich IE. A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. EMBO J 1990;9:2945–50.
- [45] Rushton PJ, Somssich IE. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. Curr Op Plant Biol 1998;1:311–5.
- [46] Zhang S, Klessig DF. MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci 2001;6:520–7.
- [47] Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. Cell 1997;90:859–69.
- [48] Lee J, Klessig DF, Nürnberger T. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity, Plant Cell 2001;13:1079–93.

- [49] Holley SR, Yalamanchili RD, Moura DS, Ryan CA, Stratmann JW. Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-b radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. Plant Physiol. 2003;132:1728–38.
- [50] Hu X, Neill SJ, Fang J, Cai W, Tang Z. Mitogen-activated protein kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *Panax ginseng*. Sci China C Life Sci 2004;47:303–12.
- [51] Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y, Nishida E. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. J Biol Chem 1997;272:32642–8.
- [52] Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: A continuously variable Gene switch? Nature 2002;3:30–40.
- [53] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. Science 1992;257:967–71.
- [54] Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. Trends Genet 1995;11:101–5.
- [55] Graham TL,Graham MY. Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competenc and defense potentiation. Physiol Mol Plant Pathol 1999;55:13–20.
- [56] Durrant WE, Dong X. Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol 2004;42:185–209.
- [57] Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol 2005;43:205–27.
- [58] Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992;89:2389–93.
- [59] Becker W, Apel K. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Plant Mol Biol* 1992;19:1065–7.
- [60] Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, De Samblanx GW, Buchala A, et al. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. Plant Cell 1996;8:2309-23.
- [61] Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ et al. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonatedependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell 2003;15:760–70.
- [62] Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen L, Pi LY, et al. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines

race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. Plant Cell 1998;10:765–79.

- [63] Kawchuk LK, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, et al. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:6511–5
- [64] Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. FEBS Lett 1997;415:87–90.
- [65] Amirsadeghi S, Robson CA, McDonald AE, Vanlerberghe GC. Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. Plant Cell Physiol 2006;47;1509–19.
- [66] Appel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu Rev Plant Biol 2004:55;373–99.
- [67] Thelly TM, Mohankumar C. H⁺-ATPase as a biochemical marker for early detection of root (wilt) disease in coconut palms (*Cocos nucifera* L). Indian J Biochem Biophys 2001;38:199–02.
- [68] Harrison NA, Richardson PA, Kramer JB, Tsai JH. Detection of the phytoplasma associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. Plant Pathol 1994;3:998–08.
- [69] Córdova I, Jones P, Harrison NA, Oropeza C. In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. Mol Plant Pathol 2003;4:99–08.
- [70] Montesano M, Brader G, Palva ET. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. Mol Plant Pathol 2003;4:73–9.
- [71] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl Acids Res 1988;16:10881–90.

ace-specific recognition and is subject to adaptive evolution. Plant Cell 1998;10:785-79.

- [63] Kawotuk LK, Hachey J Lynon DR, Kulcaan F, van Rooljan G, Wataner DR, et al. Tomato Ve diaease resistance genes encode cell surface-like receptore. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:6511–6
- [64] Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA Inhibition of the alternative oxidase stimulans H₂O₂ production in plant mitochondna. FEBS Left 1997,415:87–90.
- [65] Amintedegni S, Robson CA, McDonald AE, Vanierberghe GC, Changes in plant mitochondrial electron transport after cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. Plant Cell Physiol (2006 47:1509–19)
- [B6] Appal K Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu Rev Plant Biol 2004 55:173–99.
- [87] Theily TM, Mohankumar C. H'-ATPase as a blochemical marker for only detection of root (with) disease in coconut palma (Cocos nuclives L). Indian J Blochem Blophys 2001;38:199–02.
- [68] Namson NA, Richardson PA, Kramer JB, Tsai JH. Detection of the phytoplasma associated with lethal yellowing disease of paims in Florida by polymerase chain reaction. Plant Pathol 1994;3:998–02.
- [69] Córdova I, Jones P, Harrison NA, Oropeza C. In stu PCR detection of phytoplasme DNA in embryos from coconut paims with white yellowing disease. Nol Plant Pathol 2003;4:99–08.
- [70] Montesano M, Bradar G, Palva ET. Paktogan derived elicitors. Searching for nuceptors in plants. Mol Plant Pathol 2003;4:73–6.
- [11] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchice clustering. Kuci Acids. Pres 1988;16:10881–90.

Capítulo III

Caracterización de las actividades de MAP cinasa en callos de Cocos nucifera L. inducidos con quitosano

1. INTRODUCCIÓN

Los ensayos de cinasa en gel e inmunodetección (Lizama-Uc *et al.*, 2007) permitieron establecer que, en células de callo de cocotero, una probable MAP cinasa de ~46 kDa se activa debido a la presencia de quitosano y otra cinasa de ~42 kDa, posiblemente se activa en presencia de una solución ácida (solución control). Con el fin de caracterizar la actividad de estas dos cinasas y obtener las evidencias necesarias para identificarlas, se realizaron ensayos de autofosforilación e inmunoprecipitación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la caracterización de la modificación de las actividades de MAP cinasa como respuesta al tratamiento con quitosano se utilizaron callos secundarios de *Cocos nucifera* L. variedad Alto del Atlántico (AA), de dos meses de edad, cultivados en oscuridad a 27 °C \pm 2 °C (Chan *et al.*, 1998). Estos callos se obtuvieron de la fragmentación y resiembra de un callo primario en 10 mL de medio Y3 (Eeuwens, 1976) adicionado con sacarosa (5%), gelrite (3 g L⁻¹) (Sigma) y carbón activado (2.5 g Γ^1) (Sigma) (Chan *et al.*, 1998). La concentración de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se ajustó a 0.65 mM (Sáenz-Carbonell, Tesis de Doctorado) y el pH a 5.75 antes de esterilizar el medio por 20 min, a 120 °C.

La utilización de callos secundarios provenientes de la fragmentación de un callo primario único, permitió minimizar las diferencias en respuesta que pudieran presentarse si cada callo proviniera de plúmulas independientes y por tanto, ocasionadas por la variación genética.

Preparación de la solución concentrada y la solución de trabajo de quitosano

La solución concentrada de quitosano se preparó de acuerdo al procedimiento de Benhamou y Thériault (1992), que asegura que las impurezas que pudiese contener el inductor se eliminen. Brevemente, las hojuelas de quitosano (Practical Grade from Crab Shells, Sigma) fueron pesadas (1 g) y molidas en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El polvo se lavó seis veces con agua destilada; para esto, el inductor se repartió en tubos eppendorf, a cada tubo se le adicionó agua (1:1) y la mezcla se homogeneizó en un vortex. El homogenado se centrifugó (12,000 x g) durante 8 min a 25 °C, desechándose el sobrenadante. La pastilla se secó a temperatura ambiente toda la noche y se disolvió en 50 mL de HCl 0.25 N mediante agitación vigorosa por espacio de 2-3 h. La solución de quitosano-HCl se centrifugó en tubos eppendorf durante 15 min, a 12,000 x g a 25 °C, para

sedimentar las partículas no disueltas. El sobrenadante se distribuyó en tubos eppendorf limpios y el inductor se precipitó con NaOH 2.5 N. El precipitado se sedimentó, centrifugando 20 min a 12,000 x g a 25 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó seis veces con agua destilada estéril, para eliminar las sales, dejándose secar toda la noche a temperatura ambiente. El quitosano seco se disolvió por agitación vigorosa en HCI 0.25 N, se etiquetó como "solución madre" y se guardó a 4 °C hasta su uso.

La solución de trabajo se preparó a partir de la solución concentrada. Para ello, se tomó la cantidad necesaria (de acuerdo con la concentración y con los volúmenes finales de la solución deseada) y se diluyó con HCI 0.25 N. El pH de la solución se ajustó a 5.5 con NaOH y se aforó con HCI, pH 5.5, hasta el volumen indicado.

Tratamiento de los callos con el inductor quitosano

Callos secundarios de cocotero variedad AA fueron sumergidos en una solución de quitosano (10 mg mL⁻¹, pH 5.5) durante 0, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70 y 80 min. Transcurrido el tiempo de incubación, el callo se sacó de la solución, se secó e inmediatamente se extrajo la proteína. Como tratamiento control, se sumergieron callos en una solución de HCI, pH 5.5, el tiempo equivalente a cada uno de los tratamientos.

La concentración de quitosano que se usó (10 mg mL⁻¹, pH 5.5) es la reportada para observar la máxima actividad de glucanasas (Lizama-Uc *et al.*, 2007). La actividad de estas enzimas se tomó como un marcador de la activación de las respuestas de defensa en callo de cocotero.

Extracción de proteína total

Para la extracción de proteína total, los callos tratados con el inductor y aquellos bajo el tratamiento control se pulverizaron en presencia de N₂ líquido. El polvo fino se resuspendió y homogeneizó en amortiguador de extracción [HEPES-Tris 50 mM (pH 7.5), EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, β-glicerofosfato 50 mM, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 10 mM, glicerol 10%, PMSF 1 mM, aprotinina 1µM, DTT 5 mM, leupeptina 1µM, ácido trans-cinámico 20% y PVPP 20%] a razón de 1 mL por gramo de tejido. El homogeneizado se centrifugó durante 15 min 22,000 x g a 4 ^oC, y se separó el sobrenadante (proteína soluble total). Con los extractos de proteína soluble total, se realizaron los ensayos de autofosforilación en gel y la inmunoprecipitación.

Cuantificación de proteína soluble total

La cuantificación de proteína soluble total se realizó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). Este método espectrofotométrico se basa en la unión no covalente de la forma aniónica del colorante azul de Coomassie G-250 con las proteínas. Brevemente, en tubos de ensayo independientes se mezclaron 2 µg de proteína soluble total de los callos tratados con el inductor y aquellos bajo el tratamiento control con 1 mL de reactivo de Bradford y 198 µL de agua destilada. Los tubos de reacción se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm contra el blanco (1 mL de reactivo de Bradford y 200 µL de

agua destilada). Para la determinación de las concentraciones de proteína de cada una de las muestras, las lecturas obtenidas se sustituyeron en la ecuación de la recta obtenida de una curva de calibración de 1 µg a 25 µg de proteína, en la que se empleó albúmina sérica bovina [Fracción V] (Sigma) como estándar.

Ensayo de autofosforilación en gel

Habiéndose detectado cambios en los patrones de fosforilación de proteína mediante el ensayo de cinasa en gel, el ensayo de autofosforilación en gel representó un ensayo control para determinar si las modificaciones en los patrones de fosforilación observados son debidas a la fosforilación de la proteína básica de mielina (MBP) o una autofosforilación.

Para el ensayo de autofosforilación se utilizó la misma técnica empleada para el ensayo de cinasa en gel (Mikolajczyk, 2000; Lizama-Uc et al., 2007), con la diferencia de que no se le adicionó la MBP como sustrato a la poliacrilamida. Brevemente, 25 µg de proteína total de callos no expuestos y expuestos a quitosano, se fraccionaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15 %, de acuerdo a Laemmli (1970). En carriles adyacentes se fraccionaron marcadores de masa molecular. Después de la electroforesis, se eliminó el SDS de los geles por medio de cuatro lavados (de 30 min cada uno) con el amortiguador A [Tris-HCI 50 mM (pH 8.0) y 2propanol al 20%], a temperatura ambiente. Los geles fueron equilibrados en amortiguador B [Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y β-mercaptoetanol 5 mM] durante 90 min. a temperatura ambiente. Inmediatamente, las proteínas fueron desnaturalizadas durante 1 h en el amortiguador C [urea 8 M, Tris-HCl 50 mM y β-mercaptoetanol 5 mM] a temperatura ambiente. Los geles se colocaron en amortiguador de renaturalización (amortiguador D) [Tris-HCI 50 mM (pH 8.0), ß-mercaptoetanol 5 mM y tween 20 al 0.04%] y fueron incubados a 4 °C toda la noche (realizándose cinco cambios de amortiguador). Los geles se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en la mezcla de reacción [HEPES-KOH 40 mM (pH 7.5), EGTA 1.5 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 12 mM] sin ATP, y después incubados durante 1 h a temperatura ambiente en la mezcla de reacción, adicionada con ATP 5 µM suplementado con 2.96 MBq de [y-32P] ATP (110 TBq/mmol. Amersham Biosciences). La reacción fue detenida transfiriendo los geles a una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y pirofosfato de sodio al 1%. El [y-32P] ATP que no se incorporó a las proteínas fue removido de los geles por medio de seis lavados (de 30 min cada vez) con la solución anterior. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, y se digitalizaron. A continuación, se secaron durante 36 h entre pliegos de celofán dulce, sostenidos en un bastidor de acrílico; el procedimiento es la modificación de un protocolo descrito por Bio-Rad. Brevemente, se cortaron cuadros de celofán dulce de 20 x 20 cm, los cuadros de celofán se sumergieron en agua destilada durante 5 minutos. Uno de los cuadros de celofán se extendió sobre un cuadro de acrílico de 5 mm de grosor y de 15 x 15 cm de ancho. El gel que se deseaba secar se colocó sobre el celofán extendido previamente en el cuadro de acrílico. Sobre el gel se colocó un segundo cuadro de celofán; por último se colocó un marco de acrílico de 15 x 15 cm de ancho al cual se le removió un área interna de 13 x 13 cm. La posición de los moldes de acrílico se aseguró utilizando sujetadocumentos de papelería. Los geles se dejaron deshidratar a temperatura ambiente durante 36 horas. Los geles secos se expusieron al Fosforimager y/o a una película autorradiográfica a temperatura ambiente.

Ensayo de inmunoprecipitación

El anticuerpo anti pERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204) (Santa Cruz, Biotechnology[®]), que detectó una proteína de ~46 kDa de callos de cocotero tratados con quitosano (Lizama-Uc *et al.*, 2007) fue utilizado para inmunoprecipitar MAP cinasas activadas de los extractos de proteína total correspondientes a los callos de cocotero AA sin tratar (HCI, pH 5.5) y tratados con quitosano (10 mg mL⁻¹, pH 5.5) durante 50 min, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Paso 1. Eliminación de la proteína unida inespecíficamente a la proteína G-sefarosa

50 µg de proteína total correspondiente a callos no tratados y tratados con quitosano durante 50 min, se mezclaron, en reacciones independientes, con 20 µL de proteina G-sefarosa 4 Fast Flow (Amersham) lavada previamente 3 veces con 1 mL de amortiguador de inmunoprecipitación [Tris-HCl 20 mM (ph 7.5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, tritón X-100 1%, aprotinina 2 µg mL⁻¹, leupeptina 2 µg mL⁻¹, PMSF 0.5 mM], de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La mezcla se completó a 200 µL con amortiguador de inmunoprecipitación, se incubó 1 h a 4 °C con agitación suave y se centrifugó a 12,000 x g durante 30 s. para recuperar el sobrenadante (1), utilizado para realizar el ensayo de inmunodetección. Por otro lado, a la proteína G-sefarosa recuperada se le añadieron 15 µL de amortiguador laemmli 3x y 25 µL de H₂O. La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min y se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min, para separar la proteína unida de manera inespecífica a la resina. El sobrenadante (2) se recuperó y se tomó como control de pegado inespecífico en un ensayo de inmunodetección.

Paso 2. Reacción antígeno-anticuerpo

Al sobrenadante (1) recuperado, se le añadió 1 μ g (5 μ L) de anticuerpo anti p-ERK 1/2 y se incubó a 4 ^oC durante 4 h en agitación continua.

Paso 3. Precipitación del complejo antígeno-anticuerpo

A la mezcla del paso 2, se le añadieron 20 µL de proteína G-sefarosa y se incubó a 4 $^{\circ}$ C durante 2 h en agitación continua. Se centrifugó a 12,000 x g durante 30 s. para recuperar tanto la proteína G-sefarosa como el sobrenadante (3). Al sobrenadante (3), se le añadió acetona a una concentración final de 80% y se incubó a -20 $^{\circ}$ C toda la noche para precipitar la proteína. Al día siguiente, se centrifugó a 22,000 x g durante 30 min a 4 $^{\circ}$ C. La pastilla se disolvió en 15 µL de amortiguador laemmli 3x y 25 µL de H₂O. La proteína se conservó a 4 $^{\circ}$ C hasta su uso. El complejo proteína G-sefarosa-anticuerpo anti p-ERK 1/2-antígeno se lavó 3 veces con 1 mL de amortiguador de inmunoprecipitación.

Paso 4. Disociación del complejo

Al complejo recuperado (proteína G-sefarosa-anticuerpo anti p-ERK 1/2antígeno), se le agregaron 10 μ L de amortiguador laemmli 3x y 20 μ L de H₂O; la mezcla se calentó a 95 ⁰C durante 5 min y se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min Con el sobrenadante (4) se realizaron los ensayos de inmunodetección.

Ensayo de inmunodetección en la proteína inmunoprecipitada

La proteína total, el inmunoprecipitado, el sobrenadante de la reacción de inmunoprecipitación y la proteína unida de manera inespecífica a la proteína G-sefarosa se fraccionaron mediante SDS-PAGE en geles al 15%, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). En un carril adyacente, se colocó un marcador de masa molecular.

Las proteínas separadas por electroforesis se electrotransfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF-Amersham) en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%) durante 2 h a 400 mA y 4 °C. La membrana se tiño con una solución de Rojo de Ponceau (ácido acético 5 % y colorante 0.1 %). Después de digitalizar la imagen, la membrana se destiñó. Se bloqueó 1.5 h a temperatura ambiente (TA) con amortiguador de bloqueo [BSA al 3% en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.5 (PBS), adicionado con tween 20 al 0.2 % (TPBS)]. La membrana se lavó tres veces a TA (15 min por vez) con amortiguador TPBS y se incubó a 4 °C toda la noche (12 h) con una dilución 1:3000 de anticuerpo primario p-ERK 1/2. La membrana se lavó tres veces a TA (15 min por vez) con TPBS y se incubó a TA durante 1 h en una dilución 1:5000 de anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa [goat anti-rabbit IgG HRP (Santa Cruz, Biotechnology®)]. La membrana fue lavada tres veces a TA (15 min por vez) con TPBS. La reacción de inmunodetección se reveló mediante quimioluminicencia incubando la membrana con el sustrato luminol (ECL Western Blotting System. Amersham) durante 1 min a TA v exponiéndola a una película autorradiográfica durante 6 min. a 37 °C.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayo de autofosforilación en gel

Se ha reportado que las MAP cinasas tienen la capacidad de autofosforilarse *in vitro*. Esto se ha observado en ensayos de autofosforilación, empleando MAP cinasas expresadas en *E. coli* fusionadas a residuos de histidina, a proteínas como la glutatión S-transferasa o a la proteína que une maltosa (Jonak *et al.*, 1996; Takezawa, 1999; Huang *et al.*, 2000; Xiong y Yang, 2003). Con base en lo anterior, es posible que las señales observadas en el ensayo de cinasa en gel sean consecuencia de un fenómeno de autofosforilación y no a la fosforilación propia de la MBP.

Para discernir entre estas posibilidades, se realizó el ensayo de autofosforilación en gel (Materiales y Métodos). La técnica del ensayo fue la misma que se siguió para el ensayo de cinasa en gel (Lizama-Uc *et al.*, 2007; Micolajczyk

et al., 2000); es decir, se realizó exactamente bajo las mismas condiciones, con la única diferencia de que a la poliacrilamida no se le adicionó la MBP. La autoincorporación de ³²P a la proteína de ~46 kDa se detectó mediante la exposición de los geles a películas autorradiográficas por 2, 7 y 14 días (**Figura 3.1**, sólo se muestra la película expuesta 7 días).



Figura 3.1.- Detección de proteínas cinasas que tienen capacidad de autofosforilarse in *Vitro*. (A) 25 µg de proteína total fueron fraccionados por SDS-PAGE en geles al 15% y evaluados mediante el ensayo de autofosforilación con 2.96 MBq de [γ^{-32} P]ATP (110 TBq/mmol). Los geles se expusieron por 7 días a una película autorradiográfica. Carriles 1-4, 9-12: Controles del experimento. Proteína total de callos de cocotero de la variedad AA inducidos con una solución de HCI, pH 5.5, a los tiempos indicados (minutos). Carriles 5-8, 13-16: Pruebas experimentales. Extractos proteicos de callos de cocotero variedad AA inducidos con una solución de quitosano a 10 mg mL⁻¹ pH 5.5 a los mismos tiempos que los controles. (B) Patrón de proteína total teñido con azul de Coomassie después de que los geles fueron evaluados mediante el ensayo de autofosforilación. M= Marcador de masa molecular (Biorad).

La autorradiografía mostró que, tanto en los tratamientos control como en los tratamientos con quitosano, dos cinasas de ~46 kDa y ~42 kDa autoincorporaron el fósforo radiactivo del [γ -³²P] ATP. Coincidentemente, estas dos cinasas fueron de la misma masa molecular que las cinasas detectadas en el ensayo de cinasa en gel y sus patrones de actividad fueron similares (Lizama-Uc *et al.*, 2007). Esto indica que las cinasas que fosforilaron a la MBP podrían ser las mismas que se autofosforilaron. Además, este resultado sugiere que las señales detectadas en el ensayo de cinasa en gel (**Figura 2A**, Lizama-Uc *et al.*, 2007) podrían ser no solamente resultado de la fosforilación de la MBP por parte de estas cinasas, sino también de una probable autofosforilación de estas proteínas. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la intensidad de las señales en el ensayo de autofosforilación en gel son de menor intensidad que las observadas en el ensayo de cinasa en gel, fenómeno que se observó al comparar las señales de ambas autorradiografías provenientes de películas expuestas el mismo período de tiempo (7 días) y bajo la misma temperatura (comparar las **Figuras 2A** [Lizama-Uc *et al.*, 2007] y **3.1**).

Además de las señales ya citadas, se observó una señal que parece corresponder a una cinasa de ~66 kDa. La intensidad de la señal fue muy débil, no obstante se apreció tanto en los controles como en los tratamientos. La intensidad de la señal se mantuvo constante con respecto al tiempo. Esta banda de actividad podría corresponder a una proteína que tiene capacidad de autofosforilarse, pero no tiene entre sus sustratos a la MBP, ya que no se evidenció actividad en el ensayo de cinasa en gel. Este hecho indica que la actividad asociada a esta proteína no corresponde a una MAP cinasa.

Ensayo de inmunoprecipitación

A partir de los resultados del ensayo de inmunodetección (Lizama-Uc *et al.*, 2007) se evidenció que, en callos tratados con quitosano, una proteína de ~46 kDa fue reconocida por un anticuerpo dirigido contra MAP cinasas activadas; asimismo, se hizo patente que el comportamiento mostrado por esta proteína fue muy similar al patrón de actividad de cinasa de una proteína de ~46 kDa que fosforiló a la MBP en el ensayo de cinasa en gel (Lizama-Uc *et al.*, 2007), lo que sugiere que la proteína detectada en ambos experimentos podría ser la misma.

Para determinar si la actividad de cinasa de la proteína de ~46 kDa observada en el ensayo de cinasa en gel correspondía a la proteína de ~46 kDa detectada por el anticuerpo contra MAP cinasas activadas (p-ERK 1/2) (Lizama-Uc *et al.*, 2007), una estrategia útil sería inmunoprecipitar a esta proteína con el mismo anticuerpo con el que se inmunodetectó y evaluar la actividad de cinasa de la proteína precipitada mediante el ensayo de cinasa en gel, con el fin de determinar si la proteína inmunoprecipitada posee actividad de cinasa.

Con el objetivo de determinar si el anticuerpo anti p-ERK 1/2 podría ser utilizado para inmunoprecipitar a la proteína de ~46 kDa, se efectuó un ensayo de inmunodetección con la proteína precipitada con el anticuerpo p-ERK 1/2; de tal forma que si este anticuerpo podía inmunoprecipitar a la proteína de ~46 kDa, ésta debería ser detectada en un ensayo de inmunodetección. Para ello, 50 µg de proteína total correspondiente a callos de cocotero variedad AA, sin tratar y tratados con quitosano durante 50 min, fueron evaluados mediante ensayos de inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti p-ERK 1/2. Después, el inmunoprecipitado, el sobrenadante de la reacción de inmunoprecipitación y la proteína unida de manera inespecífica a la proteína G-sefarosa, tanto del tratamiento control como del tratamiento con quitosano, fueron evaluados mediante ensayos de inmunodetección, empleando el anticuerpo anti p-ERK 1/2 (**Figura 3.2**).



Figura 3.2.- Inmunodetección de proteína inmunoprecipitada mediante el anticuerpo policional anti p-ERK 1/2 (Thr 202 /Tyr 204)/proteína G-sefarosa. 50 µg de proteína total correspondiente a callos de cocotero vanedad AA sin tratar y tratados con quitosano fueron evaluados mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti p-ERK 1/2. La proteína inmunoprecipitada fue evaluada mediante inmunodetección empleando los mismos anticuerpos. Carril 1: Marcador de masa molecular. Carril 2: Proteína total de callo tratado 50 min con HCl 0.25 N [tratamiento control (TC)]. Carril 3: inmunoprecipitado del TC. Carril 4: Sobrenadante del TC. Carril 5: Proteína adherida a la proteína G-sefarosa del TC. Carril 6: Proteína total de callo tratado 50 min con 10 mg mL⁻¹ de quitosano [tratamiento (T)]. Carril 7: Inmunoprecipitado del T. Carril 8: Sobrenadante del T. Carril 9: Proteína adherida a la proteína daherida a la proteína daherida a la proteína del TC. Carril 7: Inmunoprecipitado del T. Carril 10: 100 ng de anticuerpo anti p-ERK 1/2.

Mediante el ensayo de inmunodetección se evidenció que el anticuerpo anti p-ERK 1/2 se unió a una proteína de ~46 kDa, misma que fue inmunoprecipitada por medio de la proteína G-sefarosa. Esta proteína fue detectada por el anticuerpo anti p-ERK 1/2 (Figura 3.2, carril 7, ver flecha). Además de inmunoprecipitar a la posible MAP cinasa activada a partir de la proteína total de callos tratados con quitosano (Figura 3.2, carril 7), resultó un hecho inesperado el poder inmunoprecipitar a la misma proteína activada a partir de los extractos de proteína total de callos no inducidos (Figura 3.2, carril 3, ver flecha).

Con base en los resultados obtenidos se puede sugerir que el anticuerpo anti p-ERK 1/2 puede utilizarse para inmunoprecipitar a la proteína de ~46 kDa detectada mediante ensayos de inmunodetección (Lizama-Uc *et al.*, 2007), y para posteriormente someterla a ensayos de cinasa en gel en presencia de [γ -³²P] ATP. Si la proteína inmunoprecipitada de ~46 kDa tuviese actividad de MAP cinasa, la ubicaría dentro de esta familia de proteínas; y podría concluirse que la proteína activada debido al tratamiento de callos con el inductor quitosano es muy probablemente una MAP cinasa.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Benhamou N. and Thériault G. (1992). Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici. Physiol. Mol. Plant Pathol..* 41:33-52
- Bradford M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T. and Hirt H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. J. Biol. Chem. 275: 36734-36740
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F. and Hirt H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 14:703-711
- Cazalé A. C., Droillard M. J., Wilson C., Heberle-Bors E., Barbier-Brygoo H. and Laurière C. (1999). MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cells suspensions: towards the oxidative burst response?. *Plant J.* 19:297-307
- Chan J. L., Saénz L., Talavera C., Hornung R., Robert M. and Oropeza C. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:515–521.
- Desikan R., Clarke A., Atherfold P., Hancock J. T. and Neil S. J. (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defense responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta* 210:97-103
- Desikan R., Hancock J. T., Ichimura K., Shinozaki K. and Neil S. J. (2001). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. Plant Physiol. 126:1579-1587
- Eeuwens C. J. (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 36:23–28
- Holley S. R., Yalamanchili R. D., Moura D. S., Ryan C. A. and Stratmann J. W. (2003). Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-B radiation at the level of mitogenactivated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* 132:1728-1738
- Huang Y., Li H., Grupta R., Morris P. C., Luan S. and Kieber J. J. (2000). ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in Vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol*.122:1301-1310
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Baker P. J., Huskinsson N. S. and Hirt H. (1996). Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11274-11279
- Kroj T., Rudd J. J., Nürnberger T., Gäbler Y., Lee J. and Scheel D. (2003). Mitogenactivated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent of pathogenesis-related genes in parsley. J. Biol. Chem. 278:2256-2264

- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Ligterink W., Kroj T., Nieden U. z., Hirt H. and Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276:2054-2057
- Link V. L., Hofmann M. G., Sinha A. K., Ehness R., Strnad M. and Roitsch T. (2002). Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Physiol.* 128:271-281.
- Lizama-Uc G., Estrada-Mota I. A., Caamal-Chan M. G., Souza-Perera R., Oropeza-Salín C., Islas-Flores I. and Zúñiga-Aguilar J. J. (2007). Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 70:130-141
- Micolajczyk M., Awotunde O., Muszynska G., Klessig D. F. and Dobrowolska G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase a homolog of protein kinase ASK 1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12:165-178
- Nühse T., Peck S. C., Hirt H. and Boller T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. J. Biol. Chem. 275:7521-7526
- Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D. F., Hirt H. and Jones J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11:273-287
- Sáenz-Carbonell L. A. (1999). Desarrollo de protocolos para la regeneración de Cocos nucifera L. a través de embriogénesis somática. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, pp. 30
- Song F. and Goodman R. M. (2002). OsBIMK1, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses. *Planta* 215:997-1005
- Suzuki K. and Shinshi H. (1995). Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7:639-647
- Suzuki K., Yano A. and Shinshi H. (1999). Slow and prolonged activation of p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. *Plant Physiol.* 119:1465-1472
- Takezawa D. (1999). Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Mol. Biol.* 40:921-933
- Xiong L. and Yang Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15:745-759
- Zhang S., Du H. and Klessig D. F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitins from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10:435-449
- Zhang S., Lui Y. and Klessig D. F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitins. *Plant J.* 23:339-348

Capítulo IV

Análisis de la expresión de MAP cinasas en callos de *Cocos nucifera* L. inducidos con quitosano

1. INTRODUCCIÓN

En diferentes modelos vegetales se ha observado que la regulación de la actividad de MAP cinasa en células puede tener lugar va sea a nivel transcripcional. traduccional o por la activación o inactivación de la actividad enzimática debida a la fosforilación o desfosforilación, respectivamente (Morris, 2001). La determinación de la actividad de MAP cinasa in vitro mediante la fosforilación de un sustrato es el indicativo más directo de que un evento fisiológico en particular podría estar asociado con esta vía de transducción de señales (Morris, 2001; Zhang y Klessig, 2001). Sin embargo, algunas de las primeras evidencias de la participación de las MAP cinasas en la señalización ante diversos tipos de estrés fue la activación transcripcional del gen WIPK, producto de una herida (Seo et al., 1995). Posteriormente, se observó que el transcrito WIPK también era inducido por inductores e interacción con patógenos (Zhang y Klessig, 1998; Romeis et al., 1999; Zhang et al., 2000). Otros miembros de la misma subfamilia (Zhang y Klessig, 2001; Ichimura et al., 2002), tales como MMK4 de alfalfa (renombrado después como SAMK), MPK3 de Arabidopsis y ERMK de perejil, están regulados también a nivel de ARNm (Mizoguchi et al., 1996; Jonak et al., 1996; Bögre et al., 1997); así como sucede en trigo con TaWCK1 en respuesta a un inductor de naturaleza fúngica (Takezawa, 1999). Estos resultados sugieren que la transcripción diferencial de genes de MAP cinasas como respuesta al estrés evolucionó de manera temprana en plantas, antes de la divergencia hacia dicotiledóneas y monocotiledóneas, y puede jugar un papel importante en las respuestas de defensa en plantas (Zhang y Klessig, 2001). Los transcritos de MsTDY1 y OsBWMK1, pertenecientes a otro subgrupo o subfamilia de MAP cinasas (Zhang y Klessig, 2001; Ichimura et al., 2002) aumentan como resultado de una herida o infección por patógenos (He et al... 1999: Schoenbeck et al., 1999). En células de tabaco tratadas con elicitinas del oomiceto Phytophthora sp., tanto la activación transcripcional del gen WIPK como la activación posttraduccional de la proteína WIPK, son requeridas para el incremento en la actividad enzimática (Zhang et al., 2000). Sin embargo, la importancia o relevancia de tal regulación dual no está del todo clara.

Con base en lo anterior, se decidió analizar la expresión de genes de MAP cinasas en callos de cocotero tratados con quitosano mediante la técnica de Northern blot. Este ensayo permitirá determinar si, además de la activación de la actividad enzimática debida a la fosforilación, ocurre la activación, a nivel transcripcional, de genes de MAP cinasas en callos de cocotero inducidos con quitosano.

Para el ensayo de Northern blot se utilizó como sonda una secuencia parcial de MAP cinasa de 447 pb amplificada por RT-PCR a partir de ARN de hoja de cocotero de la variedad Alto del Atlántico (EMBL no. <u>AJ555489</u>). Esta secuencia

corresponde a una parte de la secuencia que codifica el dominio catalítico de la proteína. Al realizar un análisis de alineamiento con secuencias de MAP cinasas de otras especies vegetales se observó que esta secuencia está muy conservada entre ellas, y con las otras secuencias de cocotero amplificadas en este trabajo y reportadas al EBML (AJ555490 y AJ555491) (Capítulos V y VI). La razón por la que se utilizó una sonda con una secuencia conservada en las MAP cinasas, y no una sonda específica para una en particular, fue para detectar en la población de ARNm`s modificaciones en la expresión de algún gen de MAP cinasas como resultado del tratamiento con quitosano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para el análisis de expresión de MAP cinasas, se utilizaron callos secundarios de *Cocos nucifera* L. de dos meses de edad de la variedad Alto del Atlántico (AA) cultivados en oscuridad a 27 $^{\circ}C \pm 2 \,^{\circ}C$ (Chan *et al.*, 1998). Estos callos se obtuvieron de la fragmentación y resiembra de un callo primario en 10 mL de medio Y3 (Eeuwens, 1976) adicionado con sacarosa (5%), gelrite (3 g L⁻¹) (Sigma) y carbón activado (2.5 g L⁻¹) (Sigma) (Chan *et al.*, 1998). La concentración de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se ajustó a 0.65 mM (Sáenz-Carbonell, 1999) y el pH a 5.75 antes de esterilizar el medio por 20 min, a 120 $^{\circ}C$.

Preparación de la solución concentrada y la solución de trabajo de quitosano

La solución concentrada de quitosano se preparó según Benhamou y Thériault (1992). A partir de la solución concentrada se preparó la solución de trabajo a una concentración de 10 mg mL⁻¹, pH 5.5. El procedimiento es el mismo que se describe con detalle en el Capítulo IV de este trabajo.

Tratamiento de los callos con el inductor quitosano

Callos secundarios de cocotero variedad AA fueron sumergidos en la solución de trabajo de quitosano a tiempo 0, 1 h, 3 h y 8 h. Transcurrido el tiempo de incubación, el callo se sacó de la solución, se secó en papel absorbente, e inmediatamente, se extrajo el ARN total. Como tratamiento control, se sumergieron callos en una solución de HCI, pH 5.5, durante el tiempo equivalente a cada uno de los tratamientos.

La duración de los tratamientos fue similar a los tiempos reportados en diversos estudios, donde se han utilizado células en suspensión como modelo e inductores de naturaleza diversa, en los que se ha observado la modificación transcripcional de las MAP cinasas (Wang *et al.*, 2004; Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1999;Cheong *et al.*, 2003; Romeis *et al.*, 1999; Takezawa, 1999).

Party of whereast de Mariners had an united states and have been been and the second states of the second states and the second stat

Extracción de ARN total

El ARN total de los callos tratados con el inductor y los sujetos al tratamiento control se extrajo por el método de Herrera (2000). Brevemente, los callos sujetos a los tratamientos se pulverizaron en presencia de N₂ líquido; el polvo fino se resuspendió y homogeneizó en amortiguador de extracción (Tris-HCI 0.1 M pH 8.0. EDTA 0.2 mM. dodecil sulfato de sodio 2%) a razón de 2 mL de amortiguador por gramo de tejido. El ARN total se extrajo mediante una partición con disolventes orgánicos, adicionando a la mezcla fenol:cloroformo (1:1), empleando el mismo volumen que el utilizado de amortiguador de extracción. Esta mezcla se incubó a -70 °C durante 5 min y la fase acuosa se separó por centrifugación a 12 000 x g por 20 min. Al sobrenadante se le añadió isopropanol (1:1) y se incubó a -20 °C toda la noche. El ARN total se separó por centrifugación a 12 000 x g por 30 min. La pastilla de ARN se lavó dos veces con etanol al 75 % y se secó a temperatura ambiente durante 10 min. La pastilla se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas (Sigma), se añadieron 250 µL de LiCl 4M (para una concentración final de 2.5 M) y se incubó a -20 °C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 12 000 x g por 30 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de ARN se lavó dos veces con etanol al 75% y se secó a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez seca, la pastilla se resuspendió en agua libre de nucleasas (Sigma), se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se conservó a -20 °C hasta su análisis.

Fraccionamiento del ARN y transferencia a un soporte sólido

5 µg de ARN total de callos tratados con quitosano y de callos sujetos al tratamiento control fueron fraccionados por electroforesis en agarosa al 1.2% en condiciones desnaturalizantes (formaldehído 2.2 M en amortiguador MOPS 1X (MOPS 40 mM pH 7.0, acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM)) a 5V/cm (Sambrook, 2000). Una vez terminada la electroforesis, el gel se lavó con agua tratada con dietilpirocarbonato y se equilibró en una solución de NaOH 0.01N y NaCl 3M durante 20 min. El ARN fraccionado se transfirió a una membrana de nylon positivamente cargada (Zeta-Probe, BIORAD) con una solución de NaOH 0.01N y NaCl 3M por 8 h por transferencia ascendente (Sambrook y Russell, 2001).

Marcaje de una secuencia de MAP cinasa con digoxigenina

La secuencia parcial de un gen de MAP cinasa de callo de cocotero de 447 pb (EMBL no. <u>AJ555489</u>) correspondiente a una región que está conservada entre las MAP cinasas de diversas especies vegetales fue marcada con digoxigenina mediante PCR.

Análisis de expresión por Northern blot

Después de la transferencia, la membrana de nylon se lavó durante 5 min en amortiguador SSC 6x (NaCl 0.5 M, citrato de sodio 50 mM) y se colocó en la solución de hibridación (BSA 1%, EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 0.5 M pH 7.2, SDS 5%) durante 1 h a 65 °C para la prehibridación. La hibridación se realizó en la misma solución durante 12 h a 65 °C, habiendo agregado previamente la sonda marcada con digoxigenina. La membrana se lavó tres veces a 65 °C (15 min por lavado) en solución de lavado 1 (BSA 0.5%, EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 40 mM pH 7.2, SDS 5%) y tres veces a 65 °C (15 min por lavado) en solución de lavado 2 (EDTA 1 mM. Na₂HPO₄ 40 mM pH 7.2, SDS 1%). Inmediatamente la membrana se equilibró a temperatura ambiente (TA) durante 5 min en la solución de lavado 3 (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM pH 7.5 y tween 20 0.3%) y se bloqueó con la misma solución, adicionada con leche descremada al 5% (Svelty, Nestlé) durante 1 h a TA. En seguida, a la misma solución se le adicionó el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución final 1:10,000) y la membrana se incubó en agitación suave durante 1 h a TA. Inmediatamente, la membrana se lavó dos veces, durante 15 min con solución de lavado 3 (100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl pH 7.5 y tween 20 al 0.3%). Luego, la membrana se equilibró con la solución de detección por 5 min (Tris-HCI 100 mM pH 9.5. NaCl 100 mM). La membrana se sacó del contenedor de plástico. se escurrió la solución de detección que estaba en exceso y la membrana se colocó en un protector de hojas de plástico. A la membrana se le agregaron 6-8 gotas de CSPD, ready-to-use (Roche) y se cubrió con el protector de hojas. La membrana se incubó 5 min a temperatura ambiente, después se limpió el exceso de reactivo y se colocó en un cassette de exposición para películas autoradiográficas durante 10 min a 37 °C. Finalmente, la membrana se expuso a un film de rayos X durante 30 min a TA y el film se reveló por autoradiografía.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la **Figura 4.1**, la sonda de MAP cinasas hibridó con su secuencia complementaria localizada en el plásmido de donde fue amplificada (control positivo), pero no se detectaron señales de MAP cinasa en el ARN total de callos tratados y no tratados con quitosano, lo que podría indicar que la población de ARNm's de MAP cinasas es escasa y no puede ser detectada bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo. En el ensayo de expresión, se evaluaron 5 µg de ARN total para cada uno de los tratamientos debido a que, de acuerdo al método, únicamente se necesitan de 1 a 5 µg de ARN total para determinar cambios en la expresión de un gen cuando se realiza una detección no radiactiva (Kruchen y Rueger, 2003).

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión sugieren que, con la técnica empleada y bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo, no hubo aumento en los niveles de expresión de una MAP cinasa, debido al tratamiento de callos de cocotero con quitosano. Por otro lado, este hecho podría indicar que el principal nivel de regulación de la MAP cinasa de ~46 kDa, que aumenta su actividad debido al tratamiento con quitosano, sería el postraducional. Esto es, posiblemente no se necesite una síntesis *de novo* de la proteína para que ocurra un aumento de la actividad de MAP cinasa.







Figura 4.1. Análisis de expresión de callos tratados con quitosano. 5 µg de ARN total de callos tratados con quitosano y de callos sujetos al tratamiento control fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturalizantes (formaldehido 2.2 M en amortiguador MOPS 1X) y transferidos a una membrana de nylon positivamente cargada (Zeta-Probe, BIORAD). El ARN transferido fue evaluado con una sonda de MAP cinasas de hoja de cocotero Alto del Atlántico marcada con digoxigenina. La sonda unida a su secuencia complementaria fue revelada adicionado el reactivo CSPD, ready-to-use (Roche) y exponiendo la membrana a una película autorradiográfica. En el carril 8 se fraccionó un plásmido que contiene la secuencia que fue usada como sonda de MAP cinasas (control positivo). En el panel inferior se muestra el ARN ribosomal teñido con bromuro de etidio como control de carga.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Bögre L., Ligterink W., Meskiene I., Barker P. J. and Heberle-Bors E. (1997). Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9:75-83
- Chan J. L., Saénz L., Talavera C., Hornung R., Robert M. and Oropeza C. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:515–521.
- Cheong Y. H., Moon B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Kim M. C., Kim I. H., Park C. Y., Kim J. C., Park B. O., Koo S. C., Yoon H. W., Chung W. S., Lim C. O., Lee S. Y. and Cho M. J. (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* 132:1961–1972
- Eeuwens C. J. (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 36:23–28
- He C., Fong S. H. T., Yang D. and Wang G-L. (1999). BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:1064–1073
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang Z., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y. and Walter J. C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7:301-308
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterik W., Barker P. J., Huskisson N. S. and Hirt H. (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11274-11279
- Kruchen B. and Rueger B. (2003). The DIG system nonradioactive and highly sensitive detection of nucleic acids. *Biochemica – Mannheim* 3:13-15
- Ligterink W., Kroj T., Nieden U. z., Hirt H. and Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276:2054-2057
- Mizoguchi, T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K. and Shinozaki K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 765–769
- Morris P. C. (2001). MAP kinase signal transduction pathways in plants. New Phytol. 151:67-89
- Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D. F., Hirt H. and Jones J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11:273-287

- Sáenz-Carbonell L. A. (1999). Desarrollo de protocolos para la regeneración de Cocos nucifera L. a través de embriogénesis somática. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, pp. 30
- Sambrook J. and Russell D. W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Third Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York. Vol. 1 pp. 200
- Schoenbeck M. A., Samac D. A., Fedorova M., Gregerson R. G., Gantt J. S. and Vance C. P. (1999). The alfalfa (Medicago sativa) TDY1 gene encodes a mitogen-activated protein kinase homolog. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:882–893
- Seo S., Okamoto M., Seto H., Ishizuka K., Sano H. and Ohashi Y. (1995). Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270:1988-1991
- Suzuki K., Fukuda Y. and Shinshi H. (1995). Studies on elicitor-signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 36:281-289
- Takezawa D. (1999). Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. Plant Mol. Biol. 40:921-933
- Wan J., Zhang S. and Stacey G. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in Arabidopsis by chitin. *Mol. Plant Pathol.* 5:125-135
- Zhang S., Liu Y. and Klessig D. F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitins. *Plant J.* 23:339-347
- Zhang S. and Klessig D. F. (1998). Resistance gene N-mediated *de novo* synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7433-7438
- Zhang S. and Klessig D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci. 6:520-527

Saenz-Carbonali L. A. (1999) Desarrollo de protocolos para la roganatación de Cocce nucières L. a bravés de embriogènesis somitica. Tesis de Dectorade, Centro de Investigación Científica da Yucatán, pp. 30.

Sambrook J. and Russell D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, Third Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, Vol. 1 pp. 200

Schoenbeck M. A., Samac D. A., Fadorova M., Gregerson R. G., Gantt J. S. and Vanca C. P. (1999). The alfalfa (Medicago sativa) TDY1 guna encodea a mitogen-activated protein. Kinase homolog. *Mol. Plant. Microbe* Minueck 17 852–893

No. 1. Okamolo M., Seto H., Ishizuka K., Sano H. and Oheshi Y. (1995). Tobacca MAP Ishase: A possible mediator in wound signal baneduction pathways: Science 270:1988-1991

Suzuld K., Fokuda Y. and Shirahi H. (1996), Studies on elicitor-sigt of framduction leading to differential expression of dotionse genes in cultures latiticas cells. Plant Cell Physiol. 36:281-289

Foliocawa D. (1999). Elicitor- and A23187-Induced expression of IVCX-1, e-penewrooding milogen-activated protein kinase in wheat. Plant Mol. Biol. 40:521-933.

Wan J. Zhang S and States G (2004) Activation of a mitogen-at weekd protein kinned optimery in Arabidoose by chillo. Med. Plant Pathol 5: 721, 135

Zhang S., Lui Y. and Klassig D. F. (2000). Multiple levels of tobacco V/IPK activation during the Induction of cell death by fungal eligities. Plant J. 23:333-347

Zhang S. and Kleneig D. F. (1998). Resistance gane N-mediated de ravo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinare by totacco moteic virue infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 957433-1438.

Zhang B. and Kleesig D. F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. Transfe Ptark Sci 6:820-827

Capítulo V

Clonación de secuencias de ADN complementario, correspondientes a ortólogos de MAP cinasas de Cocos nucifera L.

1. INTRODUCCIÓN

Elucidar los fenómenos que se presentan durante el proceso de interacción planta-patógeno y la forma natural en la que *Cocos nucifera* L. se defiende ante los potenciales patógenos, es un requisito fundamental. La clonación de genes homólogos, la producción de bibliotecas genómicas y de ADNc, la elaboración de sondas homólogas, la secuenciación de genomas y la purificación de proteínas de interés, son sólo algunas de las herramientas utilizadas por las técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética para contestar preguntas biológicas.

Dada la utilidad de las herramientas arriba mencionadas, uno de los objetivos del presente trabajo de tesis fue la clonación de secuencias de ADN complementario de MAP cinasas de cocotero. La obtención de estas secuencias permitirá analizar tanto a nivel transcripcional como postraduccional la participación de estas proteínas en la percepción de diversos estímulos, tal es el caso de diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

En lo que respecta a los objetivos del presente trabajo de tesis, estas secuencias serían usadas como sondas para evaluar la expresión diferencial de genes de MAP cinasas en callos de cocotero expuestos a un inductor de origen fúngico, el quitosano.

Mediante RT-PCR, empleando cebadores degenerados, se clonaron secuencias de ADNc que codifican un segmento de la región catalítica de MAP cinasas de callo de cocotero. Y utilizando una estrategia semejante al RACE (<u>Rapid Amplification of cDNA Ends</u>), se amplificaron secuencias de ADNc correspondientes a los extremos 5' y 3' de MAP cinasas de hoja de cocotero. Es probable que en estas secuencias estén presentes las regiones 5' y 3' no traducibles, así como el sitio de inicio de la de traducción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las secuencias de ADNc correspondientes a las regiones internas de los genes de MAP cinasas de cocotero fueron obtenidas a partir de callos secundarios de *Cocos nucifera* L. de las variedades Alto del Atlántico (AA) y Enano Malayo (EM) de dos meses de edad y cultivados en oscuridad a 27 °C \pm 2 °C (Chan *et al.*, 1998). Estos callos se obtuvieron a partir de la fragmentación y resiembra de callos primarios en 10 mL de medio Y3 (Eeuwens, 1976) adicionado con sacarosa (5%), gelrite (3 g L⁻¹) (Sigma), carbón activado (2.5 g Γ¹) (Sigma) y la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.65 mM) (Chan *et al.*, 1998; Sáenz-Carbonell, 1999).

A partir de hoja de cocotero variedad Alto del Atlántico (AA) se obtuvieron secuencias de ADNc correspondientes a los extremos 5` y 3` de ortólogos de MAP cinasas. La hoja fue colectada de la palma denominada como CA-121, localizada en el Campo Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán, ubicado en la localidad de San Crisanto, Yucatán. La característica más importante de esta palma es que, a pesar de que ya se había demostrado 2 años atrás, mediante ensayos de PCR, la presencia del fitoplasma causante del Amarillamiento Letal, al momento de la recolección del tejido no se observaron síntomas de la enfermedad.

Extracción de ARN total

La extracción del ARN total de callo de cocotero se realizó mediante el uso del reactivo comercial TRIzol (Invitrogen), basado en el método de Chomczynski (1993). Este método es una nueva versión del método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987) para extraer ARN total utilizando los reactivos tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo. El reactivo TRIzol permite la extracción simultánea de ARN, ADN y proteínas de células y tejidos. Consiste de una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, amortiguador y agentes solubilizantes. El isotiocianato de guanidina es un agente caotrópico inhibidor de RNasas. Durante la homogenización y lisis de la muestra, el reactivo mantiene la integridad del ARN, mientras las células son rotas y los componentes celulares, disueltos. La adición de cloroformo, seguido de una centrifugación, separa la solución en dos fases, una acuosa y una orgánica (separación fase líquida). Esto trae como resultado una partición altamente selectiva del ARN, el ADN y las proteínas, los cuales se distribuyen en la fase acuosa, la interfase y la fase orgánica, respectivamente. Después de la separación de la fase acuosa, el ARN es recuperado a través de precipitación con isopropanol. El ADN y las proteínas pueden posteriormente recuperarse por precipitaciones secuenciales en la fase orgánica. Una precipitación con etanol separa el ADN de la interfase y una precipitación adicional con isopropanol separa a las proteínas de la fase orgánica (Chomczynski, 1993).

Brevemente, el callo de cocotero fue pulverizado en presencia de nitrógeno líquido y disuelto en TRIzol a razón de 5 mL de reactivo por gramo de tejido. Después de eliminar los restos celulares por centrifugación a 22,000 x g durante 5 min a 4 °C, el ARN se extrajo mediante una partición orgánica, adicionando 1/5 (vol/vol) de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). El ácido nucleico se obtuvo precipitándolo a partir de la fase acuosa con 1 vol. de isopropanol; la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min La pastilla se resuspendió en agua libre de RNasas La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en agarosa al 1.4%, se cuantificó por espectrofotometría y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Para extraer ARN de hoja de cocotero se utilizó el reactivo comercial CONCERT[™] Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) que contiene, entre otras cosas, β-mercaptoetanol como agente desnaturalizante de proteínas, y polivinilpolipirrolidona (PVPP), una forma entrecruzada de la polivinilpirrolidona, insoluble y de alto peso molecular que se acopla a los fenoles y alcaloides eliminándolos durante el proceso de extracción. La técnica permitió extraer ARN libre de muchos contaminantes, pero también se extrajo ADN.

Para separar los dos ácidos nucleicos se empleó el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen). El empleo de ambos reactivos en pasos subsecuentes fue necesario, ya que una gran cantidad de polisacáridos y polifenoles fueron liberados de los tejidos de la hoja de cocotero durante la extracción Estos contaminantes no son eliminados con los métodos de extracción clásicos, y pueden coprecipitar durante los pasos posteriores de precipitación con alcohol.

3 g de hoja de cocotero fueron pulverizados en presencia de nitrógeno líquido y disueltos en 15 mL de reactivo CONCERT. Después de eliminar los restos celulares por centrifugación a 12,000 x g durante 2 min, al sobrenadante se le añadieron 0.2 vol. de NaCl 5 M. El ARN se extrajo mediante una partición orgánica, adicionando 0.6 vol. de cloroformo. El ácido nucleico se obtuvo precipitándolo de la fase acuosa con 1 vol. de isopropanol; la pastilla se lavó dos veces con etanol al 75% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min. La pastilla se disolvió en 500 μL de TRIzol calentando la mezcla a 65 ⁰C durante 5 min. A la mezcla se le añadió 0.2 vol. de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a 4 ⁰C. El ARN, que estaba libre de ADN, se obtuvo precipitándolo de la fase acuosa con 1 vol. de isopropanol. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 75% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min. La pastilla se resuspendió en agua libre de RNasas. La integridad del ARN se determinó fraccionándolo mediante electroforesis en agarosa al 1.4%, se cuantificó por espectrofotometría y se conservó a -20 ⁰C hasta su uso.

Clonación de secuencias de ADNc correspondientes a MAP Cinasas de callo de cocotero

Selección de ARN poli (A*) de callo de cocotero

A partir de ARN total de callo de cocotero AA y Enano Malavo (EM), se enriqueció la población de ARN poli (A^{*}) mediante cromatografía de afinidad con resina de oligoIdTI-celulosa mediante el "kit" comercial MessageMaker® Reagent Assembly (Life Technologies). En éste, el ARN total de callo de cocotero AA y EM se mezcló en reacciones separadas con una solución de oligo[dT] inmovilizada a un soporte de celulosa. La mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C en agitación suave (condición necesaria para que la cola de adenilatos característica del ARN poli(A*) hibride con el oligo(dT). Después de la incubación, se desechó el sobrenadante (ARN que no hibridó) y se eliminaron las secuencias unidas de manera inespecífica al soporte sólido lavando la resina dos veces con amortiguador de lavado (NaCl 0.1 M, Tris-HCI 20 mM, pH 7.5). El ARN poli (A*) se eluyó incubando la resina de oligo[dT]-celulosa en agua a 65 ºC. El procedimiento descrito se realizó dos veces para enriquecer más la población de ARN poli (A⁺). Una vez realizada la doble selección, se determinó la integridad del ARN poli (A⁺) mediante electroforesis en agarosa al 1.4% y se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

Amplificación de secuencias de MAP cinasas por RT-PCR

El ARN poli(A⁺) de callo de cocotero variedades AA y EM fue utilizado como templado para amplificar por RT-PCR secuencias de MAP cinasas de callo de cocotero. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos degenerados MK-I y MK-IX diseñados a partir de secuencias conservadas de MAP cinasas de diversas especies vegetales. La reacción de RT-PCR se realizó en un solo tubo mediante la transcriptasa reversa SUPERSCRIPT II-H[®] (síntesis de ADNc) y la *Taq* ADN Polimerasa PLATINIUM[®] (amplificación de ADN) proporcionadas en el "kit" comercial SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] *Taq* (Invitrogen).

La RT-PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: síntesis de ADNc a 50 °C durante 30 min; amplificación de ADN, desnaturalización a 94 °C durante 30 s., alineamiento a 55 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min (40 ciclos) y extensión final 72 °C durante 15 min (1 ciclo).

La amplificación de la región de interés se verificó fraccionando los productos por electroforesis en agarosa al 1%. El producto de RT-PCR se purificó por cromatografía de exclusión molecular mediante las columnas Quantum Prep[®] PCR Kleen Spin (Bio-Rad). El producto de purificación se reamplificó por PCR mediante la enzima *Taq* ADN Polimerasa proporcionada en el "kit" comercial Platinum[®] PCR Supermix (Invitrogen), empleando como cebadores los oligonucleótidos MK-I y MK-IX, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 30 s., alineamiento a 55 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min (40 ciclos) y extensión final a 72 °C durante 15 min (1 ciclo). La amplificación se corroboró fraccionando los productos en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Diseño de las secuencias de los oligonucleótidos cebadores

Para amplificar secuencias de genes de MAP cinasas de cocotero, se utilizaron como cebadores oligonucleótidos degenerados. Los oligonucleótidos MK (Directo): las siguientes secuencias: 10 tienen AGRACBYTBCGKGARMTMAAGCTT IX (Reverso): MK V GAAHATYCAACCBACHGACCAHACATCAAT. Estas secuencias delimitan un segmento de ~447 pb en todas las especies comparadas y han sido utilizados para clonar regiones internas de MAP cinasas de cafeto (Arrovo-Serralta et al., 2004). En la Tabla V.1 se muestra la relación de secuencias de MAP cinasas de plantas reportadas en bancos de datos, que fueron utilizadas para detectar regiones conservadas a nivel de aminoácidos y así diseñar, a partir de ellas, los oligonucleótidos MK-I y MK-IX.

and CALLER Presented of ARM por (A) and

Tabla V.1. MAP cinasas de diversas especies vegetales utilizadas para diseñar los oligonucleótidos degenerados MK-I y MK-IX.

Nombre	Especie	Clave de acceso	Familia
PhMEK1	Petunia hybrida	X83440	Solanaceae
NTF3	Nicotiana tabacum	X69971	Solanaceae Amygdaloideae
PaMAPK	Prunus armeniaca	AF134730	
OsMAP3	Oryza sativa	AF216317	Oryzeae
PCMAPKINA	Petroselinum crispum	Y12785	Apiaceae
ZmMAPK5	Zea mays	AB016802	Andropogoneae
AtMAPK7	Arabidopsis thaliana	AY059937	Brassicaceae Brassicaceae Vicieae Oryzeae Solanaceae
АТМРК2	Arabidopsis thaliana	D14714	
PsMAPK2	Pisum sativum	AF154329	
OsMAP2	Oryza sativa	AF216316	
MK2	Capsicum annuum	AF247136	
NtSIPK	Nicotiana tabacum	U94192	Solanaceae
MsERK1	Medicago sativa	L07042	Trifolieae
IbMAPK	Ipomoea batatas	AF149424	Convolvulaceae
MK1	Capsicum annuum	AF247135	Solanaceae
EeMAPK	Euphorbia esula	AF242308	Euphorbiaceae

Ligación de los productos de RT-PCR al plásmido vector y transformación de células competentes

Los fragmentos de ~447 pb, producto de la reamplificación por PCR, se ligaron a un vector, el plásmido pCR[®] 2.1-TOPO, usando el "kit" comercial TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen). El vector linearizado posee una ADN topoisomerasa I unida de manera covalente al fosfato de la timina en el extremo 3' de cada cadena. Las topoisomerasas ligan los productos de PCR que tienen adeninas en los extremos 3' y que son compatibles con el vector (por complementariedad de bases).

El plásmido pCR® 2.1-TOPO de 3.9 kb tiene, además de un sitio de clonación múltiple, un gen de resistencia a ampicilina, otro a kanamicina, un promotor lac para la expresión de un fragmento del gen lacZ α (B-galactosidasa). entre otros. El plásmido recombinante se introdujo por choque térmico dentro de las células Epicurian Coli® XL10-Gold® Kan Ultracompetent Cells (Stratagene). Estas células son resistentes a tetraciclina y kanamicina. Las bacterias transformadas se cultivaron por 1 h a 37 °C en medio de cultivo SOC para permitir la expresión de genes de resistencia al antibiótico. Después, se sembraron en medio LB sólido con ampicilina (100 mg L⁻¹), X-Gal (40 µl de un stock de 50 mg mL⁻¹) e IPTG (8 µl de un stock a 100mM), dejándolas crecer toda la noche a 37 °C. Las colonias que plásmidos recombinantes fueron seleccionados nor contenían los complementación. Las bacterias transformadas se cultivaron en 3 mL de medio LB líquido suplementado con 100 mg mL⁻¹ de ampicilina, dejándolas crecer toda la noche a 37 °C en agitación continua (200 rpm).

Purificación del ADN plasmídico

A partir de los cultivos bacterianos se aislaron y purificaron los plásmidos mediante lisis alcalina-SDS y absorción en sílica, utilizando el "kit" comercial Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega). Este método explota las diferencias en las características de desnaturalización y renaturalización del ADN plasmídico circular y el ADN cromosomal de la bacteria. En condiciones alcalinas ambos ADN se desnaturalizan, y una rápida neutralización con un amortiguador alto en sales, como acetato de potasio en presencia de una sal de sodio y SDS, ocasiona que las cadenas de ADN cromosomal no se complementen de manera eficiente y formen agregados insolubles. En contraste, el ADN plasmídico se rehibridiza permitiendo que el plásmido permanezca en solución. Adicionalmente, la sal de potasio y el SDS son insolubles, lo que permiten la agregación y la precipitación de proteínas que ayudan a atrapar el ADN cromosomal, que es separado de la fracción soluble por centrifugación. Luego, el ADN plasmídico que se encuentra en la fracción soluble, se purifica con una resina de sílica. Este método está basado en la adsorción selectiva del ADN plasmídico a la resina en presencia de concentraciones altas de sales. La elución del ADN, después de remover los contaminantes, se consigue con soluciones de baja fuerza iónica tales como TE o agua.

La presencia del ADN plasmídico se comprobó fraccionando los productos por electroforesis en agarosa al 1%.
Análisis de las clonas recombinantes

a) Liberación de insertos de interés con enzimas de restricción. Los plásmidos fueron digeridos con la enzima EcoR1, ya que las secuencias reconocidas por esta enzima de restricción flanquean a los insertos ligados al plásmido pCR[®] 2.1-TOPO. La mezcla de reacción (2 μl de plásmido/1 μl de amortiguador/0.5 μl de enzima) se incubó a 37 °C toda la noche. La liberación de los fragmentos se observó fraccionando los productos por electroforesis en agarosa al 1%. De esta manera, se descartaron aquellos plásmidos no recombinantes.

b) Reamplificación de insertos mediante PCR. Los plásmidos que liberaron secuencias de ~447 pb se utilizaron como molde para reamplificar los productos de PCR ligados a ellos. La síntesis de ADN se realizó con Taq DNA polimerasa recombinante, empleando como cebadores los oligonucleótidos MK-I y MK-IX, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 30 s., alineamiento a 55 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min (40 ciclos) y extensión final 72 °C durante 15 min (1 ciclo). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. De esta manera se descartaron aquellos segmentos inespecíficos que pudieran tener el mismo tamaño de los insertos deseados.

c) Secuenciación de insertos. Los plásmidos con el inserto de interés se mandaron a secuenciar y las secuencias se compararon con los bancos de datos GenBank, EMBL, DDBJ, PDB mediante los programas "Gapped BLAST and PSI-BLAST" del sitio <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>. Las secuencias que tuvieron un alto porcentaje de homología con genes de MAP cinasas se reportaron al EMBL.

Clonación de secuencias de ADNc correspondientes a los extremos 5` y 3` de genes de MAP cinasas de cocotero.

Síntesis de ADNc

A partir del ARN total de hoja de cocotero AA se sintetizó ADNc mediante la estrategia SMARTTM (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript, Clontech) (**Figura 5.1**). Esta estrategia permitió sintetizar ADNc con extremos a los cuales se les añadió los dos sitios de reconocimiento de la enzima *Sfi* I (*Sfi* IA y *Sfi* IB). Esta última característica permitió amplificar por PCR de larga distancia (LD-PCR) solamente aquellos ADNcs a los cuales se les había añadido estas secuencias, enriqueciéndose la población de ADNcs completos. Estos dos sitios de reconocimiento pueden i) ser digeridos con la enzima de restricción *Sfi* I, por lo que los ADNcs de doble cadena pueden ligarse direccionalmente a algún vector para la amplificación del ADNc correspondiente a un gen en particular mediante ensayos tipo RACE, entre otros.

ARN total de hoja de cocotero variedad AA (1.92 µg) se usó como templado para sintetizar ADNc de una cadena mediante la PowerScript[™] Reverse Tanscriptase (Clontech) (mutante RNasa H- de la transcriptasa reversa de la cepa Moloney del virus de la leucemia murina), usando como cebador el CDS III/3' PCR, que es un oligo- (dT) modificado que tiene en su extremo 5' una de las secuencias de reconocimiento de la enzima *Sfi* I, la secuencia *Sfi* IB (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)₃₀N₋₁N-3' en donde N = A, G, C, o T; N₋₁ = A, G, o C) (**Figura 5.1**). Al terminar de sintetizar la primera cadena, la estrategia permite añadir al extremo 3' del ADNc la otra secuencia de restricción de la enzima *Sfi* I, la secuencia *Sfi* IA, mediante el empleo del oligonucleótido SMART IV (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'), que tiene la secuencia *Sfi* IA en su extremo 5'. Este oligonucleótido tiene la característica de tener en su extremo 3' una extensión de guanidinas que se aparea a la extensión de desoxicitidinas que la transcriptasa reversa añade al extremo 3' del ADNc debido a su actividad de nucleotidil transferasa. La secuencia del SMART IV sirve como un templado corto en el extremo 5' del ARNm (**Figura 5.1**).

Una vez sintetizado el ADNc con las dos secuencias de restricción de la enzima *Sfi* I en ambos extremos, este ADNc se amplificó mediante LD-PCR, usando la BD TITANIUM[™] *Taq* DNA polimerasa (Clontech) (deficiente en su actividad de nucleasa por tener una deleción en su extremo amino) y los cebadores 5' PCR (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') (oligonucleótido con la misma secuencia que el SMART IV pero sin 16 nucleótidos en su extremo 3') y el CDS III/3' PCR. El programa usado fue el siguiente: desnaturalización 95 °C, 15 s.; alineamiento y síntesis 68 °C, 8 min (25 ciclos).

Obtención de los extremos 5` y 3` de gen(es) de MAP cinasas mediante ensavos tipo RACE

Para obtener los extremos 5` y 3` de los genes de MAP cinasas, se empleó una estrategia semejante al RACE (<u>Rapid Amplification of cDNA Ends</u>), en la que, mediante PCR se propuso amplificar los extremos 5' y 3' de gen(es) de MAP cinasas usando como molde al ADNc de doble cadena de hoja de cocotero, el cual fue sintetizado mediante la estrategia SMARTTM (**Figura 5.2**). La estrategia que se siguió debía permitir amplificar las regiones 5' y 3' en reacciones por separado combinando los oligonucleótidos 5' PCR (directo) y CDS III/3' PCR (reverso) con los oligonucleótidos degenerados MK-I (directo) y MK-IX (reverso). Para amplificar la región 5', se usaron como cebadores los oligonucleótidos 5' PCR (directo) y el MK-IX (reverso), y para amplificar la región 3', los oligonucleótidos MK-I (directo) y el CDS III/3' PCR (reverso) (**Figura 5.2**).

Antiquediatabase la potessión de ADNEE completos Estre dos antos da historisticitaries position in ser algenicos dels la metros de lesti color SLL con o que tos ADNES la debie cadent provido Equipe direccionativante o algon vescor (bue la donatractoria de ADNE questance de ADNE o e) de canco antiana para la metroficación de ADNE questancemente a un den es prefector mediante en eyen for RedE ante atrus.

Pow Do ana ana ana Alaca de aga YOR YOR



Figura 5.1. Estrategia SMART[™]. Diagrama de flujo de la estrategia que se siguió para la síntesis de ADNc hoja de cocotero, y su amplificación por PCR de larga distancia.

Ligación de los productos de PCR al plásmido vector y transformación de células competentes

Los productos de PCR se ligaron al vector pCR II[®] del sistema TOPO TA Cloning kit (Invitrogen). El plásmido recombinante se introdujo a células competentes de *E. coli* de la cepa DH5α. Estas células se hicieron competentes por el método de cloruro de rubidio. La transformación se realizó por choque térmico a 42 ⁰C durante 50 s. Las bacterias transformadas se pusieron a crecer durante 1 hr a 37 ⁰C en medio LB para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico. Posteriormente, las bacterias fueron sembradas en cajas con medio LB suplementado con 50 mg mL⁻¹ de kanamicina o 100 mg mL⁻¹ de ampicilina, X-Gal e IPTG. Las colonias que tenían los plásmidos recombinantes fueron seleccionadas por α-complementación.



Figura 5.2. Representación gráfica de la estrategia utilizada para amplificar secuencias de gen(es) de MAP cinasas. Mediante ensayos tipo RACE se puede amplificar por PCR, en reacciones por separado, a partir de ADNc de doble cadena, los extremos 5' y 3' de gen(es) de MAP cinasas.

Purificación del ADN plasmídico

La punificación de los plásmidos se realizó por lisis alcalina-SDS.

Análisis de las clonas recombinantes

Los plásmidos aislados se evaluaron mediante análisis de restricción y secuenciación, con el objetivo de determinar si los plásmidos recombinantes contenían los extremos 5' y 3' de gen(es) de MAP cinasas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ARN total de callo y hoja de cocotero

En las figuras (**Figuras 5.3 y 5.4**) se muestra ARN de callo y hoja de cocotero, fraccionado en agarosa, respectivamente <u>Se</u> observa que la intensidad del ARN 28S es el doble del ARN 18S, lo que indica que, probablemente, el ARN estaba íntegro. Por otro lado, el análisis de pureza mediante espectrofotometría determinó que el ARN extraído de callo y hoja de cocotero no contenía contaminación por proteínas, ya que el cociente A_{260}/A_{280} fue de 1.8 y 1.75, respectivamente. Los resultados de estos análisis demostraron que los métodos empleados son eficientes para obtener, de estos tipos de tejido, un ARN de alta calidad.



Figura 5.3. Fraccionamiento del ARN extraído de callo de cocotero AA mediante el método de un solo paso (Chomczynski, 1993) empleando el reactivo comercial TRIzol[®]. Carriles 1 y 2: ARN de callo de cocotero var. AA (20.3 y 25 µg respectivamente). Carriles 3 y 4: ARN de callo de cocotero var. EM (16 y 13.8 µg respectivamente). Electroforesis en gel de agarosa nativo al 1.4% en TAE 1x.

Administration of the second of the AM contract of the PCP III Display to the second of the second of the PCP is a second of the second of the



Figura 5.4. Fraccionamiento del ARN extraído de hoja de cocotero AA mediante el uso secuencial de los reactivos comerciales Concert[™] Plant RNA y el TRIzol[®]. Carriles 1-5, 7-11: ARN de hoja de cocotero; Carril 6: vacío. Electroforesis en gel de agarosa al 1.4% en TAE 1x.

Clonación de secuencias de ADNc correspondientes a MAP cinasas de callo de cocotero

Amplificación de secuencias de MAP cinasas por RT-PCR

Debido a que los cebadores empleados representan regiones conservadas de MAP cinasas de otras especies vegetales y además, han sido utilizados para clonar regiones internas de MAP cinasas de cafeto (Arroyo-Serralta *et al.*, 2004), es probable, que las bandas amplificadas representen secuencias de MAP cinasas de callo de cocotero (**Figura 5.5**)



Figura 5.5. Obtención de secuencias de ADNc de probables MAP cinasas de callo de cocotero mediante RT-PCR. Carril 1: ARNc de cocotero EM. Carril 2: Marcador de 100 pb. Carril 3: ARNc de cocotero AA Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x.

En la **Figura 5.5** (carriles 1 y 3) se observa, además de la banda de ~447pb, una banda de 500-1500 pb que podría representar una amplificación no específica. Además, se aprecia una mancha intensa al final de cada carril, que podría representar dNTPs no incorporados, cebadores, y/o productos de síntesis incompletas.

Con el objetivo de eliminar estos dNTPs y productos de síntesis incompletas, se purificaron los productos de PCR a través de columnas de exclusión molecular. Después de este proceso, se observó la desaparición del barrido observado al final de cada carril (datos no mostrados).

En la Figura 5.6 se observa que, después de una reacción de PCR con los productos amplificados, únicamente se reamplificó la banda de ~447 pb, lo que sugirió que la banda de 500-1500 pb no era específica.



Figura 5.6. Determinación de la especificidad de los productos de RT-PCR. Los productos de RT-PCR obtenidos de ARN poli (A^{+}) de callo de cocotero de las variedades AA y EM se intentaron reamplificar mediante PCR, empleando como cebadores a los oligonucleótidos MK-l y MK-IX. Carriles 1 y 6: Marcador de 100 pb. Carriles 2 y 4: ADNc de callo de cocotero variedad AA. Carriles 3 y 5: ADNc de callo de cocotero variedad EM. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x.

Los productos de 400-500 pb reamplificados por PCR fueron ligados al plásmido pCR[®] 2.1-TOPO y con ellos, se transformaron células de *E. coli* mediante choque térmico. Las bacterias transformadas se seleccionaron por α-complementación y se picaron 20 colonias. Los 40 plásmidos aislados a partir de las colonias positivas se analizaron con enzimas de restricción, y únicamente cinco plásmidos liberaron el fragmento de 400-500 pb; estos fueron los plásmidos de las clonas A5, A8, E5, E8 y E9 (se les nombró A y E para referirse a su origen: A de Alto y E de Enano) (datos no mostrados).

La Figura 5.7 muestra que, en los cinco plásmidos que liberaron un inserto de ~447 pb en el análisis de restricción, hubo amplificación de una banda del mismo tamaño (clonas A5, A8, E5, E8 y E9), al emplear los oligonucleótidos degenerados MK-I y MK-IX como cebadores. La ausencia de amplificación empleando como molde un fragmento de la secuencia del gen cdc2 de cafeto validó la especificidad de los cebadores empleados.



Figura 5.7. Identificación de plásmidos con insertos correspondientes a secuencias de MAP cinasas. Plásmidos de las clonas A5, A8, E5, E8 y E9 fueron usados como templado para amplificar por PCR probables secuencias de MAP cinasas usando como cebadores los oligonucleótidos MK-I y MK-IX. Carriles 1 y 15: Marcador de 1 kb. Carriles 2, 4-7, 9: Plásmidos de las clonas A2, A10, E1, E7, A2 y E1 que no liberaron insertos en el análisis de restricción. Carril 3: Plásmido de la clona A5. Carril 8: Plásmido de la clona A8. Carril 10: Plásmido de la clona E5. Carril 11: Plásmido de la clona E8. Carril 12: Plásmido de la clona E9. Carril 13: Control negativo. Plásmido pCR[®] 2.1-TOPO con un fragmento de ADNc del gen *cdc2* de cafeto. Carril 14: Control negativo. El plásmido del carril 13 sin enzima. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x.

Con base a estos resultados, se concluyó que los fragmentos ligados a los plásmidos de las clonas A5, A8, E5, E8 y E9 correspondían probablemente secuencias de ADNc de MAP cinasas de callo de cocotero.

Los insertos ligados a los plásmidos A5, A8, E5, E8 y E9 se mandaron a secuenciar. Y el resultado del análisis de las secuencias se reporta en el capítulo 4 del presente trabajo de tesis.

Clonación de secuencias de ADNc correspondientes a los extremos 5` y 3` de genes de MAP cinasas de cocotero

Síntesis de ADNc

Mediante la estrategia SMART se sintetizó ADNc a partir de ARN total de hoja de cocotero. En la Figura 5.8 se observa que la mayor parte de la población de ADNcs fluctuó entre los 500 y 5,000 pb.





Amplificación de los extremos 5' y 3' de gen(es) de MAP cinasas mediante ensayos tipo RACE

A partir del alineamiento de 16 MAP cinasas de diversas especies vegetales, que se realizó para diseñar cebadores degenerados, se dedujo que el tamaño de secuencia esperado para el(los) extremo(s) 5' probablemente estaría entre las 700 y 800 pb; mientras que el tamaño esperado para el(los) extremo(s) 3' podría fluctuar entre las 890 y 960 pb.

Un primer ensayo de PCR mostró que no se pudo amplificar una secuencia de tamaño esperado correspondiente al extremo 5' de MAP cinasas (Figura 5.9, carril 4). Sin embargo, se logró amplificar una banda tenue de ~1,200 (Figura 5.9, carril 5) que podría corresponder al extremo 3' de una MAP cinasa, suposición basada en el hecho que se obtuvo un tamaño de banda aproximado al esperado para esa secuencia.





Con el objetivo de determinar si el ADNc estaba íntegro y si en esta población se encontraban secuencias de MAP cinasas, se decidió emplear al ADNc como molde y a los oligonucleótidos MK-I y MK-IX como cebadores. La amplificación de una secuencia de ~447 pb (Figura 5.9, carril 3) confirmó que en efecto, el ADNc empleado probablemente estaba íntegro y que habían secuencias de MAP cinasas en la población de ADNcs.

Entre las probables causas de que no se obtuviera el fragmento correspondiente al extremo 5' podrían estar: (i) el tiempo de síntesis no fue suficiente. (ii) la cantidad de ADNc empleada fue demasiada e inhibió a la enzima o. (iii) la temperatura de alineamiento no era la óptima. De acuerdo a Rychlik et al. (1990), la optimización de la temperatura de alineamiento del cebador menos estable laquel que tenga la menor temperatura de fusión (Tm) de los dos) es imprescindible para poder amplificar secuencias determinadas sin productos no específicos, cuando se emplea como templado una mezcla heterogénea de ácido nucleico.

En consecuencia se calculó la temperatura óptima de alineamiento para los cebadores 5'PCR / MK-IX utilizando la fórmula propuesta por Rychlik et al. (1990)

 $T_a^{OPT} = 0.3T_m^{primer} + 0.7T_m^{product} - 14.9$ (i)

En donde T_a^{OPT} es la temperatura óptima de alineamiento del cebador menos estable, T_m^{primer} es su temperatura de fusión y $T_m^{producto}$ es la temperatura de fusión del producto esperado.

Al calcular las temperaturas de fusión de los dos cebadores (tomando en cuenta un valor de C_T= 250 pM en la fórmula de Breslauer et al., (1986) (ADN) y Freier et al. (1986) (ARN)) usando el programa Gene Runner, versión 3.05, se tuvieron los siguientes datos:

Cebadores usados para amplificar el extremo 5': 5' PCR (directo) Tm = 55.4 °C MK-IX (reverso) Tm = 63.7 °C

Con base en los resultados, el cebador menos estable era el 5' PCR con una Tm = 55.4 °C. En cuanto a la Tm^{producto}, era difícil conocer el dato debido a que sólo se conocían las secuencias de ~447 pb correspondientes a MAP cinasas de callo de cocotero amplificadas, usando los cebadores degenerados MK-I y MK-IX. Lo que hizo fue calcular la Tm producto de los fragmentos clonados y escoger la Tm más baja para sustituirla en la fórmula.

Según Rychlik et al. (1990) la fórmula es:

Tm^{PRODUCTO} = 81.5+0.41(%G+%C)+16.6 log[K⁺] -675/I I = longitud del producto En molaridad (M)

(iii)

Calculando la $T_m^{producto}$ para la secuencia CnMPK1 [en donde, de las 447 bases, hay 132 A, 85 C, 87 G y 143 T (%C= 19.01%; %G= 19.46%)] se obtuvo una $T_m^{producto} = 74.85 \ ^{\circ}C$

Con estos datos, se calculó la T_a^{OPT} para el cebador menos estable: Extremo 5':

 $T_{a}^{OPT} 5' PCR (directo) = 0.3 (55.4) + 0.7 (74.85) - 14.9$ $T_{a}^{OPT} 5' PCR (directo) = 16.62 + 52.395 - 14.9$ $T_{a}^{OPT} 5' PCR (directo) = <u>54.115</u> °C$

Se amplificaron dos secuencias, una de ~400 pb y la otra de ~850 pb (Figura 5.10, carriles 2 y 3), y se pensó que ésta última podría corresponder al extremo 5' de gen(es) de MAP cinasas, basados en el tamaño de la secuencia.





Todos los productos de las reacciones de PCR en las que se amplificaron los probables extremos 5' y 3' de gen(es) de MAP cinasas, se separaron en geles de agarosa y se aislaron las secuencias de ~850 pb y ~1200 pb, con el fin de purificarlas del gel, para luego clonarlas (**Figura 5.11**, ver flechas).



Figura 5.11. Probables extremos 5' y 3' de gen (es) de MAP cinasas. Carril 1: Producto de PCR empleando como templado ADNc de hoja de cocotero y los oligonucleótidos 5' PCR y MK-IX como cebadores. Carril 2: Producto de IPCR empleando como templado ADNc de hoja de cocotero y los oligonucleótidos MK-I y CDS III/3' PCR como cebadores. Carril 3: vacío. Carril 4: Marcador de 1 Kh. Electroforesis en gel de agarosa nativo al 1% en TAE 1X.

Se seleccionaron 34 colonias transformadas con el probable extremo 5' de gen(es) de MAP cinasas y 9 colonias con el probable extremo 3'. Se digirieron con

Eco R1 18 muestras conteniendo los probables extremos 5' de MAP cinasas y 9 con los probables extremos 3' con el fin de liberar el fragmento ligado.

El análisis de restricción mostró (**Figura 5.12**) que únicamente los plásmidos de las clonas 3 (carriles 6 y 7), 5 (carriles 10 y 11), 8 (carriles 16 y 17), 9 (carriles 18 y 19), 11 (carriles 22 y 23), 12 (carriles 24 y 25), 13 (carriles 26 y 27) (PANEL A) y 16 (Carriles 6 y 7) (PANEL B), liberaron el fragmento de ~850, que correspondía a los probables extremos 5' de MAP cinasas.



Figura 5.12. Digestión de plásmidos recombinantes con *Eco*R1. PANEL A: Carriles 1 y 30: Marcadores de 1 Kb. Carriles 2-29: Clonas 1 a 14 con los probables extremos 5' de MAP cinasa. No digerido y digerido. PANEL B: Carriles 1 y 30: Marcadores de 1 Kb; Carriles 2-9: Clonas 15-18 con los probables extremos 5' de MAP cinasa. No digerido y digerido. Carriles 10 y 29: Pozos vacíos. Carriles 11-28: Clonas I-IX con los probables extremos 3' de MAP cinasa. No digerido y digerido. Electroforesis en gel de agarosa nativo al 1% en TAE 1X.

Con el objetivo de encontrar alguna clona transformada con un plásmido que tuviese el fragmento de ~1,200 pb, se analizaron todas las células de la reacción de transformación, y se seleccionaron 54 colonias que tenían plásmidos recombinantes.

El análisis de restricción de los plásmidos mostró que solamente las clonas XX (Figura 5.13, carriles 22 y 23, panel A), XXXIX (Figura 5.14, carriles 6 y 7 del panel A) y LIII (Figura 5.14, carriles 6 y 7, panel B) liberaron fragmentos de ~1,018 pb, que se aproxima al tamaño de banda esperado. Por otro lado, las clonas XIII (Figura 5.13, Carriles 8 y 9), XV (Figura 5.13, carriles 12 y 13), XXIII (Figura 5.13, carriles 28 y 29) (todas del panel A) y XLIII (Figura 5.14, carriles 16 y 17, panel A), liberaron dos fragmentos, uno de ~750 pb y el otro de ~450 pb. Es probable que haya un sitio interno de restricción de la enzima *Eco*R1 en los insertos.



Figura 5.13. Digestión de plásmidos recombinantes con EcoR1 (segunda selección). PANEL A: Carriles 1 y 30: Marcadores de 1 Kb. Carriles 2-29: Clonas X a XXIII con probables extremos 3' de MAP cinasas. No digerido y digerido. PANEL B: Carriles 1 y 30: Marcadores de 1 Kb. Carriles 2-27: Clonas XXIV a XXXVI. No digerido y digerido. Carriles 28 y 29: Pozos vacios. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X.



Figura 5.14. Digestión de plásmidos recombinantes con *Eco*R1 (segunda selección). PANEL A: Carriles 1 y 30: Marcadores de 1 Kb; Carriles 2-11: Clonas XXXVII a XLI con probables extremos 3' de MAP cinasas. No digerido y digerido; Carriles 12-15: Clonas XLIIA y XLIIB; Carriles 16-29: Clonas XLIII-L; PANEL B: Carriles 1 y 30: Marcadores de 1 Kb; Carriles 2-29: Clonas LI a LXIV. No digerido y digerido. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Los insertos ligados a los plásmidos XV, XX, XXIII, XXXIX, XLIII y LIII se mandaron a secuenciar.. El análisis de las secuencias se reporta en el capítulo VII del presente trabajo de tesis.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

- Arroyo-Serralta G. A., Kú-González A., Hernández-Sotomayor S. M. T. and Zúñiga-Aguilar J. J. (2004). Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiol Biochem*. 43:27–35
- Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H., Luis A. and Marky L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3746-3750
- Chan J. L., Saénz L., Talavera C., Hornung R., Robert M. and Oropeza C. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:515–521.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissues Samples. *Biotechniques* 15:532-535
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-cloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159
- Freier S. M., Kierzek R., Jaeger J. A., Sugimoto N., Caruthers M. H., Neilson T. and Turner D. H. (1986). Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9373-9377
- Rychlik W., Spencer W. J. and Rhoads R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 18:6409-6412
- Sáenz-Carbonell L. A. (1999). Desarrollo de protocolos para la regeneración de Cocos nucifera L. a través de embriogénesis somática. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, pp.30

Capítulo VI

Análisis de secuencias de ADN complementario, correspondientes a ortólogos de MAP cinasas de Cocos nucifera L.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADNC CORRESPONDIENTES A MAP CINASAS DE CALLO DE COCOTERO DE LAS VARIEDADES ALTO DEL ATLÁNTICO Y ENANO MALAYO

Con base en el análisis de restricción del ADN plasmidico y en la determinación de la especificidad de los insertos ligados en los plásmidos, se decidió secuenciar los fragmentos ligados en los plásmidos denominados como A5, A8, A11, E5, E8 y E9 (ver **Apéndice**). El análisis "BLAST" mostró que todas las secuencias clonadas tenían un alto porcentaje de similitud con secuencias correspondientes a MAP cinasas de otras especies vegetales. (**Tabla VI.1**, sólo se presenta la comparación de la clona A8).

Tabla VI.1. Comparación de la secuencia nucleotídica de la clona A8 con bancos de datos. En el cuadro se presentan las 10 primeras secuencias parecidas a la clona A8 que arrojó el análisis "BLAST".

Secuencia Nucleotídica	Tamaño (pb)	Similitud (%)	Clave de Acceso
Triticum aestivum mitogen-activated protein kinase (FLRS) mRNA, complete cds.	1212	87	AY173962
Oryza sativa (japonica cultivar-group) mRNA for mitogen- activated protein kinase (sipk gene).	1701	87	AJ535841
Zea mays mRNA for MAP kinase 5, complete cds.	1632	86	AB016802
Zea mays PC0143674 mRNA sequence.	1715	85	AY108471
Nicotiana benthamiana NbSIPK mRNA for salicylic acid- induced protein kinase, complete cds.	1206	83	AB098730
Lycopersicon esculentum mitogen-activated protein kinase 1 (MPK1) mRNA, complete cds.	1411	83	AY261512
Capsicum annuum MAP kinase 2 (MK2) gene, complete cds.	1458	83	AF247136
Nicotiana tabacum salicylic acid-activated MAP kinase (NtSIPK) mRNA, complete cds.	1544	82	NTU94192

Continuación Tabla VI.1

Secuencia Nucleotidica	Tamaño (pb)	Similitud (%)	Clave de Acceso
Lycopersicon esculentum mitogen-activated protein kinase 2 (MPK2) mRNA, complete cds.	1485	82	AY261513
Lycopersicon esculentum mRNA for Mitogen-activated protein kinase (mpka1; 1 gene).	1432	82	AJ535702

Las secuencias obtenidas se alinearon con el objetivo de determinar el grado de similitud que tenían entre ellas. El alineamiento se efectuó empleando un programa ubicado en el sitio <u>http://antheprot-pbil.ibcp.fr/</u> (Figura 6.1).





A partir del alineamiento se observó que las secuencias tienen un alto porcentaje de similitud. El alineamiento muestra que las secuencias de las clonas A8 y A11 son iguales entre ellas, así como lo son las secuencias de las clonas E5 y E8. Por otro lado, la secuencia de la clona E9, aunque tiene un alto grado de similitud con las demás, es diferente a ellas.

Las secuencias nucleotídicas se tradujeron a su correspondiente secuencia deducida de aminoácidos (ver **Apéndice**). Estas secuencias se alinearon con un programa ubicado en el sitio <u>http://antheprot-pbil.ibcp.fr/</u> con el objetivo de determinar el grado de identidad que tenían a nivel de aminoácidos (**Figura 6.2**).

	1	10	20	30	40	50	60
88	RTLRE	LKLLRHMOH	ENVVAIROI	PPPVREIFN	DAATUAAET NO.	TOLNOTIRSH	DALSEEH
811	RTLRE	KLERHHOH	ENVVAIRDI	PPPVREIFN	WYIAYELHO	TOLNOTIRSM	GAL SEEH
ES	RTLRE	KLLRHMDH	ENVIAIRDI	PPPYREIFN	OVYTAYELMD	DLIQIIRSM	BALSEEN
EB	RTLRE	KLERHHOH	ENVIRINDI	PPPVREIFM	WYIRYELMD	TOLNOTIRSM	GALSEEH
ES	TLRE	KI L RHHOH	ENVVATEDT	PPPVRETEN	WYTAYELMD	TOL BOTTRSM	ORI SEEH
Consensus	TLRE	LKLLRHHOH	ENVIAIRDI	PPPVREIFN	DYYIRYELMD	DLIQITRSN	GALSEEN
	61	70	80	99	100	110	120
88	COYFL	YNTLRGLKY	THSANVLHR	LKPSKLLLK	NCOLKICOF	GLARTTSETD	FHTEYWY
811	COYFL	YOTLRGLKY	THSANYLHR	LKPSNLLLM	NCOLKICOF	GLARTTSETD	FNTEYVY
ES	COYFL	YQILRGLKY	INSAMVLHR	ILKPSHLLLM	WEDLKICOF	GLARTTSETD	FHTEYVY
E8	COYFL	YOTLRGLKY	THSANVLHR	ILKPSNLLLN	HCDLKICDF	GLARTTSETD	FNTEYW
E9	COYFL	YEILRGLKY	THPANYLHR	ILKPSNLLLN	NCOLKICOF	GLARTTSETD	FHTEYVY
Consensus	CQYFL	YQILRGLKY	THSANVLHR	ILKPSMLLLM	WCDLKICDFO	GLARTTSETD	FNTEYVV
	121	130	140	149			
RB	TRHYR	PELLLNSS	EYTARIDVH	VGCIF			
811	TRUYR	APELLLINSS	EYTARIDYH	YGCIF			
ES	TRHYR	RPELLLNSS	EYTAAIDGG	VGCIF			
E8	TRUYR	APELLLNSS	EYTAAIDGG	VGCIF			
E9	TRHYR	APELLLNSS	EYTAAIDVH	VGCNY			
-			and the local day of the local day is a second day of the local day of the				

Figura 6.2. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes a las secuencias clonadas de ADNc de MAP cinasas de callo de cocotero de las variedades AA y EM.

Las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con secuencias depositadas en las bases públicas para corroborar los resultados obtenidos del análisis "BLAST" con las secuencias nucleotídicas (**Tabla VI.2**, sólo se presenta la comparación de la clona A8).

Tabla VI.2. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona A8 con bancos de datos. En el cuadro se presentan las 10 primeras secuencias parecidas a la clona A8 que arrojó el análisis "BLAST".

Secuencia Peptídica	Tamaño (aa)	ldentidad (%)	Clave de Acceso
Mitogen-activated protein kinase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)].	398	96	CAD59793
Mitogen-activated protein kinase homolog mmk1 (map kinase MSK7) (Map kinase ERK1) [<i>Medicago sativa</i>].	387	95	Q07176
MAP kinase 5 [Zea mays].	399	95	BAA74734
Mitogen-activated protein kinase [Euphorbia esula].	389	95	AF242308
p45Ntf4 serine/threonine protein kinase [<i>Nicotiana tabacum</i>].	393	95	CAA58761
Mitogen-activated protein kinase [Triticum aestivum].	403	95	AA016560
MAP kinase homologue [<i>Pisum sativum</i>].	394	95	CAA50036
MAP kinase (ATMPK6) [Arabidopsis thaliana].	395	94	AAB64027
Mitogen-activated protein kinase [Solanum tuberosum].	394	94	BAB93530
Salicylic acid-activated MAP kinase [Nicotiana tabacum].	393	94	AAB58396

Con base en los resultados obtenidos, se escogieron 3 secuencias representativas de las 5 secuencias clonadas y se reportaron en la base pública EMBL (Tabla VI.3).

Las paciencies deducidas de aminoációs se comparaton con secuencies orçositadas en las bases públicas para comborar las vesultados obtenidos del enotes 'BLASTI' con tes secuencias nacioaliticas (Tetale VI.2, sólo en presente la cóncerención de la cloria AB). Tabla VI.3. Secuencias clonadas de ADNc correspondientes a MAP cinasas de callo de cocotero de las variedades AA y EM reportadas al EMBL.

Clona	Nombre	Clave de Acceso <u>EMBL</u>
A8	CnMPK1	AJ55548 <mark>9</mark>
E5	CnMPK2	AJ555490
E9	CnMPK3	AJ555491

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADNC CORRESPONDIENTES A LOS EXTREMOS 5' Y 3' DE MAP CINASAS DE HOJA DE COCOTERO VARIEDAD ALTO DEL ATLÁNTICO

Extremos 5' de MAP Cinasas

Como se reportó en el capítulo anterior, únicamente los plásmidos correspondientes a las clonas 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13 y 16 contenían un fragmento de ~850 pb, cuyo tamaño era el esperado para el extremo 5' de MAP cinasas de hoja de cocotero. Las clonas se renombraron como Cn3, Cn5, Cn8, Cn9, Cn11, Cn12, Cn13 y Cn16 y los fragmentos ligados a sus plásmidos se mandaron a secuenciar (ver **Apéndice**).

Los resultados del análisis "BLAST" mostraron que las secuencias ligadas a los plásmidos de las clonas Cn8, Cn9, Cn11, Cn12, Cn13, Cn16 mostraron un alto porcentaje (desde el 78% hasta el 83%) de similitud con secuencias correspondientes a MAP cinasas de otras especies vegetales (**Tabla VI.4**, sólo se presenta la comparación de la clona Cn11). Las secuencias ligadas a los plásmidos de las clonas Cn3 y Cn5 no mostraron similitud con genes de MAP cinasas, por lo que se excluyeron de los análisis posteriores.

Las secuencias que correspondían a genes de MAP cinasas se alinearon con el objetivo de determinar el grado de similitud que tenían entre ellas (Figura 6.3).

E) we are set already and a set of the se

Tabla VI.4. Comparación de la secuencia nucleotídica de la clona Cn11 con bancos de datos. En el cuadro se presentan las 12 primeras secuencias parecidas a la clona Cn11 que arrojó el análisis "BLAST".

Secuencia Nucleotídica	Tamaño (pb)	Similitud (%)	Clave de Acceso
Oryza sativa MAP kinase 3 mRNA, complete cds	1545	83	AF216317
Oryza sativa MAP kinase MAPK2 mRNA, complete cds.	1544	83	AF241166
Zee mays MAPK mRNA, partial cds.	414	82	AY486158
Oryza sativa (japonica cultivar-group) mRNA for putative mitogen-activated protein kinase msrmk3 (msrmk3 gene).	1371	81	AJ512642
Oryza sativa MAP kinase 2 mRNA, complete cds	1697	81	AF216316
Papaver rhoeas mRNA for putative MAP kinase (mpkc gene)	1744	80	AJ784996
P.hybride mRNA for MAP/ERK kinase 1	1611	80	X83440
Oryza sativa mRNA for MAPK4 protein (mapk4 gene).	1653	80	AJ251330
Prunus armeniaca putative mitogen-activated protein kinase MAPK mRNA, complete cds	1470	79	AF134730
Pisum sativum MAP kinase PsMAPK2 (Mapk2) mRNA, complete cds.	1630	78	AF154329
N.tabacum NTF3 mRNA	1672	78	X69971
Arabidopsis thaliana mRNA for MAP kinase, complete cds	1657	78	D21843

El análisis del alineamiento indicó que las secuencias eran muy similares. Al parecer las secuencias de las clonas Cn8 y Cn16 eran idénticas, así como ocurrió con las clonas Cn11, Cn12 y Cn13. Además, se observó que un segmento de 34 pares de bases localizado entre la base 84 y la 120 en las clonas Cn11, Cn12 y Cn13 no estaba presente en las clonas Cn8 y Cn16. Por otro lado, la Cn9 fue diferente a las demás; su secuencia tiene un fragmento de 11 bases localizado entre la bases 85 y 97, que está ausente en las clonas Cn11, Cn12 y Cn13.



Figura 6.3.- Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante PCR a partir de ADNc de hoja de cocotero Alto del Atlántico. De las clonas secuenciadas sólo se alinearon las que presentaron similitud a genes de MAP cinasas de otras especies vegetales.

Las secuencias nucleotídicas se tradujeron a su correspondiente secuencia deducida de aminoácidos (ver **Apéndice**). Estas secuencias se alinearon con el objetivo de determinar el grado de identidad que tenían a nivel de aminoácidos (**Figura 6.4**).

	1	10	20	30	40	50	60	70
Cn8+6	GPRRD	GVYRTLDAR	RHMSCAAGL	THRG	Kh	ATL VOPPNG	GNSGKHYYS	HQTLFE
Cn9	GPRRD	GYVRTLDAR	RHILCRAGL	HRGSGRYSS	DRGEXPQYGKM	AILVDPPNG	IGNSGKHYYSI	HQTLFE
Cn16	RPRRD	GYVRTLDAR	RHMLCAAGL'	THRG	Kit	AILVOPPNG	IGNSGKHYYS I	HQTLFE
Cn11	ESGLG	GHESSGRST	LGGGCYYPP	AXRGGYSS	DRGEXPQYGKM	AILYDPPNG	IGNSGKHYYSI	HADTLFE
Cn12	GGLG	GHESSGRST	LGGGCYVPP	ax <mark>rgg</mark> yssi	DRGEXPQYGK	AIL YDPPNG	IGNSGKHYYSI	HQTLFE
Cn13	GLG	GHESSGRST	LGGGCYYPP	AXRGGVSS	DREEXPQYGK	AILYDPPNG	IGNSGKHYYSI	HQTLFE
Consensus	gprrd	Gvvrtldar	run.Caagli	wRG	Kh	RILYDPPNG	GNSGKHYYSI	HQTLFE
	71	80	90	100	110	120	130	140
								ITOFFOIL
Cn8+6	TOIK	ALIKATERE	HYGYYCSSI	RETNEKYHI	KKTWMHI-DMKV	UHLRILRELP	LICHLICHEN	/IGFEGH
Cn9	IDIKY	VPIKPIGRE	AYGYVCSSI	RETNEKYAI	OKINNAFDMRV	DHLRTLREL	LIRHLRHEN	THLKUI
Cn16	IDTKY	VPIKPIGRG	RYGYVCSSI	RETNEKVAL	KINNAFDNRY	DALRTLREL	LLRHLRHEN	T ALKO1
Cn11	IDTKY	VPIKPIGRG	AYGYYCSSII	RETNEKVRI	KKINNAFDNRY	DALRTLREL	LLRHLRHEN	TALKDI
Cn12	IDTKY	VPIKPIGRG	AYGVVCSSI	RETNEKVAL	KINNAFDNRV	DALRTLREL	LLRHLRHEN	TALKO
Cn13	TOLK	VPIKPIGRG	AYGYVCSSI	RETREKVAL	CKINNEFUNRY	DHERTEREL	LIRHLRHEN	THLKU
Consensus	IDIKY	VPIKPIGRG	AYGVVCSSI	RETNERVAL	KKINNAFDNRV	DALRTLREL	LIRHLRHEN	/Ialkdi
	141	150	160	170	180	190	200	210
Co8+6	HDASO	XEKI OGCTP	SI XTHGYXP	SOYOVITST	EXXPL PTESL	I RGI KYL HS	ANTI HRDI KI	PGNIL VI
Co9	MHPAN	RKSEKOVYL	VYEL NOTOL	INTTKSSRAL	SNDHCOYFLED	I RGL KYL HS	ANTL HRDLK	PGNLLV
Cn16	HHPAN	RKSFKDVYL	VYEL NOTOL	INTTKSSORL	SNOHCOYFLEO	L RGL KYL HS	ANTLHROLK	PGNIL VI
Cn11	MHPAN	RKSFKOVYL	VYEL NOTOL	IOTTKSSOAL	SMOHCOYFLED	L RGI KYL HS	ANTL HROLK	PGNLL VA
Cn12	HHPAN	RKSFKOVYL	VYEL NOTOL	ADTTKSSOAL	SNOHCOYFLED	L RGL KYL HS	ANTI HROLKI	PGNLL VN
Co13	HHPAN	RKSFKDVYL	VYEL NOTOL	INTTKSSOAL	SNOHEOYELEO	L RGL KYL HS	ANTLHEDI KI	PGMLL VN
Consensus	nnpa	rksfkdvyl	vyelndtdl	qiikss.al	sndhcqyF1f0	LLRGLKYLHS	ANILHROLK	GNILLYN
	211	220	230	240	250	260	267	
Cn8+G	ANCOL	KICDFGLAR	TSNGKNQFN	EYVVTRHYR	RPELLLCCON	DTSIDVHSVE	DOM .	
Cn9	ANCOL	KICDFGLAR	TSNGKNOFN	EYVYTRHYR	RPELLLCCDW	OTSIDVWYS	LINI	
Cn16	ANCOL	KICDFGLAR	TSNGKNQFM	TEYVVTRHYR	RPELLLCCON	DISIDVASVE	XIF	
Cn11	ANCOL	KICDFGLAR	TSNGKNQFN	TEYYYTRHYH	APELLLCCON	DTSIDVMSVE	XIF	
Cn12	ANCOL	KICOFGLAR	TSNGKNQFM	EYVVTRUYR	APELLLCCON	DTSIDVHSVE	XMF	
Cn13	ANCOL	KICOFGLAR	TSNGKNQFN	TEYYYTRHYR	RPELLLCCONY	DTSIDVHSVE	DCLF	
Consensus	ANCOL	KICDFGLAA	TSMGKNOFH	TEYYYTRHYR	APELLLCCDN	DTSIDVHave	Nee	

Figura 6.4. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes a MAP cinasas de hoja de cocotero Alto del Atlántico.

Las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con secuencias depositadas en las bases públicas para corroborar los resultados obtenidos del análisis "BLAST" con las secuencias nucleotídicas (**Tabla VI.5**, sólo se presenta la comparación de la clona Cn13).

In a long time and the second second set of the contract of the S is the

Tabla VI.5. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona Cn13 con bancos de datos. En el cuadro se presentan las 12 primeras secuencias parecidas a la clona Cn13 que arrojó el análisis "BLAST".

Secuencia Peptídica	Tamaño (aa)	ldentidad (%)	Clave de Acceso
MAP kinase 2 [Oryza sativa].	369	84	AAG40580
MAP kinase 3 [Oryza sativa].	370	84	AAG40581
Putative mitogen-activated protein kinase, msrmk3 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)].	369	84	CAD54741
MAP kinase PsMAPK2 [Pisum sativum].	372	83	AAF73257
MAPK4 protein [Oryza sativa].	369	83	CAB61889
MAP kinase (ATMPK7) [Arabidopsis thaliana].	368	83	AAD31349
NTF3 [Nicotiana tabacum].	372	82	CAA49592
MAP/ERK kinase 1 [Petunia x hybrida].	384	82	CAA58466
Putative MAP kinase [Papaver rhoeas].	368	81	CAH05024
Putative mitogen-activated protein kinase [Schedonorus arundinaceus].	369	81	CAG23921
ATMPK2 [Arabidopsis thaliana].	376	80	BAA03536
ATMPK1 [Arabidopsis thaliana].	370	80	BAA03535

En el análisis "BLAST de la clona Cn9, la metionina (aminoácido 44) alineó con la metionina que determinaba el inicio de la traducción, al menos en las primeras 10 secuencias similares a ella, indicando que probablemente dentro de la secuencia de la clona Cn9 estaba el inicio de la traducción. Por lo tanto, la región hacia 5' antes de esta metionina, en la secuencia nucleotídica, podría corresponder a la región no traducible del gen. En la **Figura 6.5** se presenta un alineamiento de la clona Cn9 con las 10 primeras secuencias que mostraron identidad con ella.



Figura 6.5. Alineamiento de Cn9 con las primeras 10 secuencias similares a ella que arrojó el análisis "BLAST". Se señalan los motivos conservados que se utilizaron para diseñar cebadores degenerados en el grupo del Dr. José Juan Zúñiga; cebador PIG (.....), cebador MK-I (---), cebador JUGLAR (---), cebador MK-IX (-----). El recuadro señala el motivo característico conservado de las MAP cinasas en plantas (TEY).

En el alineamiento el primer aminoácido de todas ellas, metionina, alineó con la metionina 44 de la clona Cn9 (Figura 6.5). La región comprendida del aminoácido 1 al 43 (129 nucleótidos) en la clona Cn9, que no alineó con ninguna secuencia de las demás, podría corresponder a la región no traducible del ARNm. Por otro lado, en las 11 secuencias se observan regiones casi idénticas a regiones altamente conservadas que se seleccionaron para diseñar, en el laboratorio, los cebadores degenerados PIG, JUGLAR, MK-I y MK-IX. Por último, en todas las secuencias, está presente la firma que identifica a la mayoría de las MAP cinasas de plantas, el motivo conservado TEY. Evidencias experimentales sugieren que la fosforilación de la treonina y tirosina es un requisito para que se active de manera completa la enzima. Todas estas evidencias se observaron en los análisis "BLAST" de las otras secuencias de MAP cinasas clonadas, a saber Cn8, Cn11, Cn12, Cn13 y Cn16 (datos no mostrados).

Estos resultados indican que se clonaron 3 secuencias correspondientes al extremo 5' de genes de MAP cinasas, probablemente incluyendo el inicio de la traducción, además de la región o parte de la región no traducible.

Extremo 3' de MAP cinasas

Como se reportó en el capítulo anterior, únicamente los plásmidos correspondientes a las clonas denominadas como XIII, XV, XX, XXIII, XXXIX, XLIII y LIII contenían el fragmento de ~1,018 pb, tamaño que se aproximaba al esperado para el extremo 3' de MAP cinasas de hoja de cocotero. Las clonas se renombraron como CnXIII, CnXV, CnXX, CnXXIII, CnXXXIX, CnXLIII y CnLIII y los fragmentos ligados a sus plásmidos se secuenciaron (ver **Apéndice**). Las secuencias de nucleótidos variaron en cuanto a tamaño, el fragmento de menor tamaño fue de 903 pb, y el mayor de 937. Este hecho se debió a que se secuenció únicamente una cadena de ADN; en una reacción de secuenciación sólo se pueden secuenciar de 900 a 1000 bases. Únicamente los insertos de los plásmidos de las clonas CnXIII, CnXV, CnXXIII, y CnXLIII fueron similares a secuencias correspondientes a MAP cinasas de otras especies vegetales (**Tabla VI.6**, sólo se presenta la comparación de la clona CnXIII).

Tabla VI.6. Comparación de la secuencia nucleotídica de la clona CnXIII con bancos de datos. En el cuadro se presentan las 12 primeras secuencias parecidas a la clona CnXIII que arrojó el análisis "BLAST".

Secuencia Nucleotidica	Tamaño (pb)	Similitud (%)	Clave de Acceso
Cocos nucifera partial mRNA for mitogen activated protein kinase, clone 1.	447	95	AJ555489
Cocos nucifera partial mRNA for mitogen activated protein kinase, clone 3.	447	94	AJ555491
Cocos nucifera partial mRNA for mitogen activated protein kinase, clone 2.	447	95	AJ555490
Triticum aestivum mitogen-activated protein kinase (FLRS) mRNA, complete cds.	1212	87	AY173962
Oryza sativa (japonica cultivar-group) mRNA for mitogen- activated protein kinase (sipk gene).	1701	85	AJ535841
Oryza sativa (japonica cultivar-group) MAPK6 mRNA for MAP kinase 6, complete cds.	1678	85	AB183398
Zea mays mRNA for MAP kinase 5, complete cds.	1632	85	AB016802
Nicotiana benthamiana NbSIPK mRNA for salicylic acid- induced protein kinase, complete cds.	1206	84	AB098730
Capsicum chinense partial mRNA for mitogen-activated protein kinase 1 (MPK1 gene).	549	84	AJ608158
Lycopersicon esculentum mitogen-activated protein kinase 1 (MPK1) mRNA, complete cds.	1411	84	AY261512
Papaver rhoeas mRNA for putative MAP kinase (mpkb gene).	1752	82	AJ784995
Glycine max mitogen-activated protein kinase 2 mRNA, complete cds.	1186	82	AF329506

Las secuencias que correspondían a genes de MAP cinasas se alinearon con el objetivo de determinar el grado de similitud que tenían entre ellas (**Figura 6.6**).



Figura 6.6. Alineamiento de probables secuencias correspondientes a extremos 3' de genes de MAP cinasas obtenidas mediante ensayos tipo RACE a partir de ADNc de hoja de cocotero Alto del Atlántico.

El análisis del alineamiento indicó que las secuencias son muy similares. Al parecer, la clona CnXIII es la que tiene un menor grado de similitud a las otras; en su secuencia está ausente un fragmento de 78 bases presente en las otras. Por otra parte, se observa que en la secuencia de las clonas XIII, XV y XXIII está incluida parte de la cola de adeninas, característica de los ARNm; este hecho sugiere que en estos extremos 3' clonados se encuentra la región 3' no traducible del gen.

Debido a que las secuencias están incompletas no se puede determinar el grado de similitud entre ellas, ni se puede saber cuántas secuencias diferentes se clonaron. Es necesario volver a secuenciar los insertos solicitando que se la secuenciación se realice en ambas direcciones (3'-5' y 5'-3').

Las secuencias nucleotídicas se tradujeron a su correspondiente secuencia deducida de aminoácidos (ver Apéndice). Estas secuencias alinearon con el objetivo de determinar el grado de identidad que tenían a nivel de aminoácidos (Figura 6.7).

		10	~	DEL	-	2000	
CAXIII						DIFRIM	CLRST
CnXV							
III)0(n)							
CONLIII	RTLREL	KLLRHNDI	IENVIRIEDI	PPSYNUTYN	MAJUAKETHO.	TELHETTRSH	INLSEE
Conservation	*****						
	61	70	80	30	100	110	12
CnXIII	SISFIR	SFVDMI	IQ-OFFTET	XNPSHLLLN	NCOLKICOF	LARTISETO	TIEYN
CnXV			KESSO	LKPSHLLLH	RECOLICEOF	LARTISETO	
CNICETTE			PSU		TADBG-ALM	- [HK] 159-110	
Crife III	LIMLI	UTTENTK		ALCONT 1	MULKILLI	LINI ISL IU	HILT
Lonsonsus	******	****K**	1	HO SHILLIN	auconstream	LINKI ISC IL	THE T
	121	130	140	150	160	170	10
CnXIII	TRUTYRO	PELLINS	SEVIMOUSE	TECTLUNION	GNLYF GEGT	ICTSTUCXUS	THAD-
CnXV	TRAVE	raus	C YTERONY	TOCIN			1000
Children	TREATER		SETTING UNIT	TOLIFIEL			TOPP
Connectin	TOWNER		ET YTOMUNU	WCCTT-Al-	this line of		10 Put
Lonsonsus	I FOR THEIR	TULUES	ATTELOTIC	TULLINGLE	a shu bit a	sendtr TTHE	
	181	190	200	210	224	230	24
UnXIII			HTTY KURG-			VIHUNPSLE	FILL R
CnXV	AOLOF7		COLPHERO	FPGR PHV	A ATOL TERM	TEDRORIT	TELEVILLE
CNOCIII	IDLU Y	N N N			LILLULTLKI		
CINKLIII	HULLE-H		LUL PRIMA	PUGPHWE		IFUPPURATE	
Longensur	sara,	nenerey.	-drie. aco	a best laws	aratur . esce	cea phe trac	- Long La
	241	200	260	2/0	250	290	30
-							
CuXIII	PYLASL	HUISDEP	TCHIPT STUFF		EL I YOEHVH	NPETUCKES	THE I
COXY	PTUBL	HUISDEP	CUMPTSFUE		C THERE	HEPE YOU UP	
CARLETT	PTLHEL	MILSUEP			CITYPEND	FREE YOUVER	
Linguist	UVI LAS			and a state of the	This I West Maria	AND TRACK	tink bill
CONNENSOR	TILINE	THE SECT			and reprint the		
	301	31.0	320	330	340	350	36
IIIXa	PLTS	THATERC	CYNEWRYCH	IL ROFTLES		SREWILLEKED	MORCE
CuXV	PL-IS8	THYTERC	KCYXFVHVCH	IL ROFTL FE	UPSERR	POVILIFICED	RIDACE
CnWXIII	PLTFDO	RNSCGFC	ICLLLIRPCT	LCASPELFD	REHD:LXSERD	ELXYGEYTHY	THELT
CnHLIII	PLISAF	HI					
Curaterature	PLING,	linvfat	lugar since	this Hilly	K Ipana	gryvnifkyd	miate
	361	370	390 39	1			
-	1						
Catili	VLTLF	-411/15	RECEPCER				
LINKY	VLTLI	-LLIN IS	TRACKING				
CONVITE	I VITTO			e			
CHICIT	LYNTPY	ENLINTE	FORGOOGGOO	6			

Figura 6.7. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes al extremo 3´ de MAP cinasas de hoja de cocotero Alto del Atlántico.

Las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con secuencias depositadas en las bases públicas para corroborar los resultados obtenidos del análisis "BLAST" con las secuencias nucleotídicas (**Tabla VI.7**, sólo se presenta la comparación de la clona CnXV).

Tabla VI.7. Comparación de la secuencia deducida a aminoácidos de la clona CnXV con bancos de datos. En el cuadro se presentan las 12 primeras secuencias parecidas a la clona CnXV que arrojó el análisis "BLAST".

Secuencia Peptídica	Tamaño (aa)	ldentidad (%)	Clave de Acceso
MAP kinase 6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)].	398	93	BAD69291
MAP kinase 5 [Zea mays].	399	92	BAA74734
Putative MAP kinase [Papaver rhoeas].	403	89	CAH05023
Mitogen-activated protein kinase 2 [Glycine max].	391	88	AAQ14867
Mitogen-activated protein kinase homolog MMK1 (MAP kinase MSK7) (MAP kinase ERK1).	387	88	Q07176
MAP kinase homologue [<i>Pisum sativum</i>].	394	88	CAA50036
Mitogen-activated protein kinase [Triticum aestivum].	403	87	AAO16560
Mitogen-activated protein kinase [Euphorbia esula].	389	87	AAF65766
P45Ntf4 serine/threonine protein kinase [Nicotiana tabacum].	393	86	CAA58761
Mitogen-activated protein kinase [Lycopersicon esculentum].	396	85	CAD59691
Mitogen-activated protein kinase 1 [Lycopersicon esculentum].	396	85	AAP20419
Salicylic acid-activated MAP kinase [Nicotiana tabacum].	393	85	AAB58396

Con el objetivo de determinar si se contaba con algún marco de lectura abierto de MAP cinasas, las secuencias de ADNc correspondientes a los extremos 5' y 3' de MAP cinasas se alinearon (ver esquema de la **Figura 6.8**). El alineamiento indicó (**Figura 6.9**) que los extremos clonados pertenecían a genes diferentes. Ninguna de las secuencias de las clonas Cn8, Cn9, Cn11, Cn12, Cn13 y Cn16 era idéntica a alguna de las secuencias de las clonas CnXIII, CnXV, CnXXIII o CnXLIII en la región de ~447 bases, común a ambos extremos (ver **Figuras 6.8 y 6.9**). El alineamiento de sus correspondientes secuencias deducidas de aminoácidos arrojó los mismos resultados (**Figura 6.10**). En conclusión, las secuencias clonadas corresponden a genes de 4 probables diferentes MAP cinasas.



Figura 6.8. Esquema que representa de manera gráfica la forma por la que se pueden identificar posibles marcos de lectura completos de genes amplificados por separado mediante la estrategia tipo RACE.

	-	
		CAASSTIL
	-18	(mesous)
	in.	-

Ca9 REARCETTECETERRECTCETTESCENTCTRESCATERARATETTATTECTTERREGEREATENTERTE Ca9 REARCETTECETERRECTCETTESCENTCTRESCATERARATETTATTECTTERREGEREATENTERTE Ca12 REARCETTECETERRECTCETTESCENTCTRESCATERARATETTATTECTTERREGEREATENTERTE Ca12 REARCETTECETERRECTCETTESCENTCTRESCENTETRETECTTERREGEREATENTERTE Ca12 REARCETTECETERRECTCETTESCENTCTRESCENTERTRETETTESCTTERREGEREATENTERTE Ca13 REARCETTECETERRECTCETTESCENTCTRESCENTERTRETTESCTTERREGEREATENTERTE Ca15 REARCETTECETERRECTCETTESCENTERTESCENTERTRETTETTESCTTERREGEREATENTERTE CA15 REARCETTECETERRECTCETTESCENTERTESCENTERTRETTETTESTTERREGEREATENTERTE CA15 REARCETTESCETERRECTCETTESCENTERTRESCENTERTRETTESTTERREGEREATENTERTE CA15 REARCETTESCETERRECTCETTESCENTERTESCENTERTRETTESTTERREGEREATENTERTETTER CA15 REARCETTESCETTESCENTERTESCENTERRETETTERTESTTERREGEREATENTERTETTER CA15 REARCETTESCETTESCENTERTESCENTERRETETTERTESTTERREGEREATENTERTETTERTESTTERREFERENTERTETTERTESTTERREFERENTERTETTERTESTTERREFERENTERTETTER CA15 REARCETTESCENTER CA15 REARCETTESCENTESCENTER CA15 REARCETTESCENTER CA15 REARCETTESCENTESCENTER CA15 REARCETTESCENTESCENTESCENTER CA15 REARCETTESCENTESCENTESCENTESCENTESCENTES CA15 REARCETTESCENTESCENTESCENTESCENTES CA15 REARCETTESCENTESCENTESCENTESCENTESCENTES CA15 REARCETTESCENTESCENTESCENTESCENTESCENTES CA15 REARCETTESCENTESCENTESCENTESCENTESCENTESCENTESCENTES CA15 REARCETTESCENT	CREC
CAS INSINGLY TREATING TRAVE TRAVE TRAVET CONCENT CITICACCAT CONTINUE AT INTEGET TRANSPORTED TRAVET CALL INSINGLY TREATING TRAVET CONTINUES CONTINUES TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVET CALL INSINGLY TREATING TRAVET CONTINUES CONTINUES TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVET CALL INSINGLY TREATING TRAVET CONTINUES TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVET CALL INSINGLY TREATING TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVET CALL INSINGLY TREATING TO TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVETA AND A CONTINUES TO TRAVET CALL INSINGLY TRAVET AND A CONTINUES TO TRAVETA AND A CONTINUES TO TRAVET CALL INSINGLY AND A CONTINUES TO TRAVETA AND A CONTINUES AND A CONTINUES TO TRAVETA AND A CONTINUES AND A	COSC
CHLE INCHLES TREAT CALL CALL CALL CALL CALL CALL CALL CA	COCC
CAULTI CTTCGCCCCTGGCTCTGGTCTTGTTTTTCCTTTCCCTTCCGGAUCTICAU	COSC
Calor Caloriti	ETTC
Provide the second se	
	180
CxS CRATAGGARAGACTICARGGATETETICCTRGTTTATEAGCTOTIGGTACTACCTACCTACATCARGTTATCARGTC CxLL CRATAGGARAGACTICARGGATETETICCTRGTTTATAGACTOTIGGTACTARCTACCTACATCARGTCATATCARGTC	TCAC
CAL2 CARTAGGAMMACTICARGGATGTATCCIRGTTATCAGCTCRGCTCACATCAGATTATCAGGTC CAL6 CARTAGGAMMACTICARGGATGTATCCIRGTTATCAGCTCRGCTCACATCAGATTATCAGGTC	TCAC
CALS CHATTAGGAMAGACTICAGGATTATATACTAGTTTATAGACTCATGGATACTAGCCTGCATCAGATTATCGASTC CMULIII TGTGTGGGATACATACARTGATGTCTTGCATTGCATTATGGATACCTGATCTGAT	TCAC MATC MATC
CaNOTI Canoness	
161 1/0 180 190 208 210 220 230	240
CNG REGECT FICTARIARCELTECHTELTECT FOR THE TECHTER FOR THE TECHTER	CHIH
Cn1 ARCRETTCTNATERCATTECCATATITCCTTTCATETECTCARGACTERATITCTTCACTAGEN	CATA
CALS ARGENET TICTARTERECRITECEARTRETTECTCTTCRETECTICARGAETGARGETTECTCRETERGAR	CATA
Cavelli ARGETTIGTETSAGERGENETGTERGTATTATENGATECTICATTERTATARATATACATITAGERA CAVELI ARGETTIGTETSAGERGENETGTERGATATTECTTTATENGATECTICGTEGATTANATATATACATITAGERA CAVE	TGTT
Consesses a.gc., t.tct. a.ga.ca.t., ca.tattt.ct.t., cag.t.cttcg., ga.t.aa.tat, t.ca.t.agcaan	Lett
241 259 250 270 299 290 300 31.8	320
CaD CTCCRCRGRGRCTTGRAGCC-TGGGRRCCTRCTGGGRATGCARATTGCGDCCTCARGATTTGCGTTTGGTTG Ca9 CTCCRCRGRGRCTTGRAGCC-TGGGRRCCTRCTRGTGGRATGCARATTGCGDCCTCARGATTTGGTTTTGGTTTG	
CALL CTCORCREMENCTTERNECC-TEGENOCTRCTEGTERNECTGRENTTEGENCCTCREMENTTEGENTTTEGENC CAL2 CTCORCREMENCTTERNECC-TEGENCCTRCTEGTERNETTEGENCCTCREMENTTEGENTTTEGENT	
CnLD C LCURRAGNER, TIGNIGLE - IGGINGL, INCIGNIGLING TIGGENELLING TIGGENELLINGENELLING TIGGENELLING TIGGENELLI	
CAXLLI CITCREAGAGECTTARNACCCAGECRECTECTETRAATGETRACTGTGTTTARREATTTGEGGETTTGGGET CAXUE CITCREAGAGECTTARNACCCAGECRECTECTETRAATGETRACTGTGGTTTARREATTTGEGGETTTGGGET	ST 23
CALOFITT CTTCRCRCRCRCTTRPSCENECONCTUCTCT-RONTECTRPCTFGCTTTRRSDITTETGD-TTTGRC- Commensus CTLCRCRCRCRCRCRCRCRCCTCCTCLADDITCCRCRCRCRLCRCRCRCRCRCRCRCRCRCRCRCRCRCRC	
3291 3340 340 350 364 370 380 399	400
Cn9 GCRCCAGTRATGGRAGRATCRATTCRTBACTGRATATGTTSTCRCCCCCTGGTATCGGCCCCCCGRGCTGCTCC Cn9 GCRCCAGTRATGGRAGRATCRATTCRTBACTGRATAGTTSTCRCCCCCCGGTATCGGCCCCTGRGCTGCTCC	TTEC
CALL GORCENETRITSGRANGRATERATTERETERATIFICITERETERETERETERETERETERETERETERETERETER	TTEC
CALS GUICES THE SEMERARY CHE TO THAT AND THE TO THE COMPANY AND THE CALS GUICES THE CARD AND THE SEMERATION OF THE TOTAL AND THE SEMERATION OF THE SEMERATIO	TTEC
CAXILI STRC-TRECTOR RATES TTO A TRADE A STATE TO TRACADE A STATE DE CACERER CONTRACTOR A STATE DE CACERER CONTRACTOR A STATE DE CACERER CONTRACTOR A STATE DE CACERER CONTRACTOR A STATE DE CACERER A STATE DE CACERER CONTRACTOR A STATE DE CACERER CONTRACTOR A STATE	
CANCELLE GTRCTRECTCHGARACTERTTICATEACHGASTATGTTSTRACHARTESTACROBECCCCAGAGCATTETT Consesses GLRCTReoLoAgAcRoTgRLTICATEACGRgTRTGTTSTaRCagSoTESTRLOGECcCCcARGCTgLTat	EAST goot
401 410 420 430 440 45652	
C=0 TGTGRTAGCCATGRCACCTCCRTTGRTGTATGG-TCTGT8GSTTGRATGTT C=0 TGTGRTAGCCATGRCACCTCCRTTGRTGTTTGGGTCGGTCGGTCGGTTGRATGTTC	
Col1 TGTONTACTOTGACHOCTCONTGATGTATCO-TCASTAGGTTGANTTTC Col2 TGTONTACTOTGACHOCTCONTGATGTTGG-TCASTGGGTTGANTGTTC	
CALC TGTGNTNCTNTGNCNCCCCCNTTGNTGTGTGG-TCNSTGGGTTGNTTTC CALC TGTGNTNCTNTGNCNCCCCCNTTGNTGTGTGG-TCNSTGGTTGNTTTC	
CARLELL ICTICAGE INTICIDENCENTION ENTERICIDE - TETETERSTERCTION	





Figura 6.10. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes a las secuencias nucleotídicas de los extremos 5' y 3' de genes de MAP cinasas amplificadas mediante ensayos tipo RACE.
CONCLUSIONES

Debido al grado de conservación que presentan las MAP cinasas en los organismos eucariotes, fue posible amplificar por RT-PCR y clonar tres secuencias de ADNc correspondientes a MAP cinasas de callo de cocotero de las variedades Alto del Atlántico y Enano Malayo, usando como cebadores a los oligonucleótidos degenerados MK-I y MK-IX. Las secuencias obtenidas fueron reportadas en la base pública EMBL.

Mediante ensayos tipos RACE se lograron clonar las secuencias correspondientes a los extremos 5' y 3' de al menos 4 diferentes MAP cinasas de hoja cocotero de la variedad Alto del Atlántico. El análisis de las secuencias sugiere que en las secuencias están presentes las regiones 5' y 3' no traducibles, y el sitio del inicio de la traducción.

Las secuencias clonadas van a utilizarse como sondas para evaluar la expresión diferencial de genes de MAP cinasas en callos de cocotero expuestos a un inductor de las respuestas de defensa, el quitosano.

CONCLUSIONES

Debido al grado de conservación que presentan da MAP etrases en los organismos eucanoles, fue posible amplificar por RT-PCR y clonar tres secuencida de ADNe contrapondientes a MAP cinases de calló de cocotero de las variedades Año del Attentico y Eneno Maleyo, asando como cebedores a los oligonaciostidos - degenerados MC-F y MA-IX. Las escuencias obtenidas fueran raportudas en la base poblica EMBL.

Madiante ensayos tipos RACE se lograren dioter las antuncias contrepondientes a los extremos 5' y 3' de al menos 4 diferentes NAP cingent do hoja cobotero de la variedad Alto del Altántico. El análisis de las secuencias suplete que en las secuencias están presentes las regiones 5 y 3' no traducibles, y el alto del Inicio de la traducción.

Las sectionness clonadas ven a utilizaren como eundos prina evenuar la expresión diferencial de genera de MAP cinazas en calcer de occeler o expuesióa a un inductor de las metimetas de defansa, el quitosano.

Capítulo VII

Discusión General

En términos botánicos, las plantas son organismos sésiles, es decir, están arraigadas a un sustrato del cual no pueden desprenderse, y por lo tanto, no pueden desplazarse. Debido a esto, las plantas deben adaptarse a las condiciones ambientales ajustando su metabolismo. Por lo tanto, es de suma importancia entender de qué manera las plantas perciben estímulos externos y cómo estos estímulos con convertidos en señales endógenas que eventualmente desembocan en adaptación fisiológica (Zhang y Klessig, 2001).

Las plantas poseen redes de señalización integradas que median entre la percepción y la respuesta ante fitoreguladores, nutrientes, estímulos y diferentes tipos de estrés ambiental (Tena et al., 2001). En diversos modelos vegetales y especies de importancia económica, se ha determinado que la vía de señalización integrada por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) juega un papel importante en las respuestas de las plantas ante diversos tipos de estrés. tanto biótico como abiótico, entre los que se incluyen la invasión por patógenos, el daño por herida, la alta salinidad, la alta o la baja osmolaridad, las temperaturas extremas, la seguía, las especies reactivas de oxígeno, el ozono y la radiación ultravioleta (Zhang y Klessig, 2001). Se sabe que una vez percibido el estímulo y activada la vía, el último miembro de la cascada fosforila sustratos en el citosol o puede traslocarse al núcleo en donde puede activar, por fosforilación, factores de transcripción que intervienen en la transcripción de genes, cuyos productos pueden estar encaminados a contender o adaptarse a las condiciones ambientales percibidas (Adachi et al., 1999; Volmat et al., 2001; Cheong et al., 2003; Kim y Zhang, 2004; Lee et al., 2004; Andreasson et al., 2005; Katou et al., 2005; Yap et al., 2005).

El ataque de patógenos de diversa naturaleza a especies económicamente importantes ha ocasionado considerables pérdidas, impactando económica y socialmente a comunidades y países enteros (Parry *et. al.*, 1995; Windels, 2000; Birch y Whisson, 2002; Brlansky *et al.*, 2002; Sesma y Osbourn, 2004).

La palma de coco o cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una especie ecológica y económicamente importante principalmente en los trópicos. Esta especie es atacada por patógenos de diversa naturaleza (Joseph y Radha, 1975; Parthasarathy *et al.*, 1978; Griffith, 1987; Howard y Barrant, 1989; Rohde *et al.*, 1990; Hanold y Randles, 1991). En años recientes se descubrió que la palma está sucumbiendo ante la enfermedad del Amarillamiento Letal, una enfermedad epidémica mortal causada por un organismo tipo micoplasma (Oropeza y Zizumbo, 1997; Dollet, 1999). A la fecha, hay muy pocos estudios encaminados a comprender la fisiología de la interacción cocotero-pátogeno. El entendimiento de los fenómenos bioquímicos y moleculares que se suscitan en esta interacción, y la comprensión de la manera en que la palma contiende ante éstos puede ayudarnos a proponer soluciones específicas ante el problema de la devastación que está sufriendo esta palma.

Como un paso a la solución, se decidió explorar si las MAP cinasas estaban involucradas en la transducción de la señal después de la percepción de un compuesto derivado de la pared celular de hongos fitopatógenos. Dada la imposibilidad de usar a la palma completa para nuestro estudio, con base en su gran tamaño, su largo ciclo de vida, y la falta de condiciones controladas y asépticas, se decidió explorar la posibilidad de utilizar algún cultivo *in vitro*. Desafortunadamente, *Cocos nuclfera* ha sido una especie recalcitrante al establecimiento de cultivos *in vitro*. A la fecha no se cuenta con un cultivo de células en suspensión, y la regeneración de plántulas por embriogénesis somática es un proceso largo y no optimizado. En contraste, el cultivo *in vitro* de callos recientemente optimizado con el uso de carbón activado resultó una alternativa viable para el estudio de la interacción cocotero-patógeno (Chan *et al.*, 1998). Es así que, bajo condiciones asépticas y controladas de nutrientes, se usó el callo de cocotero para determinar si en la presencia del inductor de origen fúngico, quitosano, se inducía la activación de las MAP cinasa a nivel transcripcional y postraduccional.

En un ensayo de tiempo-respuesta se observó, mediante el ensayo de cinasa en gel, que una cinasa de ~46 kDa se activó en presencia de 10 mg mL⁻¹ de quitosano. El incremento de la actividad se evidenció a partir de los 10 min de inducción, alcanzando su máximo a los 40 min y manteniendo una actividad alta hasta los 80 min. Mediante ensayos de inmunodetección, empleando un anticuerpo dirigido contra el motivo o firma característica de las MAP cinasas en su estado bisfosforilado (pTEpY), se detectó a una proteína de la misma masa molecular que modificó su actividad debido al tratamiento con el inductor quitosano. Esto sugirió que la cinasa de ~46 kDa y la proteína inmunodetección positiva en un extracto total, empleando el anticuerpo en cuestión, refleja la existencia de MAP cinasas que fueron activadas *in vivo* y que, bajo las condiciones en las que se efectúa el ensayo, reflejan este estado en el ensayo de cinasa en gel (Lee *et al.*, 2001). Cabe recordar que las MAP cinasas se activan únicamente después de que los residuos en tirosina y treonina, en este tripéptido, están fosforilados (Canagarajah *et al.*, 1997).

El comportamiento de esta cinasa difiere, en parte, al observado para algunas MAP cinasas de otras especies vegetales. En modelos, tales como tabaco (Zhang y Klessig, 1998; Suzuki, 1999), perejil (Ligterink *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003), *Arabidopsis* (Desikan *et al.*, 1999; Nühse *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001), tomate (Link *et al.*, 2002) y alfalfa (Cardinale *et al.*, 2000), se ha observado una rápida activación de MAP cinasa como en cocotero; sin embargo, esta actividad disminuyó a niveles basales después de 30 a 60 min de tratamiento, en promedio. En un híbrido del álamo (*Populus trichocarpa × Populus deltoides*), Hamel y colaboradores observaron que el tratamiento con quitosano inducía una MAP cinasa de ~47 kDa. Esta actividad aparecía a los 5 min del tratamiento y retornaba a su estado basal a los 25 min (Hamel *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha observado que en tabaco, empleando inductores fúngicos de naturaleza proteica, criptogeina y parasiticeina (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998), la actividad se mantiene después de los 80 min, llegando a su estado basal hasta las 8 h después del tratamiento.

A continuación, se decidió investigar si las señales observadas en el ensavo de cinasa en gel eran consecuencia de un fenómeno de autofosforilación y no a la fosforilación propia de la MBP, ya que, evidencias en varios modelos vegetales han mostrado que diversas cinasas, entre ellas las MAP cinasas, pueden tener la capacidad de autofosforilarse in vitro (Jonak et al., 1996; Takezawa, 1999; Huang et al., 2000; Xiong y Yang, 2003). El resultado del ensavo de autofosfonilación mostró que dos cinasas, una de ~46 kDa y la otra de ~42 kDa, incorporaron el fósforo radiactivo en ausencia de sustrato (MBP). Estas evidencias sugirieron que las señales detectadas en el ensayo de cinasa en gel (Figura 2A, Lizama-Uc et al., 2007) podrían ser no solamente resultado de la fosforilación de la MPB por parte de estas cinasas, sino también de una probable autofosforilación de estas proteínas. Si se comparan los resultados mostrados del ensavo de cinasa en gel (Figura 2, Lizama-Uc et al., 2007) con la Figura 4.1, se observa que, así como las cinasas fosforilan a la MBP, también se autofosforilan, pero en menor proporción con la que fosforilan a la MBP. Estos resultados difieren de los obtenidos por Romeis y colaboradores (Romeis et al. 1999), en donde se caracterizó la activación de dos MAP cinasas de 46 kDa y 48 kDa dependiente de Avr9/Cf-9, en cultivos celulares y hojas de tabaco. En ese trabajo, no se observó el fenómeno de autofosforilación. El hecho de que este fenómeno puede presentarse o no, obliga a realizar el ensavo de fosforilación para las MAP cinasas, sin añadir sustrato al gel, como parte de la caracterización de toda actividad de MAP cinasa.

La pregunta que a continuación se debería responder era si la cinasa de ~46 kDa, que aumentó su actividad como resultado del tratamiento de células de callo de cocotero con quitosano, era la misma que fue inmunodetectada con los anticuerpos dirigidos contra MAP cinasas activadas. Para contestar esta pregunta una de las estrategias a seguir podría ser inmunoprecipitar a la proteína inmunodetectada con el anticuerpo anti p-ERK 1/2 y realizar un ensayo de actividad de cinasa en gel con la proteína que se precipitó. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado (Suzuki y Shinshi, 1995; Zhang *et al.*, 1998; Cardinale *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2000; Daxberger *et al.*, 2006; Hadiarto *et al.*, 2006) para determinar la correspondencia entre una actividad de cinasa con la proteína que se sospecha corresponde dicha actividad.

En un ensayo preliminar se decidió determinar si los anticuerpos anti p-ERK 1/2 podían inmunoprecipitar a la proteína que detectó mediante Western blot. Este ensayo fue necesario, ya que habían reportes de que el anticuerpo dirigido contra el motivo bisfosforilado pTEpY de las MAP cinasas era incapaz de inmunoprecipitarlas (Arroyo-Serralta *et al.*, 2004). De acuerdo a los resultados mostrados en la **Figura 3.2**, el anticuerpo se une y precipita a una proteína de ~46 kDa. Sin embargo, se observa en los controles de pegado inespecífico (carriles 5 y 7, **Figura 3.2**), proteínas de ~46 kDa. Esto significa que la proteína G acoplada a sefarosa une y precipita proteínas de masas moleculares iguales a aquellas que precipitó el anticuerpo anti p-ERK 1/2. Estos resultados indican que las proteínas que supuestamente precipitaron con el anticuerpo anti MAP cinasas activadas pudieron precipitar como consecuencia de una unión inespecífica a la proteína G-sefarosa. El ensayo de actividad de todas las proteínas precipitadas permitiría determinar la identidad de éstas.

En diferentes modelos vegetales se ha observado que la regulación de la actividad de MAP cinasa en células puede ser a nivel transcripcional, traduccional o por la activación o inactivación de la actividad enzimática debida a la fosforilación o desfosforilación, respectivamente (Morris, 2001). Es por ello, que se decidió determinar si en callos de cocotero inducidos con guitosano se observaba una modificación en los niveles de transcritos de MAP cinasas. Los ensavos de expresión mostraron (Figura 4.1) que bajo las condiciones en las que se realizó el ensavo no se detectaron cambios en la expresión de MAP cinasas en callos inducidos. De igual forma, no se detectaron transcritos, con la sonda empleada, de MAP cinasas que se estén expresando de manera constitutiva en callos de cocotero. Lo anterior sugiere que el principal nivel de regulación de la MAP cinasa de cocotero, que participa en la transducción de la señal ante una molécula que mimetiza la presencia de un patógeno, podría ser a nivel postraduccional. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Desikan y colaboradores (Desikan et al., 2001) en él que ni el tratamiento a células en suspensión de Arabidopsis con H₂O₂, ni con el inductor bacteriano harpin, tuvieron un efecto sobre la expresión de los ARN mensajeros de las MAP cinasas AtMPK4 y AtMPK6.

En cocotero, hay muchos estudios epidemiológicos para diversas enfermedades; sin embargo la fisiología de la interacción planta-patógeno en cocotero es poco comprendida. Aunado a esto, no hay datos con respecto a la causa o naturaleza bioquímica de la resistencia y/o susceptibilidad del cocotero ante los potenciales patógenos, ni mucho menos información acerca de los genes que están involucrados en el establecimiento de la resistencia o tolerancia. Con base en lo anterior, el estudio de una proteína que juega un papel fundamental tanto en la señalización como en la regulación de la expresión génica, es un paso esencial en la comprensión de los fenómenos tanto bioquímicos como moleculares que se inician tras la percepción de un patógeno o una molécula derivada de él. De tal forma, la evaluación de la participación de las MAP cinasas (un miembro de una vía de transducción de señales altamente conservada en eucariotes), ante la percepción de un potencial patógeno en callo de cocotero, constituye un paso importante en la comprensión de la interacción cocotero-patógeno.

Automatical designations of a second response of the second secon

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi M., Fukuda M. and Nishida E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. EMBO J. 18:5347-5358
- Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N. H. T., Zhu S., Qiu J-L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M-A, Nielsen H. B., Hirt H., Somssich I., Mattsson O. and Mundy J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* 24:2579-2589
- Arroyo-Serralta G. A., Kú-González A., Hernández-Sotomayor S. M. T. and Zúñiga-Aguilar J. J. (2004). Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiol*. *Biochem*. 43:27–35
- Birch P. R. J. and Whisson S. C. (2002). Phytophthora infestans enters the genomics era. Mol. Plant Pathol. 2:257–263
- Brlansky R. H., Damsteegt V. D. and Hartung J. S. (2002). Transmission of the citrus variegated chlorosis bacterium *Xylella fastidiosa* with the sharpshooter *Oncometopia nigricans. Plant Dis.* 86:1237-1239
- Canagarajah B. J., Khokhlatchev A., Cobb M. H. and Goldsmith E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90:859–69.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T. and Hirt H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. J. Biol. Chem. 275: 36734-36740
- Chan J. L., Saénz L., Talavera C., Hornung R., Robert M. and Oropeza C. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep*.17:515–521
- Cheong Y. H., Moon B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Kim M. C., Kim I. H., Park C. Y., Kim J. C., Park B. O., Koo S. C., Yoon H. W., Chung W. S., Lim C. O., Lee S. Y. and Cho M. J. (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* 132:1961–1972
- Daxberger A., Nemak A., Mithöfer A., Fliegmann J., Ligterink W., Hirt H. and Ebel J. (2006). Activation of members of a MAPK module in β-glucan elicitor-mediated non-host resistance of soybean. *Planta* 225:1559-1571
- Desikan R., Clarke A., Atherfold P., Hancock J. T. and Neil S. J. (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defense responses in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Planta* 210:97-103
- Desikan R., Hancock J. T., Ichimura K., Shinozaki K. and Neil S. J. (2001). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. Plant Physiol. 126:1579-1587
- Dollet M. (1999). Conventional and molecular approaches for detection and diagnosis of plant diseases: application to coconut. In: Oropeza C., Verdeil J. L., Ashburner G. R., Cardeña R. and Santamaría J. M. (eds) Current Plant

Science and Biotechnology in Agriculture 35. Current Advances in Coconut Biotechnology. Kluwer Academic Press, The Netherlands, pp. 163-182

Griffith R. (1987). Red ring disease of coconut palm. Plant Dis. 71:193–196.

- Hadiarto T., Nanmori T., Matsuoka D., Iwasaki T. Sato K., Fukami Y., Azuma T. and Yasuda T. (2006). Activation of Arabidopsis MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1–AtMEK1 pathway by wounding. *Planta* 223:708-713
- Hamel L. P., Miles G. P., Samuel M. A., Ellis B. E., Séguin A. and Beaudoin N. (2005). Activation of stress-responsive mitogen-activated protein kinase pathways in hybrid poplar (*Populus trichocarpa × Populus deltoides*). Tree *Physiology* 25:277–288
- Hanold D. and Randles J. W. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. Plant Dis. 75:330–335
- Howard F. W. and Barrant C. I. (1989). Questions and answers about lethal yellowing disease. *Principes* 33:163–171
- Huang Y., Li H., Grupta R., Morris P. C., Luan S. and Kieber J. J. (2000). ATMPK4, an Arabidopsis homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in Vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol*.122:1301-1310
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T. and Shinozaki K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. Plant J. 24:655-665
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Baker P. J., Huskinsson N. S. and Hirt H. (1996).. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11274-11279
- Joseph T. and Radha K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in bud rot of coconut. *Plant Dis. Reptr.* 59:1014–7
- Katou S., Yoshioka H., Kawakita K., Rowland O., Jones J. D. G., Mori H. and Doke N. (2005). Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol.* 139:1914-1926
- Kim C. Y. and Zhang S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* 38:142-151
- Kroj T., Rudd J. J., Nürnberger T., Gäbler Y., Lee J. and Scheel D. (2003). Mitogenactivated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. J. Biol. Chem. 278: 2256–2264.
- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A. and Pugin A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant. J.* 15:773-781
- Lee J., Klessig D.F. and Nürnberger T. (2001). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell* 13:1079–93.

- Lee J., Rudd J. J., Macioszek V. K. and Scheel D. (2004). Dynamic changes in the localization of MAP kinase cascade components controlling pathogenesisrelated (*PR*) gene expression during innate immunity in parsley. *J. Biol. Chem.* 279: 22440-22448
- Ligterink W., Kroj T., Nieden U. z., Hirt H. and Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276:2054-2057
- Link V. L., Hofmann M. G., Sinha A. K., Ehness R., Strnad M. and Roitsch T. (2002). Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Physiol.* 128:271– 281
- Morris P. C. (2001). MAP kinase signal transduction pathways in plants. New Phytol. 151:67-89
- Nühse T., Peck S. C., Hirt H. and Boller T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. J. Biol. Chem. 275:7521-7526
- Oropeza C. and Zizumbo D. (1997). History of lethal yellowing in Mexico. In: Eden Green S. J., Ofon F. (eds) International Workshop on lethal yellowing-like disease of coconut. Elmina, Ghana. University of Greenwich, U. K.
- Parry D. W., Jenkinson P. and McLeod L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathol. 44:207-238.
- Parthasarathy M. V., van Slobbe W. G. and Soudant C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. 1. Coconuts (Cocos nucifera). Principes 22:3–14.
- Rohde W., Randles J. W., Langridge P. and Hanold D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virol.* 176:648–651.
- Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D. F., Hirt H. and Jones J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11:273–287,
- Sesma A. and Osbourn A. E. (2004). The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431:582-586
- Suzuki K. and Shinshi H. (1995). Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7:639-647
- Suzuki K., Yano A. and Shinshi H. (1999). Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells *Plant Physiol.* 119:1465–1472.
- Takezawa D. (1999). Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Mol. Biol.* 40:921-933
- Tena G., Asai T., Chiu W. L. and Sheen J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:392-400

- Volmat V., Camps M., Arkinstall S., Pouysségur J. and Lenormand P. (2001). The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. J. Cell Sci. 114:3433-3443
- Windels C. E. (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathol.* 90:17-21.
- Xiong L. and Yang Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15:745-759
- Yap Y-K., Kodama Y., Waller F., Chung K. M., Ueda H., Nakamura K., Oldsen M., Yoda H., Yamaguchi Y. and Sano H. (2005). Activation of a novel transcription factor through phosphorylation by WIPK, a wound-induced mitogen-activated protein kinase in tobacco plants. *Plant Physiol.* 139:127-137
- Zhang S., Du H. and Klessig D. F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitins from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10:435–449
- Zhang S. and Klessig D. F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogenactivated protein kinase is encoded by SIPK Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7225-7230
- Zhang S. and Klessig D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci. 6:520-527

Secon K. Yaro A and Example H. (1994). Siow and protonget adverses of the phil

Capítulo VIII

Conclusiones Generales y Perspectivas

CONCLUSIONES GENERALES

Mediante un modelo de inducción de las respuestas de defensa en cocotero, esto es, el tratamiento de callos de dos meses de edad con el inductor de origen fúngico quitosano, se determinó, mediante ensayos de cinasa en gel, que una posible MAP cinasa de ~46 kDa se activa en respuesta a la inducción con quitosano. Asimismo, mediante ensayos inmunológicos se encontró que un anticuerpo dirigido contra el motivo conservado bisfosforilado TEY de las MAP cinasas en plantas reconoció a una proteína de ~46 kDa en callos tratados con el inductor. Los tiempos en los que se detectó la proteína fueron los mismos a los que se determinó un aumento en la actividad de cinasa, por lo que se sugiere que, tanto la proteína detectada como la que muestra un aumento de la actividad debida al quitosano, son la misma.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunoprecipitación no permitieron tener una evidencia más que indique que la cinasa que responde al tratamiento con guitosano pertenece a la familia de las MAP cinasas.

Por otro lado, mediante RT-PCR y ensayos tipo RACE se amplificaron secuencias de MAP cinasas de callo y hoja de cocotero, que corresponden a una región del dominio catalítico y a los extremos 5' y 3' de los ARNm, respectivamente.

Hasta la fecha no se conoce cuantas MAP cinasas pueden estar codificadas en el genoma del cocotero. En el presente trabajo de tesis, se aislaron secuencias parciales de al menos tres posibles MAP cinasas de callo de cocotero Alto del Atlántico. De acuerdo a los resultados obtenidos no se puede definir cuál de estas secuencias codifica a la proteína que responde ante el tratamiento con quitosano, pero se puede afirmar que al menos una posible MAP cinasa de ~46 kDa se activa como respuesta a la presencia del inductor, y al menos otra de ~42 kDa responde al tratamiento con una solución ácida, indicando este hecho que podría estar participando en la señalización ante la percepción de un estrés de tipo abiótico.

Con base en los últimos reportes publicados, este es el primer reporte en cocotero en el que se establece la participación de las MAP cinasas en la transducción de la señal ante la percepción de un estimulo biótico y otro estímulo abiótico, y se caracterizan las actividades de estas posibles MAP cinasas.

Por otro lado, como resultado del trabajo conjunto con el cDr. Gabriel Lizama Uc (Lizama-Uc *et al.*, 2007), se propuso un modelo de inducción de las respuestas de defensa en cocotero, esto es, el reto de callo con inductores derivados de patógenos. A nuestro juicio, este es también el primer reporte del establecimiento de un modelo de inducción de respuestas de defensa en esta especie.

PERSPECTIVAS

La determinación de que una vía de transducción de señales, conservada en eucariotes, puede tener una participación en la transducción de la señal después de la percepción de un derivado de un hongo fitopatógeno en cocotero, es uno de los primeros pasos para comprender la fisiología de la interacción planta-patógeno en esta especie. Como trabajo a futuro sería deseable purificar la actividad inducida en respuesta al quitosano y secuenciar a la proteína. Así mismo, la clonación del gen que codifica la proteína que responde al tratamiento sería una excelente herramienta, que permitiría (i) generar a la proteína mediante expresión heteróloga, (ii) generar anticuerpos, (iii) determinar el o los sustratos de esta MAP cinasa, y (iv) determinar su participación en el establecimiento o el encendido de las repuestas defensa ante la presencia de un potencial patógeno.

rear and the second reported publication and the provider of the second real of the second real of the second real second real

Lateral Lin (Lateratulia el el 2007), en propiazi la malera qui el altri Gubret nativales de detenes en la el 2007), en propiazi las relacida de tes cube de tes nominados de detenes en la coleto, esta de el relacido de cube por el inderconso encuetos de pasagentes. A numero juida este es terrable el prime resorte del encuetos encuetos de inducedos de inducados de inducados de responstan de delense necesaria del resorte.

Apéndice

SECUENCIA DE LAS CLONAS A8, A11, E5, E8 Y E9

A continuación se presenta el resultado de la secuenciación de los plásmidos recombinantes. El tamaño del fragmento clonado, en cada una de los plásmidos es de 447 pb. No fue posible secuenciar el inserto del plásmido de la clona A5.

Clona A8

aggaccttgcgggagctaaagcttcttaggcacatggatcatgaaaatgttgttgctatcagagacataataccacctc ctgtgagggaaatattcaatgatgtctacattgcttatgaattaatggatactgatctccatcaaattattcgctcaaatcaa gctttgtctgaggaacactgtcagtatttcctttatcagatccttcgtggattaaaatatatacattcagcgaatgtccttcac agagacttaaaaccaagcaacctcctcttaaatgctaactgtgatttaaagatttgtgattttggacttgctcgtactacctc agaaactgatttcatgacagagtatgttgtaacaagatggtacagggcgccagagctattgttgaattcttcagaatata ctgcagcaattgatgtttggtcagtcggttgcattttc

Clona A11

aggaccttgcgggagctaaagcttcttaggcacatggatcatgaaaatgttgttgctatcagagacataataccacctc ctgtgagggaaatattcaatgatgtctacattgcttatgaattaatggatactgatctccatcaaattattcgctcaaatcaa gctttgtctgaggaacactgtcagtatttcctttatcagatccttcgtggattaaaatatatacattcagcgaatgtccttcac agagacttaaaaccaagcaacctcctcttaaatgctaactgtgatttaaagatttgtgattttggacttgctcgtactacctc agaaactgatttcatgacagagtatgttgtaacaagatggtacagggcgccagagctattgttgaattcttcagaatata ctgcagcaattgatgtttggtcagtcggttgcattttc

Clona E5

Clona Cn3

Clona Cn5

Clona Cn8

Clona Cn9

Clona Cn11

Clona Cn12

ggcggcctcggagggatggagtcgtccggacgctcgacgctcggcggtggatgttatgtgccgccggcttgacgtgg cggggtatcttccgatcgcggagaataaccgcaagtcgggaaaatggctatattggttgatcctccaaatggcatggg aaacagtgggaagcactactattccatgtggcaaaccttgtttgagatcgatacgaagtatgtgcctatcaagcccatc ggaaggaggagcttatggtgttgtatgctcatccataaatcgagaaacaaatgaaaaagttgcaataaagaagatcaa

Clona Cn13

Clona Cn16

SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LAS CLONAS Cn8, Cn9, Cn11, Cn12, Cn13, Cn16 La traducción de las secuencias se realizó en el sitio http://ca.expasy.org/tools/dna.html

Ciona Cn8

GPRRDGVVRTLDARRWMSCAAGLTWRGKMAILVDPPNGMGNSGKHYYSMWQTL FEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSINRETNEKVAIKKINNAFDNRVDALRTLRELKLLR HLRHENVIGFEGHHDASQXEKLQGCIPSLXTHGYXPASDYQVITSTFXXPLPIFSLQL LRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLARTSNGKNQFMTEYVVTRW YRAPELLLCCDNHDTSIDVWSVGXM

Clona Cn9

GPRRDGVVRTLDARRWILCAAGLTWRGSGRVSSDRGEXPQVGKMAILVDPPNGM GNSGKHYYSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSINRETNEKVAIKKINNAFD NRVDALRTLRELKLLRHLRHENVIALKDIMMPANRKSFKDVYLVYELMDTDLHQIIKS SRALSNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLARTS NGKNQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYDTSIDVWVSRLNI

Clona Cn11

ESGLGGMESSGRSTLGGGCYVPPAXRGGVSSDRGEXPQVGKMAILVDPPNGMG NSGKHYYSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSINRETNEKVAIKKINNAFDN RVDALRTLRELKLLRHLRHENVIALKDIMMPANRKSFKDVYLVYELMDTDLHQIIKSS QALSNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLARTSN GKNQFMTEYVVTRWYWAPELLLCCDNYDTSIDVWSVGXIF

Clona Cn12

GGLGGMESSGRSTLGGGCYVPPAXRGGVSSDRGEXPQVGKMAILVDPPNGMGN SGKHYYSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSINRETNEKVAIKKINNAFDNRV DALRTLRELKLLRHLRHENVIALKDIMMPANRKSFKDVYLVYELMDTDLHQIIKSSQA

LSNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLARTSNGK NQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYDTSIDVWSVGXMF

Clona Cn13

GLGGMESSGRSTLGGGCYVPPAXRGGVSSDREEXPQVGKMAILVDPPNGMGNS GKHYYSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSINRETNEKVAIKKINNAFDNRV DALRTLRELKLLRHLRHENVIALKDIMMPANRKSFKDVYLVYELMDTDLHQIIKSSQA LSNDHFQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLARTSNGK NQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYDTSIDVWSVGXIF

Clona Cn16

RPRRDGVVRTLDARRWMLCAAGLTWRGKMAILVDPPNGMGNSGKHYYSMWQTL FEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSINRETNEKVAIKKINNAFDNRVDALRTLRELKLLR HLRHENVIALKDIMMPANRKSFKDVYLVYELMDTDLHQIIKSSQALSNDHCQYFLFQ LLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLARTSNGKNQFMTEYVVTR WYRAPELLLCCDNYDTSIDVWSVGXIF

SECUENCIAS DE LAS CLONAS CnXV, CnXX, CnXXIII, CnXXXIX, CnXLIII Y CnLIII

A continuación se presenta el resultado de la secuenciación de los plásmidos recombinantes. El tamaño del fragmento clonado, en cada una de los plásmidos es variable. Únicamente las secuencias de las clonas CnXIII, CnXV, CnXXIII, y CnXLIII mostraron similitud con secuencias correspondientes a MAP cinsas de otras especies vegetales.

GOLGIGHESSORETLOGOCYVEPARINGGYSEDRIGEXFOVOIDALLVOPPHDIAR SOLGIYEDRINGTLEEDDTOVERANDIGRANGVCSSINRETHENVLIKGINNAFDNRV DALETLEELKLEHLENDAALEDINNEFAREKSKODVELVYELMDTDI HOIIGEGA

Clona CnXIII

Clona CnXV

Clona CnXX

Clona CnXXIII

Ciona CnXXXIX

Clona CnXLIII

NEW YOLGARD REPORT OF A DESCRIPTION OF A

Ciona CnLill

SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LAS CLONAS CnXIII, CnXV, CnXXIII, Y CnXLIII

Ciona CnXIII

IKLFAQIKLCLRSTVSISFIRSFVDXNIYIQQMFFTETXNPSNLLLNANCDLKICDFGLA RTTSETDFMTEYVVTRWYRAPELLLNSSEYTAAIDVWSVGCILWNXWTGNLYFQE GTMCTSYVCXWSLXAVQMRLIWILXMKMREDIFANFLVMHDNPSLEVEDALAHPYL ASLHDISDEPVCMMPFSFDFEQHALSEEQMKELIYQEAVAFNPEYQQXESPIMLFID PLISAIHVVFACKCYXFVHVCMLHLRDFILFGXLPSERRGRGVWIFKGDRMDACASV LYLFWLLNVTSTKKKKKKKK

Clona CnXV

KCSSQRLKPSNLLLNANCDLKICDFGLARTTSETDFMTEYVVTRWYRAPELLLNSS EYTAAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLMELIGSPDEADLDFVNENA RRYICQLPRHARQSFPGRFPHVHPLAIDLIEKMLTFDPRQRITVEDALAHPYLASLHD ISDEPVCMMPFSFDFEQHALSEEQMKELIYQEAVAFNPEYQQXEFPIMLFIDPLISAI HVVFACKCYXFVHVCMLHLRDFILFGXLPSERRGRGVWIFKGDRMDACASVLYLF WLLNVTSYKKKKKKKKK

Clona CnXXIII

PSQRLKPSNLLXMLTVIXRFVIWTARTTSETDFMTEYVVTRWYRAPELLLNSSEYTA AIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLMELIGTPNEADLDFVNENARRYIR QLPRYARQSFPEKFPHVHPLAIDLVEKMLTFDPRLRITVEDALAHPYLASLHDISDEP VCMTPFSFDFEQHALSEEQMKELIYREALAFNPEYQQXEFLMVLFVDPLTFDQRNS CGFCMQLLLIRPCIYLCASPELFDAIWXLXSERQGLXVGGYIWVIVWMLVRLYHTFY GYLNVTCFQKKKKKKKK

Clona CnXLIII

RTLRELKLLRHMDHENVIAIRDIIPPSVWDTYNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNQALSEE HCQYFLYQILRXLKYIHLANVLHRDLKPSNLLLNANCDLKICDFGLARTTSETDFMTE YVVTRWYRAPELLLNSSEYTAAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLME LIGSPDEADLDFANENARRYICQLPRHARQSFPGRFPHVHPLAIDLIEKMLTFDPRQ RITVEDALAHPYLASLHDISDEPVCMMPFSFDFEQHALSEEQMKELIYQEAVAFNPE YQQXEFPIMLFIDPLISAFMW ISOEPVORMPFSFDFECHALSEEGMKELIYGEAVAFNPEYGGREFFIMLFIDPLISM HVVFACKCYXPVHVCMLHLRDFILFGXLPSERRGRGVWFKGDRMDACASVLYLF WLLIVTSYNGODOOOCC

Clona Cn00E

PSORLKPSNILLXMLTVIXRFVIWTARTTSETDFMTEYVVTRWYRAF BLLINSSEYTA AIDVWSVGCIFMELMDRKPLEFDGROHVHOLRLLMELIGTPNEAOLDFVNENAARYIR OLPRYAROBFPEKFPHVHPLAIDLVEKMLTFOPRLRITVEDALAHPYLASLHDISOLP VCMTPFBFDFEOHALSEEOMKELIVREALAFNPEYCOXEFLWVLPVOPLTFDORNS COFCMOLLLIRPCIYLCASPELFDAWXLXSEROGLXVGGYIWVWW.NLVRLYHTFY GYLWYTCFOKKKKKKKK

Clone CnXLIII

RTLRELIGLERHMDHERVIAIRDRPSVWDTYNDVYIAVELMDTDLHORRSMOALSEE NCOYFLYOILIRKIYHLAWVLHRDLIOPSNLLLNANCDLKICOFGLARTTSETDFMTE YVVTRWYRAPELLLNSSEYTAAIDVWSVGGIFMELMDRKPLPFGRDHVHGLRLLME LIGSPDFADLDFANENARRYICOLPRHARQSFPGRFPHVHPLAIDLISKMLTFDPRO RTVFDALAHPYLASLHDISDEPVCMMPFSFDFEGHALSEEGMKELYQEAVAFMPE YQQXEFFIMLRIDPLLSAFMV