

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE  
PLANTAS**

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA DE  
DEFENSA INDUCIDA POR *Phytophthora capsici* Leonian EN  
*Capsicum chinense* Jacq.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA:

**YUMI ELENA NAKAZAWA UEJI**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C  
MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

2009



## CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
<b>CAPÍTULO I: ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	7
1.2 PRINCIPALES ENFERMEDADES ASOCIADAS A <i>C. chinense</i>	8
1.2.1 <i>Phytophthora capsici</i> Leonian	9
1.3 INTERACCIÓN ENTRE EL GÉNERO <i>Capsicum</i> Y SUS PATÓGENOS	10
1.4 GENERALIDADES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	12
1.4.1 RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO	13
1.4.2 LOS GENES R Y EL MODELO GEN A GEN	14
1.4.3 LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	16
1.4.3.1 SEÑALIZACIÓN POR CALCIO	17
1.4.3.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	18
1.4.3.3 PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS	19
1.4.4 EXPRESIÓN GÉNICA EN LA INTERACCIÓN PLANTA- PATÓGENO	19
1.5 HIPÓTESIS	21

1.6 OBJETIVO GENERAL	21
1.6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	21
1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

<b>CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>Capsicum chinense</i> Jacq.</b>	<b>29</b>
2.1 INTRODUCCIÓN	29
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.2.1 PROPAGACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR	31
2.2.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR	31
2.2.2 PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS DE <i>P. capsici</i>	32
2.2.3 INDUCCIÓN	32
2.2.4 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA	33
2.2.4.1 ALCALINIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	34
2.2.4.2 ACTIVIDAD DE $\beta$ -1,3-glucanasas	34
2.2.4.3 NIVELES DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
2.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	35
2.3.2 INDUCCIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS DE <i>P. capsici</i>	37
2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA	38
2.3.3.1 ALCALINIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	39
2.3.3.2 ACTIVIDAD DE $\beta$ -1,3- glucanasa	44
2.3.3.3 NIVELES DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	47
2.4 CONCLUSIONES	50
2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

<b>CAPÍTULO III: LAS MAPK ESTÁN INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE <i>Capsicum chinense</i> Jacq. A <i>Phytophthora capsici</i> Leonina</b>	<b>59</b>
3.1 INTRODUCCIÓN	59

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	66
3.2.1 INDUCCIÓN	66
3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MAPK	66
3.2.2.1 ENSAYO DE CINASA EN GEL	67
3.2.2.2 INMUNODETECCIÓN DE MAPK ACTIVADAS	68
3.2.3 CLONACIÓN DE SECUENCIAS DE MAPK	69
3.2.3.1 AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE MAPK	69
3.2.3.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i>	70
3.2.3.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	71
3.2.3.4 PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO	71
3.2.3.5 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL INSERTO	72
3.2.3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MAPK	72
3.2.3.6.1 OBTENCIÓN DEL ARN DE TEJIDO TRATADO CON CWH	72
3.2.3.6.2 HIBRIDACIÓN	73
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
3.3.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE MAPK	74
3.3.1.1 ACTIVIDAD DE MAPK A LO LARGO DEL CICLO DE CULTIVO	74
3.3.1.2 EFECTO DE LA INDUCCIÓN CON CWH DE <i>P. capsici</i> EN LA ACTIVIDAD DE MAPK	75
3.3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MAPK	87
3.3.2.1 OBTENCIÓN DE LA SONDA	87
3.3.2.2 EXPRESIÓN DE MAPK EN CULTIVO TRATADOS CON CWH	90
3.4 CONCLUSIONES	91
3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	97

**CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA COMO  
RESPUESTA A LOS HOMOGENEIZADOS DE *Phytophthora  
capsici* Leonina**

4.1 INTRODUCCIÓN	97
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	98
4.2.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA DE ACTINA Y OTROS GENES DE DEFENSA DE <i>C. chinense</i>	99
4.2.2 SÍNTESIS DE LA BIBLIOTECA DE ADN <sub>c</sub> DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. chinense</i>	99
4.2.2.1 TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE ADN <sub>c</sub>	101
4.2.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE ADN <sub>c</sub>	102
4.2.3 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS	103
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	104
4.3.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA DE ACTINA DE <i>C. chinense</i>	104
4.3.2 OBTENCIÓN DE SONDAS HOMÓLOGAS DE GENES DE DEFENSA	108
4.3.2.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	112
4.3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL	116
4.4 CONCLUSIONES	124
4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

**CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL** 129

**CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS** 132

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 134

**ANEXO 1: SECUENCIAS DE LOS ADN<sub>c</sub> DE *C. chinense*  
CLONADOS** 135

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), y bajo la asesoría de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, de la UBBMP, y del Dr. Mario Rocha Sosa, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al M.C. Ramón Souza Perera por su apoyo para la realización del presente trabajo.

Este proyecto fue financiado por PIFOP, CONACYT P48831, y mediante la beca de Doctorado 172927.

La línea celular utilizada como modelo de estudio fue proporcionada por el Dr. Felipe Vázquez Flota y la Dra. Nancy Santana Buzzy.

## AGRADECIMIENTOS

Al CICY por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A CONACYT, por la beca otorgada 172927.

A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham y al Dr. Mario Rocha Sosa, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar el trabajo y por su apoyo.

Al Dr. Ignacio Islas Flores, a la Dra. Renata Rivera Madrid, al Dr. Tomás González Estrada y al Dr. Jairo Cristóbal Alejo, por sus sugerencias para la escritura de la tesis.

Al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar y al M.C. Ramón Souza Perera, por su amistad y su apoyo en todo momento para realizar este trabajo.

Al Dr. Felipe Vázquez Flota y a la Dra. Nancy Santana Buzzy, por la línea celular de *Capsicum chinense* otorgada, sin la cual no hubiera sido posible este trabajo.

A la M.C. Miriam Monforte, por su ayuda y sus consejos para mantener la línea celular.

A la M. C. Rosa María Galáz, por el material y el apoyo que me proporcionó durante todo el trabajo.

Al Dr. Ignacio Islas Flores y a la Q. Ligia Brito, por sus consejos, el apoyo y los sustratos proporcionados para la realización de los ensayos de actividad.

A la M.C. Lizbeth Castro, por su ayuda en la determinación del peróxido de hidrógeno y a la Dra. María de Lourdes Miranda, por los reactivos proporcionados.

A todo los integrantes de la UBBMP, porque no es posible realizar ningún proyecto de investigación sin la colaboración en todo momento.

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
<b>3.1</b>	Identidad de las secuencias obtenidas.	<b>89</b>
<b>4.1</b>	Identidad de los ADNc obtenidos a partir de una biblioteca de ADNc de células en suspensión de <i>C. chinense</i> .	<b>114</b>
<b>4.2</b>	Identidad de los ADNc de <i>C. chinense</i> transferidos a las membranas de nylon.	<b>118</b>
<b>4.3</b>	Resultados del análisis de expresión de las clonas de <i>C. chinense</i> .	<b>120</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>2.1</b>	Caracterización del cultivo celular de <i>C. chinense</i> .	<b>36</b>
<b>2.2</b>	Efecto de los CWH en la apariencia de los cultivos celulares.	<b>38</b>
<b>2.3</b>	Efecto temprano de la inducción con CWH, sobre el pH del medio de cultivo.	<b>40</b>
<b>2.4</b>	La alcalinización del medio como respuesta a los CWH es específica.	<b>41</b>
<b>2.5</b>	Efecto temprano de la inducción con CWH en la conductividad del medio de cultivo.	<b>42</b>
<b>2.6</b>	Efecto tardío de la inducción con CWH en la conductividad del medio de cultivo.	<b>43</b>
<b>2.7</b>	Efecto del tiempo de incubación con los CWH en la inducción de las actividades de $\beta$ -1,3-glucanasa.	<b>45</b>
<b>2.8</b>	Efecto de los CWH en la concentración del peróxido de hidrógeno intracelular.	<b>47</b>
<b>2.9</b>	Efecto de los CWH en la concentración del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el medio de cultivo.	<b>49</b>
<b>3.1</b>	Determinación de la presencia de MAPK activadas en el ciclo de cultivo.	<b>75</b>
<b>3.2</b>	Activación de MAPK en <i>C. chinense</i> por efecto de los CWH de <i>P. capsici</i> .	<b>77</b>
<b>3.3</b>	Activación de MAPK en <i>C. chinense</i> por efecto de los CWH de <i>P. capsici</i> .	<b>78</b>
<b>3.4</b>	Activación de MAPK en <i>C. chinense</i> por efecto de los CWH de <i>P. capsici</i> .	<b>79</b>
<b>3.5</b>	Activación de MAPK en <i>C. chinense</i> por efecto de los CWH de <i>P. capsici</i> .	<b>82</b>
<b>3.6</b>	Determinación de la activación de MAPK en <i>C. chinense</i> por efecto de los homogenizados de <i>P. capsici</i> .	<b>83</b>
<b>3.7</b>	Determinación de la activación de MAPK en <i>C. chinense</i> por los homogenizados de <i>P. capsici</i> .	<b>85</b>

<b>3.8</b>	<b>Las cinasas que fosforilan a la MBP no fosforilan a la caseína ni a la histona H1</b>	<b>86</b>
<b>3.9</b>	<b>Amplificación y verificación de los fragmentos de ADNc de MAPK.</b>	<b>87</b>
<b>3.10</b>	<b>Alineamiento de las secuencias de nucleótidos.</b>	<b>88</b>
<b>3.11</b>	<b>Efecto del tratamiento con CWH en los niveles de transcritos de MAPK.</b>	<b>90</b>
<b>4.1</b>	<b>Clonación del ADNc de la actina de <i>C. chinense</i>.</b>	<b>105</b>
<b>4.2</b>	<b>Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcACT, que corresponde a un segmento del transcrito de actina de <i>C. chinense</i> (AM168448).</b>	<b>106</b>
<b>4.3</b>	<b>Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la actina de <i>C. chinense</i>.</b>	<b>107</b>
<b>4.4</b>	<b>Síntesis de la biblioteca de ADNc.</b>	<b>109</b>
<b>4.5</b>	<b>Fraccionamiento del ADNc por cromatografía de exclusión molecular.</b>	<b>111</b>
<b>4.6</b>	<b>Tamaño promedio de los insertos de la biblioteca de ADNc de <i>C. chinense</i>.</b>	<b>112</b>
<b>4.7</b>	<b>Los CWH de <i>P. capsici</i> modifican la expresión génica en células en suspensión de <i>C. chinense</i>.</b>	<b>119</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleíco
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleíco
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleíco complementario
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MAPKK</b>	Mitogen activated protein kinase kinase
<b>MAPKKK</b>	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>PMSF</b>	Fluorurpo de fenilmetilsulfonilo
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetracético
<b>EGTA</b>	Ácido etilen glicol-bis( $\beta$ -aminoetil ether)-N,N,N',N'-tetraacético
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>PVPP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametil ethilene diamina
<b>MBP</b>	Proteína básica de mielina
<b>RNasa A</b>	Ribonucleasa A
<b>DNasa I</b>	Desoxirribonucleasa I
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato

## RESUMEN

El cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es importante en la Península de Yucatán, debido a su uso en la gastronomía y como un producto de exportación emergente. Aunque los cultivos locales aparentemente no tienen problemas graves asociados con patógenos, existen algunas enfermedades como la "marchitez del chile", producida por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leoninan junto con otros patógenos, es una de las enfermedades que amenaza este cultivo a nivel mundial.

Durante la interacción entre las plantas y sus patógenos, pueden activarse diversos mecanismos de defensa, tanto a nivel tisular como celular. En este último, se han documentado modificaciones en los tres niveles en que se regula la defensa contra patógenos: la inducción génica, la activación traduccional y las modificaciones postraduccionales de enzimas, como la fosforilación.

Como parte de la inducción de la expresión génica, la expresión de algunos de los genes se induce durante la respuesta de defensa de las plantas contra los patógenos. Entre estos genes codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), cuyos niveles de transcritos, de proteínas y de actividad se incrementan durante la respuesta de defensa. Algunos de ellos actúan directamente sobre moléculas que forman parte del patógeno. La mayoría de los genes importantes para la defensa de la planta, son inducidos como respuesta a la presencia del patógeno, por lo que es necesario el reconocimiento del patógeno por la célula vegetal. Este reconocimiento ocurre mediante la unión de moléculas definidas (ligandos) a receptores citosólicos o transmembranales; algunos de estos receptores están codificados por los genes de resistencia (R). La unión de un ligando determinado a un receptor celular específico puede activar diversas vías de transducción de señales, entre las cuales la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una de las más importantes. Finalmente, la señal es transducida al núcleo, en donde la activación de factores de transcripción

específicos conduce a la modificación de la expresión génica y el establecimiento de la respuesta de defensa.

Las MAPK son parte de una vía de transducción de señales exclusiva de eucariotes. En especies como *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*, han sido asociadas con la activación de respuestas celulares a señales extracelulares, las cuales incluyen diferentes tipos de estrés ambiental. Específicamente, se han asociado con la expresión de genes PR. Debido a que se ha demostrado que la resistencia de las plantas puede depender de la activación de esta vía, su estudio en el chile habanero es importante para la comprensión y el conocimiento de los mecanismos de resistencia contra *P. capsici* y otros microorganismos fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue determinar si la vía de transducción de señales mediada por MAPK está relacionada con la modificación de la expresión de genes de defensa, durante la interacción de *C. chinense* con *P. capsici*.

Para ello, se estableció un modelo de estudio con cultivos celulares de *C. chinense*, a los cuales se les adicionaron homogenados de paredes celulares (CWH) de *P. capsici*. El tratamiento indujo la respuesta de defensa, como lo demuestra la modificación de la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas y la alcalinización del medio de cultivo como respuesta a los CWH. Una vez inducidos los sistemas de defensa, se analizó el efecto de los CWH sobre la vía de las MAP cinasas y la expresión de genes de defensa clonados a partir de una biblioteca de ADNc del cultivo celular de *C. chinense*.

Los resultados mostraron la activación de dos proteínas cinasas, que fosforilan a la proteína básica de mielina (MBP, un sustrato no específico de las MAPK), y no a la caseína o a la histona H1 (las cuales no son sustratos de las MAPK), como respuesta a la inducción con CWH. La identidad de las proteínas cinasas fue corroborada mediante el uso de anticuerpos específicos para MAPK bisfosforiladas, lo que confirmó la presencia de dos MAP cinasas, de ~43 y 44 kDa, como respuesta a la adición de CWH de *P. capsici*. La activación de dos proteínas parece ser específica a la inducción de las células con las paredes de *P. capsici*, dado que bajo condiciones de cultivo estándares para la línea celular, estas

proteínas no se encuentran bisfosforiladas a lo largo del ciclo de cultivo, ni son activadas como respuesta a la adición de glucosa ni agua.

Para determinar el efecto de la inducción de la línea celular de *C. chinense* con los CWH de *P. capsici* en la expresión génica, se compararon los niveles de transcritos de 36 ADNc relacionados con la defensa, a las 12-24 h después de la adición de los CWH de *P. capsici* a las suspensiones celulares. Los ADNc utilizados como sonda fueron clonados a partir de una biblioteca de ADNc sintetizada en este trabajo, y correspondieron a genes cuya expresión es modificada como respuesta a la aplicación de diferentes tipos de estrés en otras especies vegetales. Los resultados de experimentos de hibridación diferencial, realizadas por medio de *Northern blot* reverso, usando ADNc total marcado con digoxigenina y sintetizado a partir de células inducidas o de células control, mostraron que la inducción con CWH de *P. capsici* promueve la disminución en la expresión del 14% de los genes y el incremento en los niveles de transcritos del 25% de los mismos, mientras que el resto no presentó modificación.

Estos resultados sugieren que la adición de los CWH activa dos MAP cinasas, específicamente como respuesta a *P. capsici*, por lo que es probable que esta vía de transducción esté involucrada en la regulación de la expresión de genes de defensa, como ocurre en otras especies.

Las contribuciones más importantes de este trabajo son el establecimiento de un modelo para el estudio de la respuesta de defensa en *C. chinense*, la evidencia de que los mecanismos de defensa como respuesta a la inducción con CWH, incluyen modificaciones en los niveles de transcritos de genes relacionados con la respuesta de defensa, la activación de dos MAPK, la alcalinización del medio de cultivo y la modificación de la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas.

Este trabajo proporciona información sobre los mecanismos de defensa y establece las bases para trabajos posteriores encaminados a la comprensión de estos mecanismos en líneas celulares de chile habanero cultivadas *in vitro*.

## ABSTRACT

The production of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) is important in the Yucatan Peninsula, because of its use in gastronomy and its export value. Even though in Yucatan, this crop presents apparently little disease problems associated to other pathogens than viruses, the blight disease caused by *P. capsici* is among the most important threats to pepper production in the world.

During plant pathogen-interactions, a great variety of events take place, including tissular and intracellular modifications. Inside the cell, changes in defense-related gene expression, as well as the increase in defense protein levels, have been associated to plant defense responses to pathogen infection. Moreover, the activity of some enzymes related to the defense response is increased. As an example of gene induction and protein activation in plant defense response, pathogenesis-related proteins genes (PR) are induced as a response to pathogen infection, since not only their protein levels are increased, but also their corresponding activities are increased as a result. It is known that the activity of some PR proteins is directly involved in pathogen destruction. Since induction of most of the plant defense-related genes occurs only after detection of the pathogen, the proper establishment of a defense response requires efficient detection systems. Pathogen recognition by plant cells is achieved through binding of pathogen- or self-derived molecules (ligands) to cytosolic or transmembranal receptors; plant resistance genes (R) codify for some of these cell receptors. The specific binding of the ligand activates signal transduction pathways, like the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. The transduction of the defense signal to the nucleus results in the activation of transcription factors, and finally, in the specific induction of defense-related genes.

MAPK signaling pathways are only present in eukaryotic organisms. In plant species like *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*, they have been associated to cell responses activated by extracellular signals, like environmental stress. During plant cell response to biotic stress, MAPK have been related to the induction of PR genes during defense response establishment. Since it has been demonstrated that

plant resistance could be regulated by this pathway, its study in Habanero pepper would provide important evidence on the resistance mechanisms against pathogenic microorganisms.

There is almost no evidence about the molecular or biochemical events involved in habanero pepper interaction with its pathogens. Thus, the aim of this work was to determine if MAPK pathway is involved in the modification of defense gene expression during the interaction of *C. chinense* with *P. capsici*. To elucidate this, we incubated *C. chinense* cell suspensions with *P. capsici* cell wall homogenates (CWH). First, we tried to determine if CWH induced a defense response in cell suspensions, and then we studied if the elicitation process affected the MAPK pathway and expression of defense-related genes.

Our results showed that CWH induced one myelin basic protein (MBP) kinase activity (a non specific MAPK substrate). The identity of this kinase was verified by immunodetection with a MAP kinase-specific antibody, which showed that this band corresponds to two MAPK of ~43 and 44 kDa, respectively. None of these proteins seemms to be activated under non-elicited conditions, or through out the cell suspension cycle; therefore, their activation was specific to the elicitation.

Regarding to the effect of *P. capsici* CWH on gene expression, we compared the transcript levels of 36 defense-related cDNAs, at 12-24 h after *P. capsici* CWH addition to cell suspensions. The identity of the target cDNAs, cloned from a cDNA library synthesized in this work, corresponded to genes whose transcription is induced by different type of stresses in other species. Differential hybridizations, by reverse northern blotting using DIG-labeled total cDNA synthesized from elicited or control cells, showed that CWH promoted a reduction of the 14 % of the cDNAs and an increment in transcript levels for 25% of the cDNAs, while the rest were not modified.

These results suggest that the addition of CWH induced the activation of two MAP cinasas, especiffically as a response to *P. capsici*. Like in another species, MAPK pathway could be involved in gene expression modification.

One of the contributions of this work is the establishment of a model to study the plant-pathogen interaction between *C. chinense* and *P. capsici*, which allow us to study defense response in habanero pepper. With this model we were able to show that defense response of *C. chinense* includes medium alcalinization, MAPK pathway activation, modification of  $\beta$ -1,3 glucanase activity and gene expression modification. This results are important not only because there is little information about *C. chinense* defense response, but also because with them, it is now possible to understand this response in habanero pepper.

## INTRODUCCIÓN

Las especies hortícolas de mayor importancia que se cultivan en Yucatán están comprendidas en dos familias, Cucurbitaceae (*Cucumis sativus* y *C. melo*) y Solanaceae (*C. chinense*, *C. annuum* y *Solanum lycopersicon*). En la Península de Yucatán, el género *Capsicum* es importante para la preparación de platillos regionales, siendo las principales especies de este género cultivadas en la región *C. chinense*, aunque el primero sea el más importante (Tun, 2001; SAGARPA, 2004).

Entre los principales factores bióticos que disminuyen la producción del chile se encuentran las enfermedades causadas por hongos (*Fusarium* sp., *Alternaria* sp.), oomicetos (*Phytophthora* sp. y *Pythium* sp.), bacterias (*Xanthomonas* spp.), nematodos (*Meloidogyne* spp.) y virus (*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Pernezny *et al.*, 2003).

Durante la interacción entre la planta y el patógeno, el reconocimiento es un factor importante que requiere que las moléculas del patógeno sean reconocidas por los receptores de las células vegetales, para posteriormente activar los mecanismos de defensa celulares (McDowell y Doffenden, 2003). En este proceso participan las vías de transducción de señales, que al ser activadas encienden los mecanismos de defensa (Baker *et al.*, 1997; Odjakova y Hadjiivanova, 2001). Una de las vías mejor estudiadas es aquella constituida por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), que consiste básicamente en módulos de tres proteínas cinasas (MAPKKK→MAPKK→MAPK) que actúan mediante fosforilaciones sucesivas (Hirt, 2002; Ichimura 2002; Innes, 2001; Jonak *et al.*, 1999; Jonak *et al.*, 2002; Morris, 2001; Tena *et al.*, 2001; Wrzaczek y Hirt, 2002). Las últimas enzimas de la vía, las MAPK son cinasas de serina/reonina que al ser fosforiladas por las MAPKK se dimerizan, y son transportadas al núcleo donde activan mediante fosforilación a factores transcripcionales, como los WRKY (Euglem *et al.*, 1999; Kim y Zhang 2004; Liu *et al.*, 2004), modificando así la expresión génica como parte de las respuestas de defensa (Asai *et al.*, 2002; Hirt, 1997; Hirt, 2002; Ichimura 2002;

Innes, 2001; Jonak *et al.*, 1999; Jonak *et al.*, 2002; Kim y Zhang 2004; Liu *et al.*, 2004; Morris, 2001; Samuel *et al.*, 2005; Tena *et al.*, 2001; Wrzaczek y Hirt, 2002).

Algunos de los genes cuya expresión se modifica como resultado de la activación de la vía de las MAP cinasas son aquellos que codifican las proteínas PR ("pathogenesis related") (Cheong *et al.*, 2003; Kroj *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Kim y Zhang 2004; Lee *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2001). En el género *Capsicum*, las proteínas PR más estudiadas hasta el momento son las glucanasas (Egea *et al.*, 1996; García-Pérez *et al.*, 1998) y las quitinasas (Candela *et al.*, 1993). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de genes pertenecientes a la familia PR10 están asociados con la resistencia de *C. annuum* a la infección por patógenos, ya que la sobreexpresión de los mismos aumenta la resistencia de las plantas a bacterias, virus y oomicetos (Carpin *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2001, Shin *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003).

Se sabe que la vía de MAPK está involucrada en la respuesta de defensa de las plantas ante la invasión del patógeno (Kim y Zhang 2004; Liu *et al.*, 2004), y se ha señalado que ésta activación se encuentra relacionada con la modificación de la expresión génica (Kim y Zhang 2004; Liu *et al.*, 2004; Samuel *et al.*, 2005) durante la defensa a diferentes patógenos, incluyendo bacterias (Lee *et al.*, 2001), virus (Liu *et al.*, 2004) y oomicetos (Cheong *et al.*, 2003). La información que hasta el momento se tiene sobre la respuesta de defensa y la interacción entre *Capsicum* y sus microorganismos asociados, se ha obtenido principalmente en *C. annuum*, en especial sobre las modificaciones en la expresión génica (Park *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2001, Shin *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003) y los niveles de proteínas PR (Egea *et al.*, 1996; García-Pérez *et al.*, 1998). Los mecanismos mediante los cuales *C. chinense* responde a la infección de patógenos, incluyendo las vías de transducción involucradas en este proceso y los genes, cuyos niveles de transcritos se modifican como respuesta a los patógenos, se desconocen. Por lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en determinar si la vía de transducción de señales mediada por las

MAP cinasas está involucrada en la modificación de la expresión génica en *C. chinense* como respuesta a *Phytophthora capsici*.

En el presente trabajo, se investigó si las respuestas de defensa son inducidas por homogeneizados de paredes celulares de *P. capsici*. Debido a que no existen estudios sobre estas respuestas de *C. chinense* ante la presencia de patógenos, ni se conocen los mecanismos que caracterizan esta respuesta de defensa, se tomaron como referencia algunos parámetros que han sido utilizados en trabajos previos, entre los que se encuentran la alcalinización del medio (García-Pérez *et al.*, 1998), la formación de especies reactivas de oxígeno (Davies *et al.*, 2006) y el incremento en la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas (Egea *et al.*, 1996). Se encontró que la inducción con homogeneizados de pared celular de *P. capsici* provocó la alcalinización del medio de cultivo, modificó la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas y los patrones de expresión de genes de defensa.

Se evaluó la actividad de las MAP cinasas en cultivos celulares de *C. chinense* al ponerlas en contacto con homogeneizados de paredes celulares de *P. capsici*, para determinar si esta vía de transducción de señales se activa como respuesta a la adición de los homogeneizados. Se observó mediante ensayos de cinasa en gel, la presencia de una banda con actividad de cinasa de aproximadamente 46 kDa; posteriormente, mediante el uso de anticuerpos específicos contra MAPK bisfosforiladas, se determinó que la actividad encontrada corresponde a dos MAPK, una de 44 kDa y otra de 46 kDa.

Para determinar si la expresión génica se modifica como respuesta a la inducción, se clonaron sondas homólogas de genes de defensa mediante la síntesis y el escrutinio de una biblioteca de ADNc de cultivos celulares de *C. chinense*. Se obtuvieron las secuencias de genes PR10 y otros 30 genes, la mayoría de los cuales están relacionados con la respuesta al estrés. Se demostró mediante hibridación diferencial que el 39 % de los genes se modificó, 25 % de éstos incrementó el nivel de transcritos y el 14% disminuyó, como respuesta a la adición de paredes celulares de *P. capsici*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gómez, G.L., Boller, T., Ausubel, F.M. and J. Sheen (2002) *MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity*. *Nature*, **415**, 977-983.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and S.P. Dinesh-Kumar (1997) *Signalling in plant microbe interactions*. *Science*, **276**, 726-733.
- Candela, M.E., Espín, A. and M.D. Alcázar (1993) *Soluble pathogenesis-related proteins of Capsicum annuum leaves induced by Cucumber mosaic virus infection*. *Biologia Plantarum* **35**, 609-615.
- Carpin, S., Crèvecoeur, M., Greppin, H. and C. Penel (1999) *Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini*. *Plant Physiology*, **120**, 7999-810.
- 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, W.H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. and M.J. Cho (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 Physiology*, **132**, 1961-1972.
- Davies, N.S.P., Reddy, H., Caivano, M. and P. Cohen (2000) *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. *Biochemistry Journal*, **351**, 95-105.
- Davies, D.R., Bindschelder, L.V., Strickland, T.S. and G.P. Bolwell (2006) *Production of reactive oxygen species in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures in response to an elicitor from Fusarium oxysporum: implications for basal resistance*. *Journal of experimental botany*, **57**, 1817-1827.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K. and S.J. Neil (1999) *Hairpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defense responses in Arabidopsis thaliana suspension cultures*. *Planta*, **210**, 97-103.
- Egea, C., Alcázar, M.D. and M.E. Candela (1996)  *$\beta$ -1,3-glucanase and chitinase as pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two Capsicum annuum cultivars infected with Cucumber mosaic virus*. *Biologia Plantarum*, **38**, 437-443.
- Egea, C., Ahmed, A.S., Candela, M. and M.E. Candela (2001) *Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* **158**, 151-158.
- Euglem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. and I.E. Somssich (1999) *Early nuclear events in plant defense signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors*. *The EMBO Journal* **18**, 4689-4699.

- Favata, M.F., Horiguchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dick, D.E., Pitts, W.J., Earel, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherlet, P.A. and J.M. Trzaskos (1998) *Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 18623-18632.
- García-Pérez, M.D., Egea, C. and M.E.Candela (1998) *Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici**. *Physiologia Plantarum*, **103**, 527-533.
- Hirt, H. (1997) *Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction*. *Trends in Plant Sciences* **2**, 11-15.
- Hirt, H. (2002) *A new blueprint for plant pathogen resistance*. *Nature Biotechnology*, **20**, 450-451.
- Ichimura, K (2002) *Mitogen activated protein kinase cascade in plants: a new nomenclature*. *Trends in Plant Science*, **7**, 301-308.
- Innes, R.W. (2001) *Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense*. *Trends in Plant Science*, **6**, 392-394.
- Jonak, C., Ligterink, W. and H. Hirt (1999) *MAP kinases in plant signal transduction*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 204-213.
- Jonak, C., Ökresz, L., Bögre, L. and H. Hirt (2002) *Complexity, crosstalk and integration of plant MAP kinase signalling*. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 415-424.
- Kim, C.Y. and S. Zhang (2004) *Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family transcription factors and defense genes in tobacco*. *The Plant Journal*, **38**, 142-151.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and D. Scheel (2003) *Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 2256-2264.
- Lee, J., Klessig, D.F. and T. Nürnberger (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*. *The Plant Cell*, **13**, 1079-1093.
- Lee, J., Rudd, J.J., Macioszeck, K. and D. Scheel (2004) *Dynamic changes in localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis related (PR) gene expression during innate immunity in parsley*. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 22440-22448.
- Liu, Y., Schiff, M. and S.P. Dinesh-Kumar (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.
- McDowell, J.M. and B.J. Woffenden (2003) *Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications*. *Trends in Biotechnology*, **21**, 178-183.
- Morris, P.C. (2001) *MAP kinase signal transduction pathways in plants*. *New Phytologist*, **151**, 67-89.

- Odjakova, M. and C. Hadjiinova (2001) *The complexity of pathogen defense in plants*. Bulgarian Journal of Plant Physiology, **27**, 101-109.
- Park, C.J., Kim, K.J., Park, J.M., Shin, Y.C. and K.H. Paek (2004) *Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in antiviral pathway*. The Plant Journal, **37**, 186-198.
- Perezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F. and N.P. Goldberg (2003) *Compendium of pepper diseases*. American Phytopathological Society Press.
- Samaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., Baluska, F. and H. Hirt (2002) *Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth*. The EMBO Journal. **21**, 3296-3306.
- Samuel, M.A., Hall, H., Krzymowska, M., Drzewiecka, K., Henning, J. and B.E. Ellis (2005) *SIPK signaling controls multiple components of harpin-induced cell death in tobacco*. The Plant Journal. **42**, 406-416.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W. and K.H. Paek (2001) *Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of proteinase inhibitor gene*. Plant Science, **161**, 727-737.
- Shin, R., Park, J.M., An, J.M. and K.H. Paek (2002) *Ectopic expression of Tsi1 in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens*. Molecular Plant Microbe Interactions, **15**, 983-989.
- Shin, R., Park, C.J., An, J.M. and K.H. Paek (2003) *A novel TMV induced hot pepper cell wall protein gene (CaTin2) is associated with virus specific hypersensitive response pathway*. Plant Molecular Biology **51**, 687-701.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.L. and J. Sheen (2001) *Plant mitogen-activated protein kinase signalling cascades*. Current Opinion in Plant Biology, **4**, 392-400.
- Tun, D.J. (2001) Chile habanero. Características y tecnología de producción. INIFAP Produce. SAGARPA. Centro de Investigaciones del sureste.
- Wrzaczek, M., and H. Hirt (2001) *Plant MAP kinase pathways: How many and what for?*. Biology of the Cell, **93**, 81-87.
- Xing, T., Malik, K., Martin, T. and B.L. Miki (2001) *Activation of tomato PR and wound-related genes by mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways*. Plant Molecular Biology, **46**, 109-120.
- Zhang, S., Du, H. and D.F. Klessig (1998) *Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from Phytophthora spp.* The Plant Cell, **10**, 435-44.

## **CAPÍTULO I: ANTECEDENTES**

### **1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Capsicum chinense* Jacq.**

*Capsicum chinense* pertenece a la clase Angiosperma, a la subclase Dicotyledonea, al superorden Sympetala, al orden Tubiflorales y a la familia Solanaceae (Soria *et al.*, 2002; Tun, 2001). Son plantas de ciclo anual que pueden alcanzar una altura de 2 m en suelos mecanizados. Su hábito de crecimiento es determinado, y se comporta como planta semiperenne. Sus frutos son bayas huecas con 3 o 4 lóculos, los cuales pueden ser de 2-6 cm, y que en general, son de color verde durante etapas tempranas y posteriormente, se tornan anaranjados, amarillos o rojos (Soria *et al.*, 2002). La semilla es lisa, ovalada y pequeña (2.5-3.5 mm), su germinación varía entre 8 y 15 días. Tiene raíz pivotante y un sistema radicular bien desarrollado, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, de las características del suelo y de las prácticas de manejo, alcanzando hasta 2 metros (Soria *et al.*, 2002; Tun, 2001). Su tallo es grueso, erecto, glabro, robusto, y en general, tiende a formar tres tallos en la primera ramificación para después bifurcarse. Las hojas son simples, lisas, lanceoladas, alternas, de tamaño variable, de distintos tonos de color verde, dependiendo de la variedad, pueden ser glabras, pubescentes, y pueden alcanzar un tamaño de 15 cm de longitud y ancho (Tun, 2001).

## 1.2 PRINCIPALES ENFERMEDADES ASOCIADAS A *C.*

### *chinense*

Uno de los factores que afectan la producción del chile habanero en Yucatán, son las enfermedades ocasionadas por nematodos, bacterias, virus, hongos y oomicetos (Soria *et al.*, 2002).

Los nematodos del género *Meloidogyne*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica* habitan dentro de las raíces induciendo la formación de agallas, se alimentan de los nutrimentos de sus hospederos. Los síntomas en la parte aérea son clorosis y achaparamiento, y las infecciones severas pueden matar a la planta (Thies y Ferry, 2001).

En *C. annuum*, la infección por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* se caracteriza por la formación de manchas foliares (Kousik y Ritchie, 1998).

Existen dos grupos de virus que frecuentemente se encuentran asociados con el género *Capsicum*; el primero es el de los tobamovirus, dentro de los que se puede considerar al *Pepper mild mottle virus*, el cual induce manchas necróticas locales (de la Cruz *et al.*, 1997), y el segundo es el de los begomovirus, como el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), antes *Texas pepper virus* variante Tamaulipas (TPV-Ta) (Lotrakul *et al.*, 2000) y el *Pepper huasteco virus* PHV (Garzón Tiznado *et al.*, 2001; Godínez *et al.*, 2001), los cuales tienen gran importancia a nivel regional (Garzón-Tiznado *et al.*, 2001).

En la Península de Yucatán, los principales microorganismos que se han encontrado asociados a *C. chinense* son *Cercospora capsici* (Soria *et al.*, 2002; Tun, 2001), *Colletotrichum* spp. y *Phytophthora capsici* (Soria *et al.*, 2002).

*C. capsici* produce manchas, tanto en hoja como en tallo, los síntomas que provoca son clorosis y pequeñas manchas ovaladas acuosas que posteriormente, se tornan blancas a café claro con bordes rojos o púrpuras. Además, produce lesiones concéntricas en peciolo, hojas, pedúnculos y tallos. En infecciones graves, provoca clorosis general y defoliación (Pernezny *et al.*, 2003; Soria *et al.*, 2002; Tun, 2001).

La antracnosis, cuyos agentes causales son *Colletotrichum gloeosporoides*, *C. capsici* y *C. coccodes*, se caracteriza por lesiones circulares o anillos concéntricos hundidos con colores desde el pardo hasta el negro. En tallos, hojas y frutos se pueden observar manchas irregulares de color gris o café con bordes negros (Soria *et al.*, 2002; Pernezny *et al.*, 2003).

### 1.2.1 *Phytophthora capsici* Leonian

El género *Phytophthora* pertenece a la familia Pythiaceae, que está incluida dentro del orden Peronosporales, que a su vez se encuentra ubicado dentro del Reino Cromista (Cavalier-Smith, 1998; Cooke *et al.*, 2000). Este género incluye 60 especies de patógenos destructivos con un amplio rango de hospederos (Tyler, 2002). Las temperaturas óptimas para el crecimiento *in vitro* de *P. capsici* son entre 25 y 30 °C, y en el campo, la infección por esta especie es más frecuente en época de lluvias (Fernández-Pavía *et al.*, 2004).

*P. capsici* habita en el suelo, e infecta principalmente las raíces y la base del tallo. Los síntomas iniciales consisten en necrosis de las raíces secundarias y terciarias, posteriormente se marchitan la planta y los frutos (Pérez-Moreno *et al.*, 2002). Se reportó por primera vez en 1922 en Nuevo México (Fernández-Pavía *et al.*, 2004). En *C. annuum*, los síntomas que se observan son lesiones necróticas en tallo y la aclaración de frutos, de tallos y de hojas (Ristaino y Johnston, 1999). Las lesiones comienzan en el ápice del fruto y consisten en áreas romboides con textura rígida y quebradiza de color verde pálido que luego cambian a lesiones acuosas de color café claro a gris. En el interior del fruto, se observa micelio algodonoso que seca y arruga el fruto al avanzar la infección (Soria *et al.*, 2002; Pernezny *et al.*, 2003).

Uno de los factores que favorecen la infección por *P. capsici* es el uso de semilla infectada. Se ha reportado que aún cuando el fruto no presente síntomas, este patógeno puede estar distribuido en todos los tejidos de las semillas (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002). Los productos químicos utilizados hasta el momento no son efectivos, debido a que se ha observado que cada aislamiento presenta

diferente grado de resistencia a los mismos, y a que puede llegar a generar resistencia como resultado de la recombinación (Pérez-Moreno *et al.*, 2004).

### 1.3 INTERACCIÓN ENTRE EL GÉNERO *Capsicum* Y SUS PATÓGENOS

Los estudios sobre los mecanismos de defensa de *C. annuum*, se han realizado a dos niveles: transcripcional, mediante el análisis de la expresión génica, y postraduccional, midiendo la actividad enzimática, durante la interacción planta-patógeno.

Con respecto a las modificaciones postraduccionales, se ha evaluado la actividad de proteínas PR pertenecientes a diferentes familias (Candela *et al.*, 1993). En plantas de *C. annuum* se han identificado proteínas PR, cuya actividad se induce en respuesta a la infección por patógenos. Dentro de estas proteínas se encuentran algunos miembros de las familias PR1, PR2, PR3 y PR4, que se inducen durante la infección por el *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Candela *et al.*, 1993), las  $\beta$ -1,3-glucanasas en respuesta al CMV (Egea *et al.*, 1996) y a *P. capsici* en variedades resistentes (García-Pérez *et al.*, 1998), así como las quitinasas y las peroxidasas en las mismas variedades (Egea *et al.*, 2001), y las esterases (Kim *et al.*, 2001).

Como parte de los estudios a nivel transcripcional, mediante el análisis de la expresión diferencial, se han clonado secuencias de ADNc inducidas durante la respuesta de *C. annuum* a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Jung y Hwang, 2000) y al *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Shin *et al.*, 2001). También se observó que algunos de los genes inducidos durante la infección por *Xanthomonas* son aquellos que codifican quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, tiorinas, transferasas de lípidos (Jung y Hwang, 2000; Park *et al.*, 2002), osmotinas (PR5) y proteínas con dominios LRR, mientras que los genes que se identificaron en respuesta al TMV son PR10, PR4, transferasas de lípidos, ornitina descarboxilasa, proteína de pared celular, piruvato

descarboxilasa, proteasas de cisteína, un factor de elongación, enolasa y otros (Shin *et al.*, 2001).

Se han caracterizado otros productos, los cuales incluyen una proteína de unión a quitina que se sintetiza durante el tratamiento con diferentes inductores como el etefón y el jasmonato de metilo, a la infección por *Colletotrichum gloesporoides* y como respuesta a heridas (Lee *et al.*, 2001); una transferasa de lípidos localizada en la superficie de la célula, que se induce durante la interacción incompatible con el TMV y durante la infección con *Xanthomonas*, al igual que por el ácido salicílico y el etefón (Park *et al.*, 2002). Mediante la aplicación del ensayo de despliegue diferencial del ARN de hojas de *C. annuum* infectadas con *X. campestris* pv. *glycine* se identificó una ciclooxigenasa, que se induce a las 4 horas de la infección y demuestra la importancia de la señalización mediante lípidos durante el desarrollo de la respuesta de hipersensibilidad (Kim *et al.*, 2002).

Así mismo, la expresión de uno de los genes pertenecientes a la familia PR10 se induce durante la interacción incompatible con el virus mosaico del tabaco (TMV), ya que posee actividad de ribonucleasa, lo cual sugiere su participación en el mecanismo de resistencia antiviral (Park *et al.*, 2004). Este gen está también involucrado en la resistencia o la tolerancia de *C. annuum* contra un amplio rango de patógenos, incluyendo al *Pepper mild mottle virus* (PMMV), al *Cucumber mosaic virus* (CMV), a la bacteria *X. campestris* pv. *vesicatoria* y a oomicetos como *P. capsici* (Shin *et al.*, 2002).

En *C. chinense* se han identificado diferentes genes que le confieren resistencia a algunos virus. Se ha comprobado que la resistencia al *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) está controlada por un gen desconocido hasta el momento (Moury *et al.*, 1997), y que la resistencia al *Pepper mottle virus* (PepMoV) es un carácter dominante que se encuentra dentro de un mismo grupo (Grube *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque se sabe que *P. capsici* podría afectar a *C. chinense* (Soria *et al.*, 2002), se conoce muy poco sobre las alteraciones moleculares durante esta interacción. El conocer los eventos que se desencadenan durante esta interacción es importante para que posteriormente, se puedan implementar programas de

fitomejoramiento que permitan disminuir las pérdidas ocasionadas por este patógeno.

## 1.4 GENERALIDADES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

En general existen dos tipos de interacción planta-patógeno, la no específica de hospedero, y la específica de hospedero (Nürbenger, 1999). En la primera, que es la más común, se incluyen aquellas interacciones en las cuales todas las variedades de una especie vegetal son resistentes a todas las cepas o razas de una especie de microorganismos invasores, potencialmente patogénicos (Nürbenger y Lipka, 2005); en la segunda, la interacción ocurre entre una variedad particular de una especie vegetal y una raza específica del patógeno e implica la interacción entre moléculas específicas de ambos participantes (Keen, 1990).

Dentro de las interacciones planta-patógeno específicas de hospedero, se encuentran dos subdivisiones: la interacción compatible, que se lleva a cabo en hospederos susceptibles, favoreciendo el crecimiento y el desarrollo del patógeno, y la interacción incompatible, en la cual, se desencadena la resistencia por la interacción entre los productos de los genes de resistencia (*R*) de la planta con los productos de los genes de avirulencia (*Avr*) del patógeno, ya sea de manera directa (Martin *et al.*, 2003), o mediante otras proteínas, que en conjunto activan los mecanismos de defensa de las plantas (McDowell y Woffenden, 2003). En las plantas existen principalmente dos tipos de respuestas de defensa contra patógenos: las preformadas y las inducidas (Osbourn, 1996). Uno de los mecanismos mediante el cual las plantas evitan el ataque por patógenos, es el mecanismo de protección pasiva, que consiste en la presencia de barreras físicas y de compuestos preformados, como las capas de ceras epicuticulares que se encuentran sobre la epidermis en toda la planta (Dangl y Jones, 2001; Odjakova y Hadjiivanova, 2001; Osbourn, 1996) y algunos compuestos antifúngicos, como las saponinas, las avenasinas, los glucósidos cianogénicos y los glucosinolatos

(Osbourn, 1996). Algunas de las modificaciones estructurales que se llevan a cabo en las plantas ante una infección por patógenos, son el reforzamiento de las paredes celulares mediante el depósito de polisacáridos, de proteínas, de glucoproteínas y de fenoles insolubles (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

Por otra parte, la respuesta inducida puede dividirse en dos tipos, una respuesta local y rápida, conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (Zaninotto *et al.*, 2006), la activación de vías de transducción de señales (Ren *et al.*, 2006) y la muerte celular (Greenberg y Yao, 2004), cuyo resultado es la contención del patógeno (Baker *et al.*, 1997; Dangl, 1996; Eckardt, 2002; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Keen, 1992; Lam *et al.*, 2001). El otro tipo de respuesta inducida es la resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual involucra procesos de señalización tisular y la activación de los genes PR en zonas lejanas al sitio de infección (Eckardt, 2002). Esta respuesta puede permanecer durante varios días (Baker *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1996). Las respuestas HR y SAR no son específicas, pueden inducirse como resultado de interacciones no específicas de hospedero y por la interacción de los productos de los genes *R* de la planta y *Avr* del patógeno, lo que se conoce como el modelo gen-gen (Flor, 1971; Baker *et al.*, 1997; Greengerg, 1997), que se describirá con mayor detalle más adelante.

#### **1.4.1 RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO**

El reconocimiento del patógeno es fundamental para que se establezca la respuesta de defensa, ya que en el caso de algunas de las plantas susceptibles la célula vegetal no reconoce al patógeno, lo que permite la infección (McDowell y Doffenden, 2003). Durante el reconocimiento participan los receptores, entre los que se encuentran algunas proteínas R, las cuales se pueden encontrar intracelular, extracelularmente o pueden ser transmembranales (Gachomo *et al.*, 2003).

#### 1.4.2 LOS GENES R Y EL MODELO GEN AGEN

Durante la interacción planta-patógeno, una vez que éste último es reconocido a nivel molecular, se inician una serie de reacciones asociadas con la resistencia, como el flujo de iones a través de la membrana plasmática, la generación de especies reactivas de oxígeno o explosión oxidativa (Apel y Hirt, 2004; Baker *et al.*, 2002; Levine *et al.*, 1994; Mellersh *et al.*, 2002), la fosforilación de proteínas específicas, la activación de enzimas involucradas en la síntesis de la lignina para reforzar las paredes celulares (Egea *et al.*, 2001), la activación transcripcional de genes de defensa (McDowell y Woffenden, 2003), la inducción de fitoalexinas, la muerte celular localizada en el sitio de la infección (Heath, 2000; Lam *et al.*, 2001) y por último, la resistencia sistémica adquirida (Knogge, 1996; Ryals *et al.*, 1996).

La resistencia de las plantas a los patógenos es un proceso complejo que involucra la activación de vías de señalización interconectadas y la inducción de muchos genes (Eckardt, 2002). El modelo gen-gen, establece que los productos de los genes de resistencia (*R*) de la planta interaccionan específicamente con los productos de los genes de avirulencia (*Avr*) del patógeno, confiriéndoles resistencia (Flor, 1971).

Hasta el momento se han encontrado más de 125 potenciales genes *R* en el genoma de *Arabidopsis thaliana* y más de 600 en el de *Oryza sativa* (Nimchuck *et al.*, 2003). En su forma más simple, el producto del gen *R* (receptor) de la célula vegetal reconoce el producto del gen *Avr* del patógeno (ligando), mediante la interacción directa entre ambos productos (McDowell y Woffenden, 2003; Odjakova y Hadjiivanova, 2001). Este modelo de interacción gen-gen ha sido demostrado de manera experimental en algunos ejemplos como en la interacción raza específica entre los productos *Pi-ta* de *Oryza sativa* y *Avr Pi-ta* de *Magnaporthe grisea*. En la mayoría de los casos, los productos génicos *R* y *Avr* no interaccionan directamente, sino que la unión de estos dos productos está mediada por un tercer componente conocido como blanco de virulencia vegetal; por ejemplo, los productos de los genes *AvrB/AvrRPM1* de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* interaccionan con la

proteína RPM1 y con RIN4 como blanco de virulencia, ambos de *A. thaliana* (Hammond y Parker, 2003).

Las proteínas R poseen dos funciones principales: el reconocimiento del patógeno y la activación de las cascadas de señalización que inducen las respuestas de defensa (Baker *et al.*, 1997).

De acuerdo con su estructura, los genes *R* encontrados en las plantas están clasificados principalmente en cinco grupos: i) proteínas cinasas intracelulares, ii) proteínas cinasas tipo receptor con un dominio extracelular rico en leucinas (LRR), iii) proteínas con dominios LRR intracelulares con un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y un motivo de cierre de leucina, iv) proteínas intracelulares NBS-LRR con una región semejante al motivo Toll de las proteínas TIR de mamíferos y de *Drosophila*, y v) proteínas LRR extracelulares de unión a membrana (Baker *et al.*, 1997; McDowell y Woffenden, 2003; Odjakova y Hadjiivanova, 2001). Se sabe que el dominio LRR contribuye a la especificidad de reconocimiento del patógeno (Dangl y Jones, 2001).

De las cinco clases de proteínas R, las que pertenecen a la clase NBS-LRR se han asociado de modo específico con la resistencia, por lo que se consideran como los componentes principales del sistema de defensa de las plantas. Básicamente consisten en un dominio de unión a nucleótidos, que posee similitud con proteínas proapoptóticas descritas en animales, son capaces de hidrolizar ATP y poseen dominios variables LRR, los cuales podrían ser responsables de la interacción directa con las proteínas Avr o con otras proteínas del hospedero. Éstas se pueden dividir en dos tipos, proteínas con un dominio "coiled coil" (CC) o con un dominio tipo receptor Toll-IL1; al parecer, ambos son dominios de interacción proteína-proteína, por lo que podrían estar actuando sobre componentes de las vías de transducción de señales (Nimchuck *et al.*, 2003).

Por otro lado, es posible distinguir dos tipos de proteínas R de acuerdo con su especificidad: las específicas y las no específicas de raza, siendo las primeras aquellas que reconocen solamente los productos de los genes *Avr* de una variante, y por lo tanto, poseen alta especificidad (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9*, *Ve1*, *Ve2*, *Xa21*, *Pto*,

*RPM1, RPP5, BS2, PBS1, RRS1*). Las raza no específicas (*FLS2, RPG1, RPW8*), desencadenan una respuesta de defensa contra diversas variantes o cepas del patógeno (Hammond y Parker, 2003).

En tabaco se evaluó la inducción de la respuesta de defensa mediada por *R/Avr* mediante la transformación de plantas con el gen de resistencia *Cf-9*, el cual es un gen de *Lycopersicon esculentum* que confiere resistencia a esta especie contra *Cladosporium fulvum*. Se utilizaron células en suspensión de tabaco que fueron inoculadas con los fluidos intracelulares de plantas de tabaco transformadas con *Avr9*. Al tratar las células con los fluidos con (*Avr9+*) o sin *Avr9* (*Avr9-*), observaron que sólo en el caso de *Avr9+* se indujo la respuesta de defensa, indicando que la respuesta está mediada por la interacción del producto del gen *R* de la planta con los del gen *Avr* del patógeno (Romeis *et al.*, 1999).

Después del reconocimiento del patógeno mediante el receptor, para inducir la respuesta, es necesario que se activen las vías de señalización que tendrán efecto sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa (Baker *et al.*, 1997).

#### **1.4.3 LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LA INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO**

Los mecanismos de transducción de señales son vías mediante las cuales la señal es transducida al núcleo, para dar inicio a las respuestas de defensa (McDowell y Dangl 2000), entre las que se encuentran la respuesta de hipersensibilidad, que consiste en la muerte de las primeras células infectadas y la acumulación local de compuestos antimicrobianos (Osborn, 1996). Estas vías de transducción de señales son muy complejas, debido a que en ellas participan un conjunto de proteínas que responden, no solamente a la percepción de señales fisiológicas relacionadas con la comunicación entre tejidos, sino también a condiciones de estrés biótico y abiótico. Como ejemplos de estas vías podemos encontrar a la vía del jasmonato (Turner *et al.*, 2002), la señalización por calcio

(Sanders *et al.*, 2002) y la vía mediada por MAPK (Lingtering *et al.*, 1997), entre otras.

### 1.4.3.1 SEÑALIZACIÓN POR CALCIO

La vía de transducción de señales mediada por calcio está involucrada no solo en la respuesta de defensa contra patógenos, sino también en la respuesta contra diferentes tipos de estrés. Parte de la respuesta temprana de las células vegetales a la infección por los patógenos involucra el flujo de calcio extracelular al interior de la célula (Bouché *et al.*, 2005). Esto es posible debido a la despolarización de la membrana, que provoca la apertura de canales permeables a calcio, permitiendo que éste fluya al interior de la célula para que la señal pueda ser percibida por sensores, como la calmodulina o las proteínas cinasas dependientes de calcio ó CDPK (Bouché *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2002).

Las cinasas dependientes de calcio, son cinasas de serina-treonina que poseen una estructura conservada, que consiste en un dominio N-terminal variable, un dominio catalítico (cinasa), una región altamente conservada, cuya función es la autoinhibición, y un extremo tipo calmodulina que en la mayoría de los casos, contiene motivos conservados de unión a calcio (Bouché *et al.*, 2005). En *Arabidopsis thaliana* se han secuenciado al menos 13 miembros pertenecientes a esta familia (Hardie, 1999); en la actualidad, se conocen algunos de sus sustratos, entre los cuales se encuentran la nitrato reductasa, la sacarosa sintasa, la fenilalanina-amonio liasa, la amino-1-ciclopropano carboxilato sintasa, las acuaporinas, los canales de potasio, los canales de cloruro, la bomba de calcio, la bomba de protones y el factor de despolimerización de actina (Sanders *et al.*, 2002). La activación de genes de defensa y la producción de fitoalexinas se comprometen en presencia de queladores o inhibidores de los canales de calcio (Scheel, 1998). Como se mencionó anteriormente, el modelo gen-gen determina la resistencia o susceptibilidad de las plantas a un patógeno específico, y se ha demostrado que las

cinastas dependientes de calcio se activan durante este tipo de interacción (Romeis *et al.*, 2000).

Las calmodulinas son proteínas de 16 a 18 kDa sin actividad catalítica, que al unirse al calcio activan proteínas blanco involucradas en varios procesos celulares. Estas proteínas están compuestas de dos dominios globulares con capacidad de unión a calcio, conectados con una hélice flexible (Luan *et al.*, 2002). Se sabe que estas proteínas son importantes en la respuesta de defensa (Bouché *et al.*, 2005); por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de una calmodulina tiene como resultado un aumento en el nivel de la resistencia sistémica adquirida (Heo *et al.*, 1999). En *Arabidopsis thaliana* recientemente se identificó una oxido nítrico sintasa, que es una calmodulina que cataliza la síntesis de óxido nítrico (Dangl, 1998). En presencia de inductores bacterianos aumentan los niveles de esta molécula y tiene efecto sobre la expresión génica; además, se observó que las plantas que carecen de *AtNOS1* son más susceptibles a bacterias (Dangl, 1998).

#### **1.4.3.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por las células vegetales, como respuesta primaria a diferentes tipos de estrés, pueden movilizarse por difusión y son muy importantes en la respuesta de hipersensibilidad (Levine *et al.*, 1994). Durante la interacción incompatible, la producción de  $H_2O_2$  se da rápidamente al inicio, y posteriormente, se presenta una segunda explosión oxidativa de manera prolongada, a diferencia de la interacción compatible, donde una vez que el patógeno invade a la planta, solamente se observa una explosión oxidativa rápida (Mittler *et al.*, 2004). Las ROS están involucradas en el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida, ya que inducen la expresión de genes de defensa en sitios lejanos a la infección (Apel y Hirt, 2004). Las ROS están relacionadas con la inducción de la muerte celular durante la respuesta de hipersensibilidad, se difunden a células cercanas al sitio necrosado, induciendo genes de defensa involucrados en la protección celular, como la glutatión S-peroxidasa (Mittler *et al.*, 2004); y también participan en la protección de células

cercanas al sitio de la infección, de manera que la muerte celular permanezca localizada (Graham y Graham, 1999). Otros ejemplos de los genes inducidos por ROS incluyen a la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (Levine *et al.*, 1994), los receptores tipo cinasa, los genes PR y genes que codifican proteínas con función antioxidante (Apel y Hirt, 2004).

### **1.4.3.3      PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS**

La cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una vía de transducción de señales universal que se encuentra en todos los eucariotes estudiados (Widmann *et al.*, 1999). Esta cascada, consiste en una serie de fosforilaciones mediante las cuales se transduce una señal hasta el interior del núcleo, y consiste en un módulo de tres proteínas donde la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, una cinasa de serina/treonina) se activa mediante su interacción con receptores celulares o con proteínas acopladoras (Vomastek *et al.*, 2004). La MAPKKK activada, fosforila a una MAP cinasa cinasa (MAPKK, una cinasa dual) en residuos de serina y finalmente, la MAPKK activada fosforila a una MAP cinasa (MAPK, una cinasa de serina/treonina) (Eckardt, 2002; Hunter, 1995). Estas tres proteínas entrelazadas por complejos protéicos acopladores, forman un módulo básico de una vía de MAPK, en la cual un estímulo extracelular o perturbación es percibido por la membrana plasmática hasta el núcleo, alterando la expresión genética (Cheong *et al.*, 2003; Hazzalin y Mahadevan, 2002; Hirt, 1997). Los módulos de MAPK de plantas participan en la transducción de señales, tanto externas (estrés biótico o abiótico) como internas, incluyendo a todos los reguladores del crecimiento (Hirt, 1997).

### **1.4.4      EXPRESIÓN GÉNICA EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO**

Se han realizado diversos estudios sobre las modificaciones en la expresión génica de las plantas durante la respuesta contra patógenos, con la finalidad de identificar genes que se inducen o se reprimen durante la interacción planta-

patógeno, para lo cual se utilizan técnicas como el despliegue diferencial (DD) (Liang y Pardee, 1992), el análisis del polimorfismo de fragmentos de ADNc amplificados (cDNA-AFLP) (Bachem *et al.*, 1998), el análisis serial de la expresión génica (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995), la hibridación substractiva (Diatchenko *et al.*, 1996) y el análisis por microarreglos (Shalon *et al.*, 1996).

Algunos de los genes cuya expresión se modifica durante una infección, codifican diferentes tipos de proteínas involucradas, tanto en la respuesta de defensa, como otros mecanismos celulares, como la reorganización del citoesqueleto, el ciclo celular, el metabolismo secundario, el estrés oxidativo, la replicación, la transcripción génica, la transducción de señales (receptores y proteínas cinasas), la síntesis de fitoreguladores como moléculas de señalización, etc. Dentro de éstas, se pueden mencionar a cinasas de tipo receptor (Nimchuck *et al.*, 2003), proteínas de unión a calcio (Bouché *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2002), factores de transcripción (Li *et al.*, 2004), proteínas tipo calmodulina (Bouché *et al.*, 2005), fosfatasas (Luan *et al.*, 2003), transferasas de lípidos (Park *et al.*, 2002), MAPK (He *et al.*, 1999; Song y Goodman, 2002), ciclooxygenasas (Kim *et al.*, 2002), proteínas de pared celular (Shin *et al.*, 2003), peroxidasas y proteínas inducidas por fosfato, entre otras (Durrant *et al.*, 2000).

Otros de los genes cuya inducción es característica de la respuesta de defensa son los genes relacionados con la explosión oxidativa (Apel y Hirt, 2004), la detoxificación (Mittler, 2002), la reorganización del citoesqueleto (Takemoto y Hardham, 2004), la modificación de la pared celular (Asselberg *et al.*, 2007), la señalización celular (McDowell y Dangl, 2000) y aquellos que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) (Van Loon y Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Éstas últimas están agrupadas en 14 familias: PR-1 (Candela *et al.*, 1993), PR-2 (Candela *et al.*, 1993), PR-3 (Candela *et al.*, 1993; Egea *et al.*, 1996), PR-4 (Candela *et al.*, 1993), PR-5, PR-6, PR-7, PR-8 (Egea *et al.*, 1996), PR-9 y PR-10 (Park *et al.*, 2004).

## 1.5 HIPÓTESIS

Si la vía de transducción mediada por las MAPK está involucradas en la respuesta de defensa de *Capsicum chinense* Jacq., entonces la adición de homogeneizados de *Phytophthora capsici* Leon. modificará la actividad de las mismas, en cultivos celulares de *C. chinense* Jacq.

## 1.6 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la adición de homogeneizados de paredes celulares de *P. capsici* Leon. modifica la actividad de MAPK durante la respuesta de defensa en células en suspensión de *Capsicum chinense* Jacq.

### 1.6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la concentración de homogeneizados de *P. capsici* Leon. (CWH), así como el tiempo de incubación suficientes para inducir la respuesta de defensa en células en suspensión de *C. chinense* Jacq.
- Evaluar las modificaciones en la actividad y en los niveles de transcritos de las MAP cinasas en cultivos celulares de *C. chinense* Jacq. tratados con homogeneizados de *P. capsici* Leon.
- Analizar las modificaciones en la expresión génica durante la respuesta de defensa, cuando cultivos celulares de *C. chinense* Jacq. son expuestos a homogeneizados de *P. capsici* Leon.

## 1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apel, K. and H. Hirt (2004) *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction*. Annual Review of Plant Biology, **55**, 373-399.
- Asselberg, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylstek, M., Van Breusegem, F. and M. Höfte (2007) *Resistance to Botrytis cynerea in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis*. Plant Physiology, **144**, 1863-1877.
- Bachem, C.W.B., Oomen, R.J.F.J. and R.G.F. Visser (1998) *Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol*. Plant Molecular Biology Reporter, **16**, 157-173.
- Baker, B., Zambrynski, P., Staskawics, B. and S.P. Dinesh-Kumar (1997) *Signaling in plant-microbe interactions*. Science **276**, 726-733.
- Baker, C.J., O'Neil, N.R., Deahl, K. and J. Lydon (2002) *Continuous production of extracellular antioxidants in suspension cells attenuates the oxidative burst detected in plant microbe interactions*. Plant Physiology and Biochemistry, **40**, 641-644.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A. and H. From (2005) *Plant specific calmodulin binding proteins*. Annual Review of Plant Biology, **56**, 435-466.
- Candela, M.E., Espín, A. and M.D. Alcázar (1993) *Soluble pathogenesis related proteins of Capsicum annuum leaves induced by Cucumber mosaic virus*. Biologia Plantarum, **35**, 609-615.
- Cavalier-Smith, T. (1998) *A revised six kingdom system of life*. Biological Reviews, **73**, 203-266.
- 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, W.H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. and M.J. Cho (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 Physiology, **132**, 1961-1972.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and C.M. Brasier (2000) *A molecular phylogeny of Phytophthora and related oomycetes*. Fungal Genetics and Biology, **30**, 17-32.
- Dangl, J.L. (1998) *Plants just say NO to pathogens*. Nature, **394**, 525-527.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D. (2001) *Plant pathogens and integrated defense responses to infection*. Nature, **411**, 826-833.
- De la Cruz, A., López, L., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T. and I. García-Lucke (1997) *The coat protein is required for the elicitation of the Capsicum L2 gene-mediated resistance against tobamoviruses*. Molecular Plant Microbe Interactions, **10**, 107-113.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and P.D. Siebert (1996) *Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **93**, 6025-6030.

- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jones (2000) *cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race specific resistance and wound response gene expression profiles*. *The Plant Cell*, **12**, 963-977
- Eckardt, N.A. (2002) *Plant disease susceptibility genes*. *The Plant Cell*, **14**, 1983-1986.
- Eckardt, N.A. (2002) *Specificity and cross talk in plant signal transduction: January 2002 Keystone symposium*. *The Plant Cell*, S9-S14.
- Egea, C., Alcázar, M.D. and M.E. Candela (1996)  *$\beta$ -1,3-glucanase and quitinase as a pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two *Capsicum annuum* cultivars infected with cucumber mosaic virus*. *Biologia Plantarum*, **38**, 437-443.
- Egea, C., Ahmed, A.S., Candela, M. and M.E. Candela (2001) *Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici**. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 151-158.
- Fernández-Pavía, S.P., Biles, C.L., Waugh, M.E., Onsurez-Waugh, K., Rodríguez-Alvarado, G., and C.M. Liddell (2004) *Characterization of Southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.)*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **22**, 82-89.
- Flor, H.H. (1971) *Current status of the gene-for-gene concept*. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275-296.
- Gachomo, E.W., Shonukan, O.O. and S.O. Kotchoni (2003) *The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants*. *African Journal of Biotechnology*, **2**, 26-32.
- García-Pérez, M.D., Egea, C. and M.E. Candela (1998) *Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici**. *Physiologia Plantarum*, **103**, 527-533.
- Garzón-Tiznado, J.A., Acosta-García, G., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Rivera-Bustamante, R., Maya-Hernández, V. and R.G. Guevara-González (2002) *Presencia de los geminivirus huasteco del chile (PHV), Texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T) y chino del tomate (VCdT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **20**, 45-52.
- Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J.L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M.Y.L. and I. Torres-Pacheco (2001) *Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chilli peppers from Yucatan, Mexico*. *HortScience*, **36**, 139-142.
- Graham, T.L. and M.Y. Graham (1999) *Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 13-20.
- Greenberg, J.T. and N. Yao (2004) *The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions*. *Cellular Microbiology*, **6**, 201-211.
- Grube, R.C., Blauth, J.R., Arnedo, A.M.S., Caranta, C. and M.K. Jahn (2000) *Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum**. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 852-859.

- Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jones (1996) *Resistance gene-dependent plant defense responses*. The Plant Cell, **8**, 1773-1791.
- Hammond, K.E. and J.E. Parker (2003) *Deciphering plant-pathogen communication, fresh perspectives for molecular resistance breeding*. Current Opinion in Biotechnology, **14**, 177-193.
- Hardie, D.G. (1999) *Plant protein serine/threonine kinases: classification and function*. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, **50**, 97-131.
- Hazzalin, C.A. and L.C. Mahadean (2002) *MAPK regulated transcription: a continuously variable gene switch?*. Nature Reviews, **3**, 30-39.
- Heath, M.C. (2000) *Hypersensitive response-related death*. Plant Molecular Biology, **44**, 321-334.
- He, C., Fong, S.H., Yang, D. and G.L. Wang (1999) *BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice*. Molecular Plant Microbe Interactions, **12**, 1064-1073.
- Heo, W.D., Lee, S.H., Kim, M.C., Kim, J.C. and W.S. Chung (1999) *Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses*. Proceedings of the National Academy of Science, **96**, 766-771.
- Hirt, H. (1997) *Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction*. Trends in Plant Sciences, **2**, 11-15.
- Hirt, H. (2000) *Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway*. Proceedings of the National Academy of Science, **97**, 2405-2407.
- Hunter, T. (1995) *Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell **80**, 225-236.
- Jung H.W. and B.K. Hwang (2000) *Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis related cDNA genes from pepper leaves infected by Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. Molecular Plant Microbe Interactions, **13**, 136-142.
- Keen, N.T. (1990) *Gene-for-gene Complementarity in Plant-pathogen interactions*. Annual Review of Genetics, **24**, 447-63.
- Keen, N.T. (1992) *The molecular biology of disease resistance*. Plant Molecular Biology, **19**, 109-122.
- Kim, Y.S., Lee, H.H., Ko, M.K., Song, C.E., Bae, C.Y., Lee, Y.H. and B.J. Oh (2001) *Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (Capsicum annuum) esterase*. Molecular Plant Microbe Interactions, **14**, 80-85.
- Kim, Y.C., Yi, S.Y., Mang, H.G., Seo, Y.S., Kim, W.T. and D. Choi (2002) *Pathogen induced expression of cycloxygenase homologue in hot pepper (Capsicum annuum cv. Pukang)*. Journal of Experimental Botany, **53**, 383-385.
- Knogge, W. (1996) *Fungal infection of plants*. The Plant Cell, **8**, 1711-1722.
- Kousik, C.S. and D.F. Ritchie (1998) *Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes*. Plant Disease, **82**, 181-186.

- Lam, E., Kato, N. and M. Lawton (2001) *Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response*. *Nature*, **411**: 848-853.
- Lee, S.C., Kim, Y.J., and B.H. Hwang (2001) *A pathogen-induced chitin binding protein gene from pepper its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding*. *Plant Cell Physiology*, **42**, 1321-1330.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and C. Lamb (1994) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response*. *Cell*, **79**, 583-593.
- Li, J., Brader, G. and E.T. Palva (2004) *The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signal in plant defense*. *The Plant Cell*, **16**, 319-331.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1995) *Recent advances in differential display*. *Current Opinion in Immunology*, **7**, 274-280.
- Lingtering, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. and D. Scheel (1997) *Receptor mediated activation of MAP kinase in pathogen defense of plants*. *Science*, **276**, 2054-2057.
- Lotrakul, P., Valverde, R.A., de la Torre, R. and J. Sim (2000) *Ocurrence of a strain of Texas pepper virus in Tabasco and habanero pepper in Costa Rica*. *Plant Disease*, **84**, 168-172.
- Luan, S., Kudla, J., Rodríguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. and W. Griesem (2002) *Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants*. *The Plant Cell*, S389-S400.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and G. Sessa (2003) *Understanding the functions of plant disease resistance proteins*. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 23-61.
- McDowell, G.B. and J.F. Dangl (2000) *Signal transduction in the plant immune response*. *Trends in Biochemical Science*, **25**, 79-82.
- McDowell, J.M. and B.J. Woffenden (2003) *Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications*. *Trends in Biotechnology*, **21**, 178-183.
- Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J. and M.C. Heath (2002) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interaction*. *The Plant Journal*, **29**, 257-268.
- Mittler, R. (2002) *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Golley, M. and F.V. Breusegem (2004) *Reactive oxygen gene network of plants*. *Trends in Plant Science*, **9**, 490-498.
- Morales-Valenzuela, G., Redondo, E., Covarrubias-Prieto, J. y E. Cárdenas-Soriano (2002) *Detección y localización de Phytophthora capsici Leo. en semilla de chile*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **20**, 94-97.
- Moury, B., Palloix, A., Gebre, S.K. and G. Marchoux (1997) *Hypersensitive resistance to Tomato spotted wilt virus in three Capsicum chinense accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains*. *Euphytica*, **94**, 45-52.

- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F. and J.L. Dangi (2003) *Recognition and response in the plant immune resistance*. Annual Review of Genetics, **37**, 579-609.
- Nürnberg, T. (1999) *Signal perception in plant pathogen defense*. Cellular and Molecular Life Sciences, **55**, 167-182.
- Nürnberg, T. and V. Lipka (2005) *Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon*. Molecular Plant Pathology, **6**, 335-345.
- Odjakova, M. and C. Hadjiinova (2001) *The complexity of pathogen defense in plants*. Bulgarian Journal of Plant Physiology, **27**, 101-109.
- Osborn, A.E. (1996) *Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack*. The Plant Cell, **8**, 1651-1668.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., You, J.S. and K.H. Paek (2002) *Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. Plant Molecular Biology, **48**, 243-254.
- Park, C.J., Kim, K.J., Park, J.M., Shin, Y.C. and K.H. Paek (2004) *Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in antiviral pathway*. The Plant Journal, **37**, 186-198.
- Pérez-Moreno, L., Durán-Ortiz, L.J., Ramírez-Malagón, R. and J.R. Sánchez-Pale (2002) *Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de Phytophthora capsici Leo*. Revista Mexicana de Fitopatología, **21**, 19-25.
- Pernezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F. and N.P. Goldberg (2003) *Compendium of pepper diseases*. American Phytopathological Society Press 63 p.p.
- Ren, D., Yang, K.Y., Li, G.J., Liu, Y., and S. Zhang (2006) *Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death*. Plant physiology, **141**, 1482-1493.
- Ristaino, J.B. and S.A. Johnson (1999) *Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper*. Plant Disease, **83**, 1080-1089.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., and J.D.G. Jones (1999) *Rapid Avr9- and Cf9- dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses*. The Plant Cell, **11**, 273-287.
- Romeis, T., Piedras, P. and J. Jones (2000) *Resistance gene-dependent activation of a calcium dependent protein kinase in the plant defense response*. The Plant Cell, **12**, 803-815.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and M. Hunt (1996) *Systemic acquired resistance*. The Plant Cell, **8**, 1809-1819.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and J.F. Harper (2002) *Calcium at the crossroads of signaling*. The Plant Cell, S401-S417.
- Scheel, D. (1998) *Resistance response physiology and signal transduction*. Current Opinion in Plant Biology **1**, 305-310.
- Shalon, D., Smith, S.J. and P.O. Brown (1996) *A DNA micro-array system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization*. Genome Research, **6**, 639-645.

- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W. and K.H. Paek (2001) *Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and characterization of a protein kinase inhibitor*. *Plant Science*, **161**, 727-737.
- Shin, H.J., Lee, D.A., Shin, D.H., Kim, K.U., Kim, H.Y., Ohashi, Y., Han, O., Baik, M.G. and K. Back (2001) *Molecular cloning and cultivar specific expression of MAP kinases from Capsicum annuum*. *Molecules and Cells*, **11**, 48-54.
- Shin, R., Park, C.J., An, J.M. and K.H. Paek (2003) *A novel TMV induced hot pepper cell wall protein gene (CaTin2) is associated with virus specific hypersensitive response pathway*. *Plant Molecular Biology*, **51**, 687-701.
- Soria, F.M.J., Trejo, R.J.A., Tun, S.J.M. and S.R. Terán (2002) Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2. Conkal, Yucatán.
- Song, F. and R.M. Goodman (2002) *OsBIMK1, a rice MAP kinase involved in disease resistance responses*. *Planta*, **215**, 997-1005.
- Takemoto, D. and A.R. Hardham (2004) *The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants*. *Plant Physiology*, **136**, 3864-3876.
- Thies, J.A. and R.L. Ferry (2001) *Characterization of Capsicum chinense cultigens for resistance to Meloidogyne arenaria, M. hapla and M. javanica*. *Plant Disease*, **85**, 267-270.
- Tun, D.J. (2001) Chile habanero. Características y tecnología de producción. INIFAP Produce. SAGARPA. Centro de investigaciones del sureste.
- Turner, J.G., Ellis, C. and A. Devoto (2002) *The jasmonate signal pathway*. *The Plant Cell*, S153-S164.
- Tyler, B.M. (2002) *Molecular basis of recognition between Phytophthora pathogens and their hosts*. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 137-167.
- Van Loon, L.C. y E.A. Strien (1999) *The families of patogénesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 85-97.
- Van Loon, L.C., Rep, M. and C.M.J. Pieterse (2006) *Significance of inducible defense-related proteins in infected plants*. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and K.W. Kinzler (1995) *Serial Analysis of Gene Expression*. *Science*, **270**, 484-487.
- Vomastek, T., Schaffeffler, H.J., Tarcsafalvi, A., Smolkin, M.E., Bissonette, E.A. and M.J. Weber (2004) *Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists*. *Proceedings of the National Academy of Science*, **101**, 6981-6986.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and G.L. Johnson (1999) *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three kinase module from yeast to human*. *Physiological Reviews*, **79**, 143-180.
- Zaninotto, F., La Camera, S., Polverani, A., and M. Delledonne (2006) *Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response*. *Plant Physiology*, **141**, 379-383.



## **CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Capsicum chinense* Jacq.**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

La respuesta de defensa de las plantas es un proceso que consiste en el reconocimiento del patógeno y la activación de vías de transducción de señales que tendrán como consecuencia la modificación en los niveles de expresión de genes de defensa (Nimchuk *et al.*, 2003; Jung y Hwang, 2000; Shin *et al.*, 2001). La respuesta de defensa puede dividirse en dos tipos, dependiendo del lugar en el cual se observa. La defensa local consiste en la respuesta de hipersensibilidad (Gechev y Hille, 2005; Mellersh *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 1994), que se caracteriza por la muerte celular rápida y localizada en el sitio de la infección y que tiene como resultado evitar que el patógeno se extienda a otros tejidos de la planta.

Algunas de las características de la respuesta de defensa de las plantas, son la modificación en los niveles de transcritos de genes relacionados con la patogénesis (PR) y la actividad de sus respectivas proteínas (Martin *et al.*, 2003), la alcalinización del medio de cultivo (García-Pérez *et al.*, 1998), la muerte celular programada, el incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno (Davies *et al.*, 2006) y la activación de vías de transducción de señales (Zhang *et al.*, 1998).

Se han realizado estudios para entender los procesos que se llevan a cabo durante la interacción entre *Phytophthora* y sus hospederos. Como ejemplos de moléculas de *Phytophthora* que inducen respuestas en sus hospederos, se encuentran los hepta-beta glucanos (Séjalon *et al.*, 1997), extractos de pared celular (Zhang *et al.*, 1998) y las elicinas (Bailey *et al.*, 2001). Se ha demostrado mediante el análisis de despliegue diferencial, que durante la interacción entre *P. capsici* y *C. annuum*, existe una modificación de la expresión de genes de *P. capsici* al estar en contacto con su hospedero, incluyendo a las elicinas (Bailey *et al.*, 2001). Las

elicitinas son proteínas secretadas por los miembros del género *Phytophthora*, capaces de inducir la respuesta hipersensible y la resistencia sistémica adquirida en sus hospederos (Kamoun *et al.*, 1997; Yu, 1995). Se ha demostrado que las elicitinas como la parasiticeína y la criptogeína, al igual que los extractos de pared celular de *Phytophthora* spp. activan una proteína cinasa de 48 kDa (SIPK) en células en suspensión de tabaco, presentándose la máxima actividad entre los 5 y los 10 min, hasta casi desaparecer a las 24 horas después del tratamiento. En contraste, la parasiticeína induce un incremento paulatino de la actividad de la MAPK a partir de los 5 min, siendo ésta máxima desde los 15 min y hasta las 2 horas después de la inoculación. En el caso de la criptogeína, la actividad es mayor a las 2 horas y su aumento no es tan evidente (Zhang *et al.*, 1998).

En cultivos celulares de *C. annuum* los valores de pH se incrementaron como respuesta al micelio y al filtrado de *P. capsici*, también se modificó la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas y la conductividad de medio de cultivo (García-Pérez *et al.*, 1998). Adicionalmente a las proteínas PR, se ha demostrado que los niveles de las especies reactivas de oxígeno se incrementan durante la respuesta de defensa de las células vegetales (Hückelhoven y Kogel, 2003). En células en suspensión de *A. thaliana* se observó que el incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo se inicia minutos después de agregar el inductor (Bindschedler *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2006), y coincidió con la alcalinización como respuesta al tratamiento (Davies *et al.*, 2006).

Una forma de conocer los mecanismos que regulan la interacción entre ambas especies podría ser la de adicionar inductores extraídos de *P. capsici* a plántulas o tejidos específicos de *C. chinense*, y analizar sus efectos sobre diversos eventos relacionados con el establecimiento de los sistemas de defensa.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se estudiaron los efectos sobre los niveles bioquímico y molecular, producidos por la adición de homogeneizados de pared celular (CWH) de *P. capsici* a suspensiones celulares de *C. chinense*. Específicamente, se determinó el establecimiento de la respuesta de defensa por efecto de la elicitación con *P. capsici*. Para ello, inicialmente se

determinó la concentración de CWH y el tiempo de incubación, óptimos para generar una respuesta de defensa, la cual fue evaluada mediante la modificación de los siguientes parámetros: la alcalinización del medio de cultivo, la activación de las MAP cinasas y de proteínas PR.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de determinar el papel de las MAPK en la respuesta de defensa en otros modelos, como *Arabidopsis thaliana* (Desikan *et al.*, 1999a; Desikan *et al.*, 1999b; Desikan *et al.*, 2001; Nühse *et al.*, 2000), *Nicotiana tabacum* (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000), *Lycopersicon peruvianum* (Holley *et al.*, 2003) y *Petroselinum crispum* (Kroj *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001b; Liu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004), se han utilizado exitosamente los cultivos celulares. Así mismo, éstos han sido utilizados para estudios de la respuesta de defensa, incluyendo la interacción entre *C. annuum* y *P. capsici* (García-Pérez *et al.*, 1998). En el presente trabajo, el modelo de estudio utilizado fueron los cultivos celulares de *C. chinense*, y como inductor de la respuesta de defensa se utilizaron homogeneizados totales de pared celular de *Phytophthora capsici*.

### 2.2.1 PROPAGACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR

La línea celular de *C. chinense* fue proporcionada por la Dra. Nancy Santana y el Dr. Felipe Vázquez de la UBBMP del CICY, y fue originada a partir de cotiledones de chile habanero naranja. La propagación se realizó en medio MS, con sacarosa al 3 % y 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), subcultivando 10 mL de células a medio fresco cada 11 días.

#### 2.2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR

La caracterización del crecimiento de la línea celular se realizó inoculando 2 g del cultivo celular en cada matrás con 40 mL de medio de cultivo fresco, y las

células se colectaron a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, y 30 días de cultivo. En cada uno de estos tiempos, se determinó el peso fresco, el peso seco, el pH, la conductividad del medio de cultivo y la actividad de MAPK.

### **2.2.2 PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS DE *P.capsici*.**

La cepa de *Phytophthora capsici* utilizada en este trabajo se adquirió en el Colegio de Postgraduados con la Dra. María de Jesús Yáñez, donde se identificó por métodos tradicionales y moleculares (EMBL AY726623). La propagación se realizó en medio PDA.

El crecimiento masivo de *P. capsici* se realizó inoculando 1.5 L de medio V8 con CaCO<sub>3</sub> (0.025 % w/v) a 25 °C durante aproximadamente 3 semanas o hasta que el micelio cubriera toda la superficie del medio. Posteriormente, se colectó el micelio eliminando la mayor cantidad de medio posible y se prepararon los homegeneizados, siguiendo el procedimiento descrito por Escobedo (2002) con algunas modificaciones. Éste consistió en congelar el micelio de *P. capsici* y pulverizarlo en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo fino se transfirió a tubos de plástico de 50 mL con agua destilada estéril y se homogeneizó con el politrón dos veces durante 3 min. Posteriormente, el homogenado se sonicó tres veces durante 1 min, se unieron las fracciones y se homogeneizó nuevamente con el politrón. Por último, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min y se cuantificó el contenido de carbohidratos totales mediante la técnica de Dubois y colaboradores (1956). Los homogeneizados totales de pared celular de *P. capsici* fueron denominados CWH.

### **2.2.3 INDUCCIÓN**

La inoculación del cultivo celular con CWH se realizó durante la fase exponencial de crecimiento, específicamente al décimo día contando a partir de la fecha de resiembra, debido a que en este momento el cultivo celular presentó

menos estrés, asegurando que la respuesta que se observó se debió al contacto con el inductor.

En trabajos previos se han utilizado extractos de pared celular de *Phytophthora* spp. en concentraciones de 50 y 120 meq de glucosa·mL<sup>-1</sup> para inducir la respuesta de defensa en cultivos celulares de *C. annuum* (Candela *et al.*, 1998) y la actividad de MAPK en cultivos celulares de *N. tabacum* (Zhang y Klessig, 1998), por lo tanto, en el presente trabajo se evaluaron tres concentraciones dentro de este rango (60, 90 y 120 miliequivalentes de glucosa·mL<sup>-1</sup>).

#### 2.2.4 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA

Existen diversos parámetros de defensa que han sido evaluados en trabajos previos, como son las modificaciones en los niveles de transcritos de genes de defensa, como aquéllos relacionados con la patogénesis (glucanasas y quitinasas, entre otros), las modificaciones en la actividad de proteínas PR ( $\beta$ -1,3 glucanasas, quitinasas, ribonucleasas, etc), la formación de especies reactivas de oxígeno, la alcalinización del medio de cultivo, la síntesis de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas), la activación de vías de transducción de señales (MAPK y señalización mediada por calcio), y la muerte celular programada (disminución de la viabilidad celular y fragmentación del ADN). Es importante señalar, que es posible que algunos de los parámetros anteriores no se observen en un mismo modelo de interacción planta-patógeno, por lo que, es recomendable analizar varios de ellos, ya que no se sabe cuáles se presentan en *C. chinense*.

En el presente trabajo, se analizaron algunos de éstos, con la finalidad de tener mayor información sobre la respuesta de las células de *C. chinense* a la adición de CWH, como la alcalinización del medio de cultivo, los cambios en los valores de conductividad del medio, la modificación en la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas, la formación de especies reactivas de oxígeno y la modificación de los niveles de transcritos de genes de defensa.

### **2.2.4.1 ALCALINIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO**

El establecimiento de la respuesta de defensa se determinó midiendo la alcalinización del medio de cultivo a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min.; y 0, 12, 24 y 48 h) después de la adición de los extractos de pared celular.

### **2.2.4.2 ACTIVIDAD DE $\beta$ -1,3-GLUCANASAS**

La obtención del extracto protéico se realizó a partir de 1 g de células en suspensión, pulverizando el tejido con nitrógeno líquido y homogeneizándolo en 0.5 mL del amortiguador de extracción (HEPES-Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 50 mM, ortovanadato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM, glicerol 10 %, PMSF 1 mM, aprotinina 1  $\mu$ M, DTT 5 mM y leupeptina 1  $\mu$ M) (Arroyo-Serralta *et al.*, 2005). El homogenado se centrifugó a 23,700  $\times g$  a 4 °C durante 45 min, se tomó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford (1976), utilizando como estándar una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA). Los extractos protéicos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Los extractos protéicos fueron utilizados para realizar el ensayo de actividad de glucanasas, el cual consistió en fraccionar los extractos mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 15 %. Concluido el fraccionamiento electroforético, el gel se equilibró con acetato de sodio 50 mM (pH 5.2) durante 10 min. Posteriormente, se incubó en una solución de acetato de sodio 25 mM y laminarina al 0.5% a 40 °C durante 45 min. Finalmente, se tiñó con una solución de 2,3,5-cloruro de trifetil tetrazolio 0.15 % en NaOH 1M, calentando en un horno de microondas durante 10 s hasta que se observaron las bandas de actividad (Kim y Hwang, 1994).

### **2.2.4.3 NIVELES DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Después de homogeneizar 1 g de tejido con 1 mL de MES 10 mM (ácido 2-morfolinoetanesulfónico) a pH 6.5, se centrifugaron las muestras a 14000  $\times g$

durante 5 min a temperatura ambiente. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se colocaron en 900  $\mu\text{L}$  del amortiguador de reacción (MES 10 mM, pH 6.5; rojo de fenol 20  $\mu\text{M}$ ; peroxidasa de rábano (SIGMA) 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Se detuvo la reacción a los 3 min con 20  $\mu\text{L}$  de NaOH (0.5 N). La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a 558 nm. Como control negativo, se determinó la concentración del peróxido de hidrógeno en células en suspensión tratadas con agua y glucosa (90  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

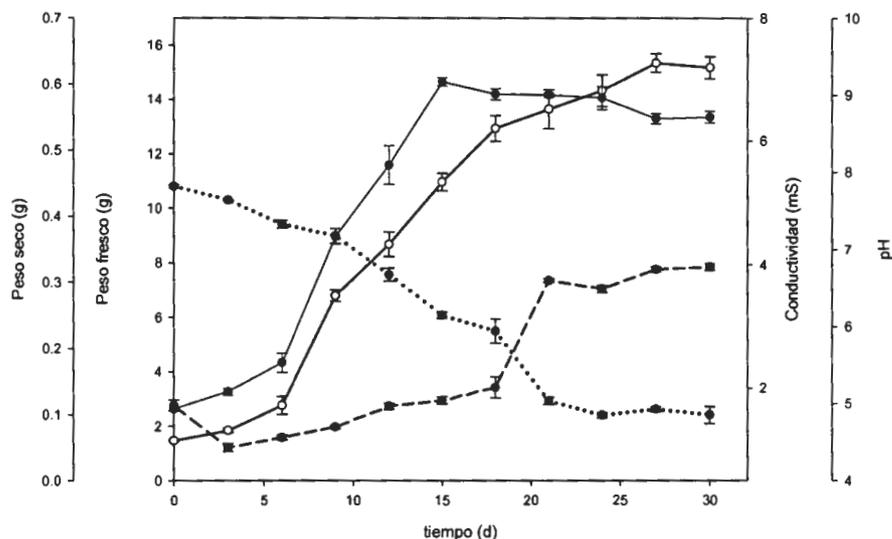
## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

El cultivo celular de *C. chinense* inició su crecimiento a partir del quinto día después de la siembra. Durante el período de adaptación, del día 0 al 5, tanto el pH como la conductividad en el medio de cultivo disminuyeron considerablemente (Figura 2.1). Durante este periodo, los valores de peso fresco y de peso seco tuvieron incrementos discretos. Esto se debe probablemente a que el cultivo celular requiere de un periodo de adaptación inicial a las nuevas condiciones antes de iniciar la proliferación celular masiva. Alrededor del sexto día, los valores de pH empiezan a aumentar, mientras que la conductividad continua disminuyendo. Los valores de peso fresco y de peso seco demuestran que en esta etapa se inicia la fase de crecimiento logarítmico, el cual se mantiene hasta cerca de los días 15 y 18, cuando declina y se inicia la fase estacionaria del crecimiento (Figura 2.1).

Los valores de pH y de conductividad mantuvieron una tendencia estable hasta cerca del día 18, cuando ocurrió un cambio drástico en ambos parámetros, debido probablemente a que en la etapa estacionaria ocurrió muerte celular por envejecimiento del cultivo. Conforme aumentó el peso fresco, los valores de pH se incrementaron y la conductividad disminuyó, hasta llegar a un valor, después del día 21, en el cual se mantuvieron (Figura 2.1). Después de este día, el crecimiento del cultivo celular disminuyó, probablemente debido en parte a que los nutrimentos del

medio de cultivo se agotaron, lo cual se vió reflejado en la poca variación en los valores de conductividad y de pH del medio.



**Figura 2.1 Caracterización del cultivo celular de *C. chinense*.** Los cultivos en suspensión fueron generados como se describe en la sección de Materiales y Métodos, a partir de la variedad naranja del chile habanero. En los períodos indicados se tomaron muestras de 50 mL y en cada una se determinó el peso fresco (—○—), el peso seco (—●—), y los valores de pH (—■—) y de conductividad (—●—). Cada punto representa el valor promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Debido a que en el presente trabajo se analizó el papel de las MAPK durante la elicitación con CWH de *P. capsici*, y estas enzimas se activan como respuesta a diferentes estímulos como el estrés osmótico (Kültz y Burg, 1998; Mikolajczyk, *et al.*, 2000), el estrés mecánico (Seo *et al.*, 1999; Usami *et al.*, 1995; Zhang y Klessig, 1998), la sequía (Jonak *et al.*, 1996), y las bajas temperaturas (Jonak *et al.*, 1996); es necesario tomar en cuenta varios factores para escoger el día en que se hará la inducción de los cultivos, entre ellos mencionaremos que las

células cuenten con los nutrimentos necesarios, que se encuentren en la misma etapa del ciclo de cultivo para que tanto los valores del pH como de la conductividad tengan poca variación, y también es preferible que la densidad celular no sea muy alta para que el inductor se encuentre en contacto con el mayor número de células posibles. Por esta razón, el inicio y el final del cultivo celular no son los mejores momentos para realizar la inducción, ya que al inicio el cultivo se encuentra en un periodo de adaptación a las nuevas condiciones del medio (pH y conductividad), pasan de un medio sin nutrimentos y con alta densidad celular a uno rico en sales y el número de células es mucho menor, mientras que al final las células se encuentran en alta densidad, con pocos nutrimentos y con valores relativamente altos de pH. Estos cambios podrían generar cierto nivel de estrés celular, lo que podría inducir la actividad de las MAPK y enmascarar la posible activación de esta vía como resultado de la elicitación con los CWH. Como se mencionó anteriormente, las MAPK son activadas como respuesta a prácticamente cualquier modificación de las condiciones ambientales, por lo que es muy probable que durante el proceso de adaptación a las nuevas condiciones y durante la fase final de limitación de nutrientes pudiera encontrarse activada la vía de transducción de señales de las MAP cinasas.

Con base en lo anterior se determinó que el mejor momento para realizar la inducción del cultivo celular con los CWH era durante la fase de crecimiento, específicamente en el día 10 (Figura 2.1). En esta etapa la suspensión celular se encuentra bien adaptada a las condiciones del nuevo medio de cultivo, está en crecimiento y es posible que exista una toma constante de nutrimentos del medio, además de que los valores de pH y conductividad no presentan cambios drásticos. Por lo tanto se eligió el décimo día para realizar los ensayos de inducción y el análisis de la respuesta de defensa.

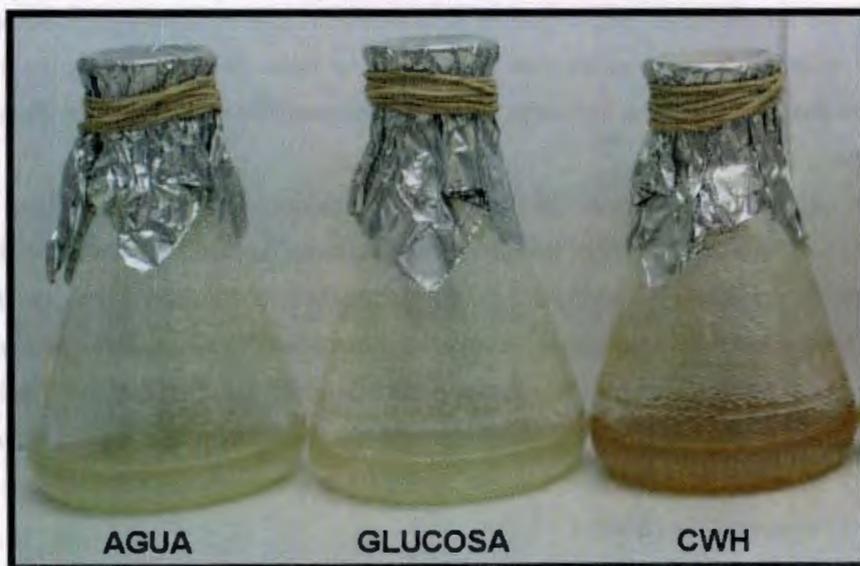
### **2.3.2 INDUCCIÓN CON LOS HOMOGENEIZADOS DE *P. capsici***

Se inocularon los cultivos celulares de *C. chinense* con 60, 90 y 120 meq de glucosa·mL<sup>-1</sup>, como se describió en la sección de materiales y métodos. La colecta

de las muestras se realizó a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 min, 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de estar en contacto con el inductor. A simple vista se observó un cambio drástico en la coloración de los cultivos celulares al inocularlos con los extractos de *P. capsici* (Figura 2.2), lo cual indica que el tratamiento provocó un cambio en los mismos. A continuación se determinó si esta respuesta de los cultivos celulares correspondió a una respuesta de defensa.

### 2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA

Los controles utilizados en este trabajo consistieron en células en suspensión tratadas con agua y con glucosa. Se determinaron los mismos parámetros en cultivos celulares no tratados; sin embargo, en algunos casos no se muestran, debido a que se observó que los tratamientos con agua y con glucosa no indujeron algunos de los parámetros de defensa.



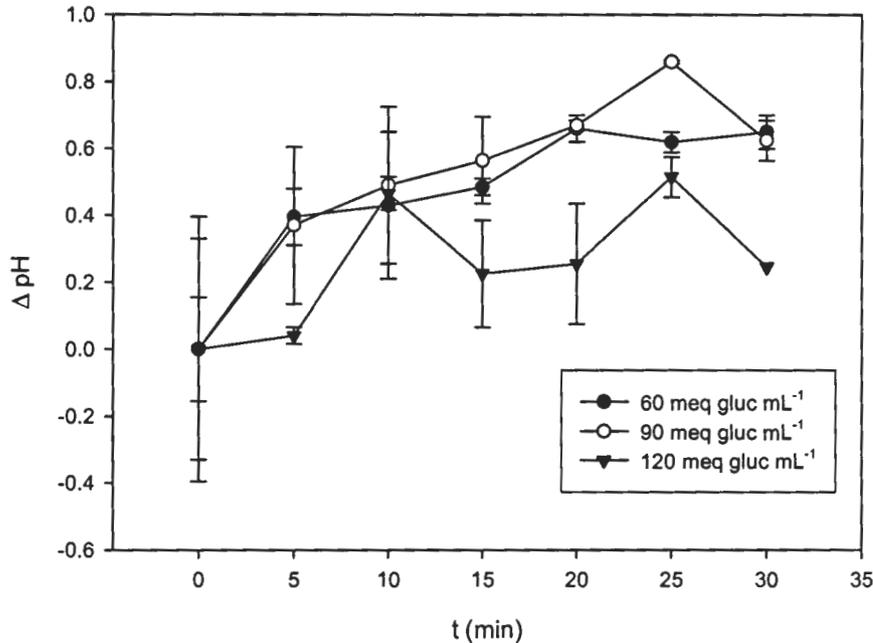
**Figura 2.2 Efecto de los CWH en la apariencia de los cultivos celulares.** Células en suspensión tratadas con agua, glucosa ( $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y CWH ( $90 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), la fotografía fue tomada 24 horas después del tratamiento.

En los cultivos celulares tratados con los CWH se observó el oscurecimiento del tejido, a diferencia de los controles con agua y glucosa, en los cuales no se observó efecto del tratamiento (Figura 2.2). Esta respuesta se ha observado en células en suspensión de *C. annuum* tratadas con micelio y filtrado de *P. capsici*, en los cuales también se reportó la alcalinización y el incremento de la conductividad del medio de cultivo durante la respuesta de defensa (García-Pérez *et al.*, 1998). Por lo anterior, se determinó el efecto del tratamiento con los CWH en el pH y la conductividad del medio de cultivo.

### 2.3.3.1 ALCALINIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se comparó el efecto de diferentes concentraciones de los CWH en el pH del medio de cultivo en tiempos cortos, y se observó que los valores de pH se modificaron desde el momento en que se agregaron los CWH, y conforme transcurrió el tiempo, se incrementaron (Figura 2.3).

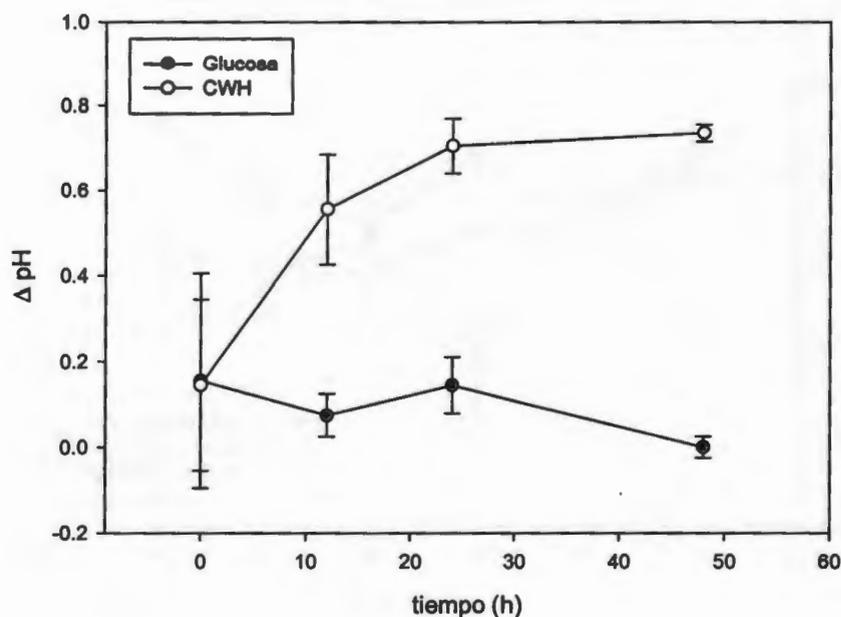
Los resultados de la comparación de las diferentes concentraciones de CWH agregados indicaron que los cultivos celulares respondieron a los tres tratamientos; sin embargo, existieron diferencias en cuanto a las variaciones del pH dependiendo de la concentración utilizada. Con las concentraciones más bajas (60 y 90 meq gluc · mL<sup>-1</sup>), el incremento en los valores de pH fue constante, mientras que con la concentración más alta (120 meq gluc · mL<sup>-1</sup>), se observaron dos picos a los 10 y 25 min después de adicionar los CWH.



**Figura 2.3 Efecto temprano de la inducción con CWH, sobre el pH del medio de cultivo.** Alícuotas de 10 mL del cultivo en suspensión de *C. chinense* fueron colocadas en matraces de 50 mL y tras un período de adaptación de 24 h, se adicionaron diferentes concentraciones de los CWH (60, 90 y 120 meq glucosa·mL<sup>-1</sup>). Se midieron los valores de pH en diferentes períodos de tiempo (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min). Cada punto representa el valor promedio de la diferencia en el pH con respecto al control, de tres determinaciones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

En *C. annuum* se demostró que los inductores provenientes del micelio o el filtrado de *P. capsici* inducen la alcalinización del medio de cultivo, horas después de los tratamientos (García-Pérez *et al.*, 1998). Resultados similares fueron obtenidos en cultivos celulares de *A. thaliana* al adicionar flg22, un inductor de la respuesta de defensa específica (Chinchilla *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2004). Los resultados anteriores sugieren que en *C. chinense* la alcalinización del medio de cultivo podría ser parte de la respuesta de defensa contra *P. capsici*; sin embargo, el incremento de pH detectado en los tiempos evaluados fue muy discreto y por lo tanto, fue

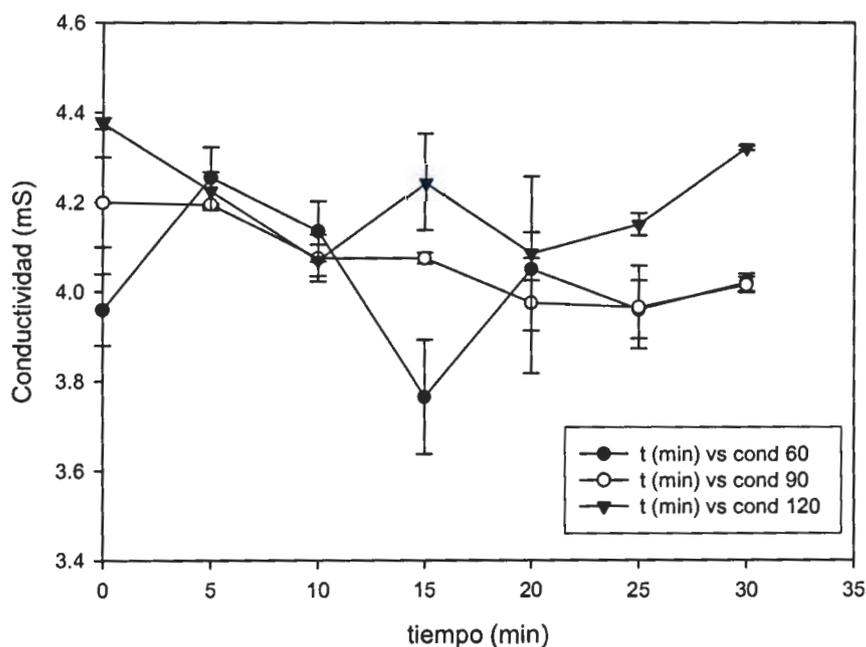
necesario determinar el efecto de la inducción en el pH del medio de cultivo horas después del tratamiento. Adicionalmente, con la finalidad de determinar si la alcalinización es específica de la respuesta de defensa o se debe al estrés abiótico al cual se someten los cultivos celulares durante el tratamiento, se midió el pH en células en suspensión a las cuales se les adicionó agua y glucosa. Los valores presentados en la figura 2.4 demuestran que la alcalinización es específica de la respuesta de defensa.



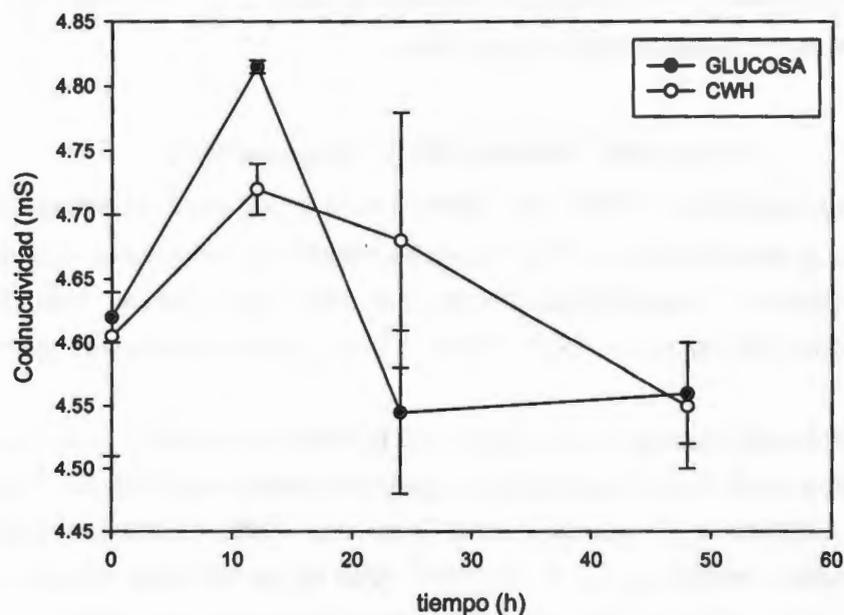
**Figura 2.4** La alcalinización del medio como respuesta a los CWH es específica. Alícuotas de 10 mL del cultivo en suspensión de *C. chinense* fueron colocadas en matraces de 50 mL y tras un período de adaptación de 24 h, se aplicaron diferentes tratamientos: agua (control), glucosa ( $90 \text{ meq glucosa} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y de CWH ( $90 \text{ meq glucosa} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A continuación, se hicieron mediciones de los valores de pH en diferentes períodos (10, 20, 30, 40 y 50 h). Los valores se normalizaron contra el control de agua. Cada punto representa el valor promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Estos resultados demostraron que al igual que lo que ocurre en *C. annuum* (García-Pérez *et al.*, 1998), los CWH de *P. capsici* provocan la alcalinización del medio de cultivo.

A continuación, se determinó si existe algún efecto del tratamiento con los CWH en la conductividad del medio de cultivo.



**Figura 2.5 Efecto temprano de la inducción con CWH en la conductividad del medio de cultivo.** Alícuotas de 10 mL del cultivo en suspensión de *C. chinense* fueron colocadas en matraces de 50 mL y tras un período de adaptación de 24 h, se adicionaron diferentes concentraciones de los CWH (60, 90 y 120 meq glucosa·mL<sup>-1</sup>). A continuación, se tomaron los valores de conductividad en diferentes períodos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min). Cada punto representa el valor promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 2.6** Efecto tardío de la Inducción con CWH en la conductividad del medio de cultivo. Alícuotas de 10 mL del cultivo en suspensión de *C. chinense* fueron subcultivadas a medio fresco y tras un período de adaptación de 24 h, se aplicaron los tratamientos, adicionando glucosa ( $90 \text{ meq glucosa} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y de CWH ( $90 \text{ meq glucosa} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A continuación, se tomaron los valores de conductividad en diferentes períodos (10, 20, 30, 40 y 50 h). Cada punto representa el valor promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Los valores de conductividad del medio en respuesta a la inducción fueron heterogéneos, a diferencia del pH. El comportamiento fue diferente en cada uno de los tratamientos (60, 90 y 120 meq de glucosa) y no se observó una tendencia definida (Figura 2.5 y 2.6).

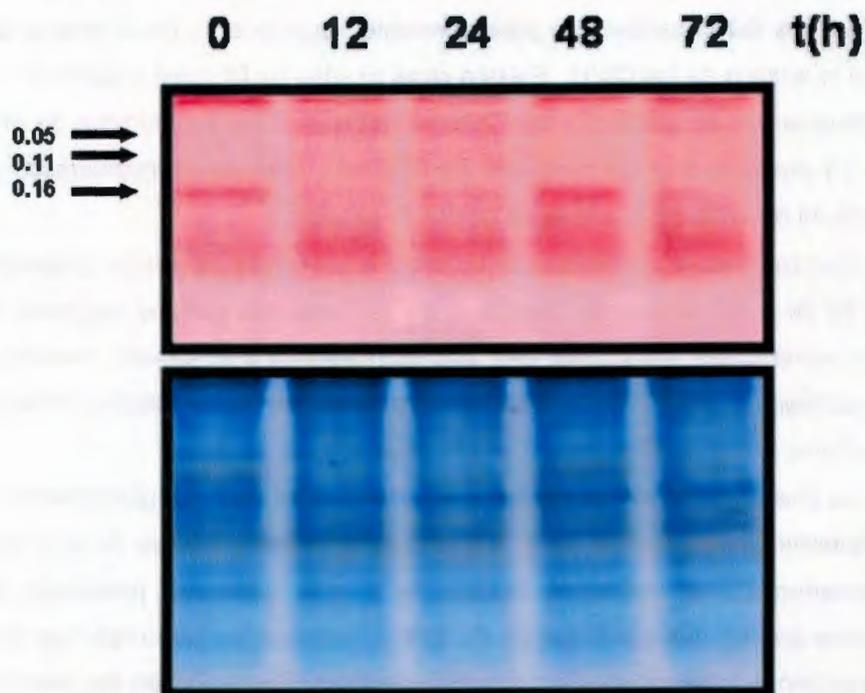
Los resultados sugieren que los cultivos celulares están respondiendo a los diferentes tratamientos, y el incremento en los valores del pH se observa solamente

cuando los cultivos son tratados con los CWH. La alcalinización del medio es uno de los parámetros que se han utilizado para determinar si se establece la respuesta de defensa; sin embargo, es necesario utilizar otros parámetros de defensa como la actividad de proteínas PR, porque la respuesta de defensa no se manifiesta de la misma manera en todas las especies vegetales.

### **2.3.3.2 ACTIVIDAD DE $\beta$ -1,3-glucanasa**

Otro parámetro utilizado para determinar si se establece la respuesta de defensa es la activación de  $\beta$ -1,3 glucanasa, las cuales son inducidas en *C. annuum* como respuesta a *P. capsici* (García-Pérez *et al.*, 1998; Kim y Hwang, 1994; Kim y Hwang, 1997; Hwang *et al.*, 1997), por lo que se analizó la actividad de estas proteínas.

En trabajos previo se determinó que la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa se incrementa a las 24 horas después de la adición de paredes celulares de *P. capsici* a cultivos celulares de *C. annuum* (García-Pérez *et al.* 1998). En tallos, también se ha observado el incremento en la actividad a partir de las 24 horas después de la inducción (Kim y Hwang, 1998). En *C. chinense* se han realizado pocos estudios que determinen si las glucanasas se inducen como respuesta a la adición de homogeneizados de *P. capsici*, en este trabajo se evaluaron a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas después de la inducción.



**Figura 2.7** Efecto del tiempo de incubación con los CWH en la inducción de las actividades de  $\beta$ -1,3-glucanasa. Veinticinco  $\mu$ g de extractos protéicos extraídos de células expuestas a diferentes concentraciones de CWH fueron fraccionados mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 15%. La detección de actividades de  $\beta$ -1,3-glucanasas se realizó como se describe en la sección de Materiales y Métodos empleando  $13.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de laminarina como sustrato. El panel de arriba representa el ensayo de actividad y abajo la tinción con azul de Coomassie para mostrar el patrón de cargado en el gel. La flecha señala el valor de Rf aparente de la banda de actividad.

En total se detectaron cinco proteínas con actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas en los cultivos celulares a partir de las 12 y las 24 horas de la adición del inductor. Los resultados obtenidos indican que en los cultivos celulares normalmente se encuentra actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas con un Rf de 0.16, como se puede observar en el

tiempo cero; sin embargo, la actividad de esta proteína disminuye a las 12 y a las 24 horas después del tratamiento, y posteriormente, regresa a su nivel basal a las 48 horas de la adición de los CWH. Existen otras bandas de Rf igual a 0.05 y 0.11 que no se observan en el control ni a las 72 horas; pero si en los tratamientos de 12 y 24 horas. Es probable que las proteínas de Rf 0.05 y 0.11 estén involucradas en la respuesta de defensa de *C. chinense* contra *P. capsici*.

García-Pérez y colaboradores reportan la presencia de una  $\beta$ -1,3-glucanasa con un Rf de 0.18, la cual se detecta a las 24 horas en cultivos celulares de *C. annuum* provenientes del cultivar S-5, que es resistente a *P. capsici*, mientras que en los cultivares susceptibles no se observa actividad en la fracción intracelular (García-Pérez *et al.*, 1998).

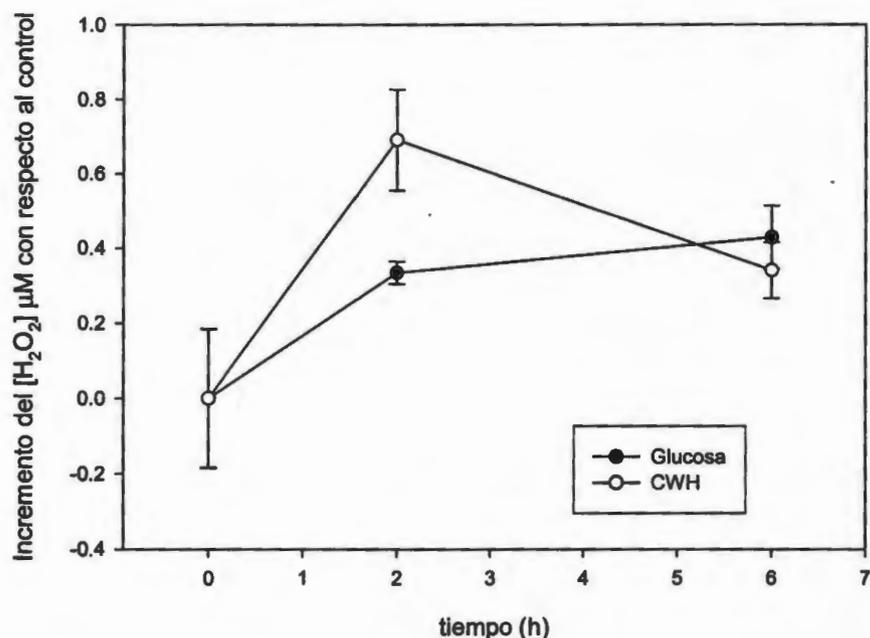
La presencia de diferentes patrones de actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, como se ha determinado en plantas de *C. annuum* es importante, porque de acuerdo con los antecedentes, los cultivares resistentes a este patógeno presentan  $\beta$ -1,3-glucanasas activas (García-Pérez *et al.*, 1998). También se demostró que durante las interacciones compatibles e incompatibles existen diferencias en los patrones de actividad, presentándose un mayor número de isoformas durante la interacción incompatible (Kim y Hwang, 1994). Los resultados obtenidos, son una evidencia de que en células en suspensión de *C. chinense* se activan las  $\beta$ -1,3-glucanasas, y de la presencia de actividad de las mismas en niveles basales. En la mayoría de los casos, los reportes indican que la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas se incrementa como respuesta a patógenos; sin embargo, en la Figura 2.7 se puede observar que la proteína con un Rf de 0.16 está presente a las 0, 48 y 72 después horas de adicionar los CWH, y a las 12 y 24 horas, sus niveles de actividad son muy bajos.

Estos resultados muestran que existe un incremento en la actividad de dos  $\beta$ -1,3-glucanasas (0.05 y 0.11) y la disminución de la misma de otra  $\beta$ -1,3-glucanasa (Rf=0.16).

### 2.3.3.3 NIVELES DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

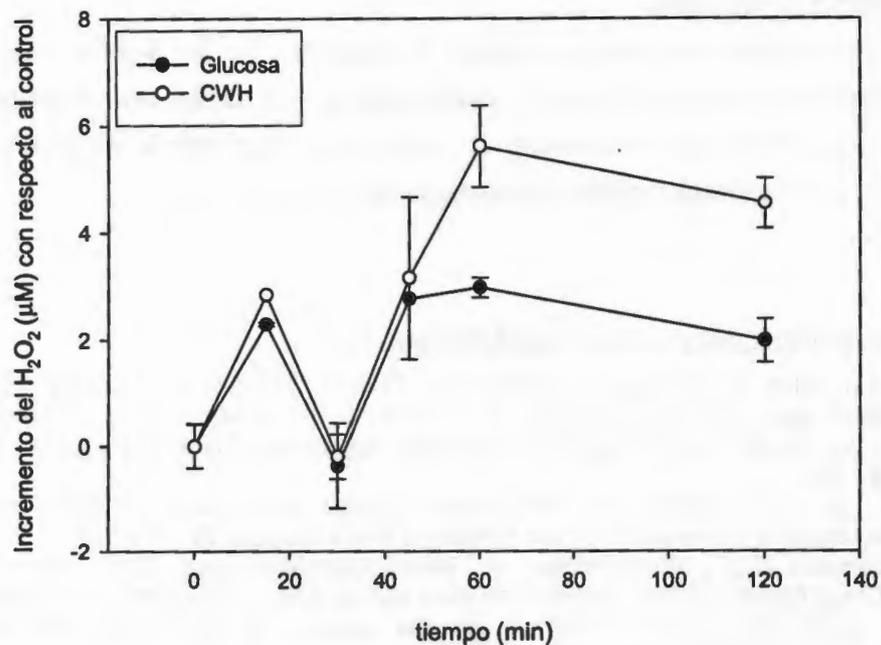
La producción de especies reactivas de oxígeno se ha relacionado directamente con la respuesta de hipersensibilidad durante la respuesta de defensa (Levine *et al.*, 1994), como ejemplo se encuentra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual se incrementa minutos después de la adición del inductor en *A. thaliana* (Davies *et al.*, 2006) y en *Glycine max* (Levine *et al.*, 1994)

Se ha considerado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula señalizadora, que en algunos modelos se ha asociado con la regulación de diferentes procesos, incluyendo la muerte celular programada (Meittler *et al.*, 2004). En este trabajo se determinó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intra y extracelular.



**Figura 2.8** Efecto de los CWH en la concentración del peróxido de hidrógeno intracelular. Se agregaron 90 meq gluc·mL<sup>-1</sup> de CWH y 90 mg·mL<sup>-1</sup> de glucosa, respectivamente a células en suspensión. Se tomaron muestras de diferentes tiempos después de agregar los CWH (0, 2 y 6 h), agua y glucosa, los dos últimos como controles.

Se observó incremento en la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto intracelular como en el medio de cultivo como respuesta a los CWH. Los niveles intracelulares comparados con la concentración encontrada en el medio de cultivo, fueron muy bajos (Figura 2.8 y 2.9). Sin embargo, al determinar los niveles intracelulares en cultivos sin tratamiento, se observó que existe un efecto de los tratamientos con agua y con glucosa en la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que probablemente ésta molécula se esté liberando al medio de cultivo, como respuesta a los tratamientos. Al determinar los niveles extracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó que a diferencia de los reportes encontrados en la literatura, el mayor incremento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se presenta desde la primera hora (Figura 2.9) y no en los primeros minutos después de la inducción, como se ha reportado en otros modelos (Bindschedler et al., 2006; Davies et al., 2006; Levine et al., 1994).



**Figura 2.9.** Efecto de los CWH en la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo. Se agregaron 90 meq gluc·mL<sup>-1</sup> de CWH y 90 mg·mL<sup>-1</sup> de glucosa, respectivamente a células en suspensión. A diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 120 min.), se colectaron muestras y se compararon los niveles del peróxido de hidrógeno con respecto al control.

Los resultados constituyen una evidencia más de que la adición de los CWH induce la respuesta de defensa de las células en suspensión de *C. chinense*.

## 2.4 CONCLUSIONES

El oscurecimiento de los cultivos, la activación de  $\beta$ -1,3-glucanasas, la alcalinización del medio de cultivo y la acumulación de  $H_2O_2$  en los cultivos celulares sugiere que los cultivos celulares de *C. chinense* establecieron la respuesta de defensa como respuesta a los homogeneizados de *P. capsici*.

## 2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, A.L., Pike, S., Hoyos, E., Stone, J.M., Walker, J.C. and A. Novacky (1997) *Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from Erwinia amylovora*. Plant Physiology, **115**, 853-861.
- Apel, K. and H. Hirt (2004) *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction*. Annual Review of Plant Biology, **55**, 373-399.
- Arroyo-Serralta, G.A., Kú-González, A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and J.J. Zúñiga Aguilar (2005) *Exposure to toxic concentrations of aluminium activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of Coffea arabica*. Plant Physiology and Biochemistry, **43**, 27-35.
- Bernards, M.A., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A. and G.L. Plourde (1999) *Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato*. Plant Physiology, **121**, 135-145.
- Bindschedler, L.V., Dewney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Davies, D.R., Ausubel, F.M. and G.P. Bolwell (2006) *Peroxidase dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance*. The Plant Journal, **47**, 851-863.
- Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberie-Bors, E., Huskisson, N.S. and H. Hirt (1997) *Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway*. The Plant Cell, **9**, 75-83.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A. and H. From (2005) *Plant specific calmodulin binding proteins*. Annual Review of Plant Biology, **56**, 435-466.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T. and H. Hirt (2000) *Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors*. Journal of Biological Chemistry, **275**, 36734-36740
- Carpin, S., Crèvecoeur, M., Greppin, H. and C. Penel (1999) *Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini*. Plant Physiology, **120**, 7999-810.

- Chaoui, A. and E.E. Ferjani (2004) *Impact of cadmium and Koper excess on cell wall preoxidases in pea stems*. Pakistan Journal of Biological Sciences, **7**, 902-904.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and G. Felix (2006) *The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception*. The Plant Cell, **18**:465-476.
- Cobbett, C. and P. Goldbrought (2002) *Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis*. Annual Review of Plant Biology, **53**, 159-182.
- 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, W.H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. and M.J. Cho (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 Physiology, **132**, 1961-1972.
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J.J. and J.M. Vázquez-Ramos (1998) *Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins*. Physiologia Plantarum, **102**, 573-581.
- García-Pérez, M.D., Egea, C. and M.E. Candela (1998) *Defense response of pepper (Capsicum annuum) suspension cells to Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum, **103**, 527-533.
- Davies, D.R., Bindschelder, L.V., Strickland, T.S. and G.P. Bolwell (2006) *Production of reactive oxygen species in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures in response to an elicitor from Fusarium oxysporum, implications for basal resistance*. Journal of experimental Botany, **57**, 1817-1827.
- Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T. and S. Neill (1999a) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates a MAP-like enzyme in Arabidopsis thaliana suspension cultures*. Journal of experimental Botany, **50**, 1863-1866.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T. and S.J. Neill (1999b) *Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defense response in Arabidopsis thaliana suspension cultures*. Planta, **210**, 97-103.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K. and S. Neil (2001) *Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6*. Plant Physiology, **126**, 1579-1587.
- Desjardins, A.E. and T.M. Hohn (1997) *Mycotoxins in plant pathogenesis*. Molecular Plant Microbe Interactions, **10**, 147-152.
- Dixon, D.P., Laphorn, A. and R. Edwards (2002) *Plant glutathione transferases*. Genome Biology **3**, reviews 3004.1-3004.10
- Dorey, S., Baileul, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B. and S. Kauffmann (1997) *Spatial and temporal induction of cell death defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor*. Molecular Plant Microbe Interactions, **10**, 646-655.
- Droillard, M.J., Thibivilliers, S., Cazalé, A.C., Barbier-Brygoo, H. and C. Laurière (2000) *Protein kinases induced by osmotic stress and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase*. FEBS Letters, **474**, 217-222.

- Dubos, C. and C. Plomion (2001) *Drought differentially affects expresión of a PR-10 protein in needles of maritim pine (Pinus pinaster Ait.) seedlings*. Journal of Experimental Botany, **52**, 1143-1144.
- Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T. and T. Jacobs (1993) *MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from flowering plant*. The Plant Cell, **5**, 87-98.
- Egea, C., Alcázar, M.D. and M.E. Candela (1996)  *$\beta$ -1,3 glucanase and chitinase as pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two Capsicum annuum cultivars infected with cucumber mosaic virus*. Biologia plantarum, **38**, 437-443.
- Egea, C., Ahmed, A.S., Candela, M. and M.E. Candela (2001) *Elicitation of peroxidase activity and lignin biosyntheses in pepper suspension cells by Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology, **158**, 151-158.
- Erickson, A.K., Payne, D.M., Martino, P.A., Rossomando, A.J., Shabanowitz, J., Weber, M.J., Hunt, D.F. and T.W. Sturgill (1990) *Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase*. Journal of Biological Chemistry, **265**, 19728-19735.
- Escobedo, G.M.R.M. (2002) *Estudios sobre el estrés oxidativo en células de Lycopersicon esculentum Mill*. Tesis de Doctorado. CICY.
- Ferl, R.J. (1996) *14-3-3 proteins and signal transduction*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **47**, 49-73.
- Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F.M., Cervone, F. and G. De Lorenzo (2003) *Tandemly duplicated genes that encode polygaracturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection*. The Plant Cell, **15**, 93-106.
- García-Pérez, M.D., Egea, C. and M.E. Candela (1998) *Defense response of pepper (Capsicum annuum) suspension cells to Phytophthora capsici*. Physiologia plantarum, **103**, 527-533.
- Gechev, T.S. and J. Hille (2005) *Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death*. The Journal of Biological Chemistry, **168**, 17-20.
- Hilaire, E., Young, S.A., Willard, L.H., McGee, J.D., Sweat, T., Chittor, J.M., Guikema, J.A. and J.E. Leach (2001) *Vascular defense response in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening*. Molecular Plant Microbe Interactions, **14**, 1411-1419.
- Holley, S.R., Yalamanchili, R.D., Moura, D.S., Ryan, C.A. and J.W. Stratmann (2003) *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 Physiology, **132**, 1728-1738.
- Hückelhoven, R. and K.H. Kogel (2003) *Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance?*. Planta, **216**, 891-902.
- Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim, Y.J. and B.S. Kim (1997) *Acumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase in the DL- $\beta$ -aminobutyric acid.induced resistance response of*

- pepper stems to *Phytophthora capsici*. Physiological and molecular plant pathology, **51**, 305-322.
- Johnson, P.R. and J.R. Ecker (1998) *The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective*. Annual Review of Genetics, **32**, 227-254.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, S., Baker, P.J., Huskisson, N.S. and H. Hirt (1996) *Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought*. Proceedings of the National Academy of Science, **93**, 11274-11279.
- Jung, H.W. and B.K. Hwang (2000) *Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. Molecular Plant Microbe Interactions, **13**:136-142.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., Groot, K.E., Vleashouers, V.G.A.A. and F. Govers (1997) *A gene encoding a protein elicitor of Phytophthora infestans is down-regulated during infection of potato*. Molecular Plant Microbe Interactions, **10**, 13-20.
- Kiba, A., Miyake, C., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and T. Shiraishi (1997) *Superoxide generation in extracts from isolated plant cell walls is regulated by fungal signal molecules*. Phytopathology, **87**, 846-852.
- Kim, Y.J. and B.K. Hwang (1994) *Differential accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology, **45**, 195-209.
- Kim, Y.J. and B.K. Hwang (1997) *Isolation of a basic 34 kiloDalton  $\beta$ -1,3-glucanase with inhibitory activity against Phytophthora capsici from pepper stems*. Physiological and Molecular Plant Pathology, **50**, 103-115.
- Kim, Y.S., Lee, H.H., Ko, M.K., Song, C.E., Bae, C.Y., Lee, Y.H. and B.J. Oh (2001) *Inhibition of fungal apressorium formation by pepper (Capsicum annuum) esterase*. Molecular plant microbe interactions, **14**, 80-85.
- Kim, K.J., Park, C.J., An, J.M., Ham, B.K., Lee, B.J. and K.H. Paek (2005a) *CaAlaAT1 catalyzes the alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper*. Planta, **221**, 857-867.
- Kim, K.J., Park, C.J., Ham, B.K., Choi, S.B., Lee, B.J. and K.H. Paek (2005b) *Induction of a cytosolic pyruvate kinase 1 gene during the resistance response to Tobacco mosaic virus in Capsicum annuum*. Plant Cell Reports, **25**, 359-364.
- Knogge, W (1996) *Fungal infection of plants*. The Plant Cell, **8**, 1711-1722.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and D. Scheel (2003) *Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related gene in parsley*. The Journal of Biological Chemistry, **278**, 2256-2264.
- Kültz, D. and M. Burg (1998) *Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascade*. The Journal of Experimental Biology, **201**, 3015-3021.

- Kumar, D. and D.F. Klessig (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**, 347-351.
- Kumar, A.G., Rakwal, R., Yonekura, M., Kubo, A. and H. Saji (2002) *Rapid induction of defense/stress-related proteins in leaves of rice (Oryza sativa) seedlings exposed to ozone is preceded by newly phosphorylated proteins and changes in a 66-kDa ERK-type MAPK*. *Journal of Plant Physiology* **159**, 361-369.
- Lalle, M., Visconti, S., Marra, M., Camoni, L., Velasco, R. and P. Aducci (2005) *ZmMPK6, a novel maize MAP kinase that interacts with 14-3-3 proteins*. *Plant Molecular Biology*, **59**, 713-722.
- Lebrun-García, A., Ouaked, F., Chiltz, A. and A. Pugin (1998) *Activation of a MAPK homologues by elicitors in tobacco cells*. *The Plant Journal*, **15**, 773-781.
- Lee, S.C., Kim, Y.J. and B.K. Hwang (2001) *A pathogen-induced chitin binding protein gene from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding*. *Plant Cell Physiology*, **42**, 1321-1330.
- Lee, J., Klessig, D.F. and T. Nürnberger (2001b) *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*. *The Plant Cell*, **13**, 1079-1093.
- Lee, J., Rudd, J.J., Macioszec, V.K. and D. Scheel (2004) *Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley*. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 22440-22448.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and C. Lamb (1994) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response*. *Cell*, **79**, 583-593.
- Ligterink, W., Kroj, T., Nieden, U., Hirt, H. and D. Scheel (1997) *Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense in plants*. *Science*, **276**, 2054-2057.
- Liu, Y., Jin, H., Yang, K.W., Kim, C.Y., Baker, B. and S. Zhang (2003) *Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling*. *The Plant Journal*, **34**, 149-160.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and G. Sessa (2003) *Understanding the functions of plant disease resistance proteins*. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 23-61.
- McCabe, P.F. and C.J. Leaver (2000) *Programmed cell death in cell cultures*. *Plant Molecular Biology*, **44**, 359-368.
- Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.M. and M.C. Heath (2002) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse fungal interactions*. *The Plant Journal*, **29**, 257-268.
- Mikolajczyk M., Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF and Dobrowolska G (2000) *Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells*. *The Plant Cell* **12**, 165-178.

- Mittler, R., Vanderauvera, S., Gollery, M. and F. Van Breusegem (2004) *Reactive oxygen network of plants*. Trends in Plant Science, **9**, 490-498.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and J.D.G. Jones (2004) *The transcriptional innate immune response to flg22 . Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense response and bacterial pathogenesis*. Plant physiology, **135**, 1113-1128.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F. and J.F. Dangl (2003) *Recognition and response in the plant immune system*. Annual Review of Genetics, **37**, 579-609.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., and T. Boller (2000) *Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6*. The Journal of Biological Chemistry, **275**, 7521-7526.
- Oh, B.J., Ko, M.K., Kostenyuk, I., Shin, B. and K.S. Kim (1999) *Coexpression of a defensin gene and thionin-like gene via different signal transduction pathways in pepper and Colletotrichum gloeosporoides interactions*. Plant Molecular Biology, **41**, 313-319.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., and H. Shinshi (2000) *Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes*. Plant Cell Physiology, **41**, 1187-1192.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., Yoo, T.H. and K.H. Paek (2001) *A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. Molecules and Cells, **11**, 122-127.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., You, J.S. and K.H. Paek (2002) *Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. Plant Molecular Biology, **48**, 243-254.
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C. and K.H. Paek (2004a) *Pathogenesis protein 10 isolated from pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway*. The Plant Journal, **37**, 186-198.
- Park, C.J., An, J.M., Shin, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J. and K.H. Paek (2004b) *Molecular characterization of pepper germin-like protein as a novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection*. Planta, **219**, 797-806.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. and T.H. Sturgill (1991) *Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)*. The EMBO Journal, **10**, 885-892.
- Pedley, K.E. and G.B. Martin (2004) *Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato*. The Journal of Biological Chemistry, **279**, 49229-49235.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. and J.D.G. Jones (1999) *Rapid Avr9- and Cf9- dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses*. The Plant Cell, **11**, 273-287.
- Sehnke, P.C., DeLille J.M., and R.J. Ferl (2002) *Consuming signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal induced transitions in protein activity*. The Plant Cell, S339-S354.

- Seo, S., Sano, H. and Y. Ohashi (1999) *Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, tobacco mitogen-activated protein kinase*. The Plant Cell, **11**, 289-298.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W. and K.H. Paek (2001) *Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and characterization of proteinase inhibitor gene*. Plant Science, **161**, 727-737.
- Shin, R., Park, J.M., An, J.M. and K.H. Paek (2002) *Ectopic expression of Tsi1 in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens*. Molecular Plant Microbe Interactions, **15**, 983-989.
- Shin, R., Park, C.J., An, J.M. and K.H. Paek (2003a) *A novel TMV-induced hot pepper cell wall protein gene (CaTin2) is associated with virus specific hypersensitive response pathway*. Plant Molecular Biology, **51**, 687-701.
- Shin, R., Kim, M.J. and K.H. Paek (2003b) *The CaTin1 (Capsicum annuum TMV-induced clone 1) and CaTin1-2 genes are linked head to head and share a bi-directional promoter*. Plant Cell Physiology, **44**, 549-554.
- Soria, F.M.J., Trejo, R.J.A., Tun, S.J.M. and S.R. Terán (2002) *Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (Capsicum chinense Jacq)*. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2. Conkal, Yucatán. 75 p.p.
- Stratmann, J.W. and C.A. Ryan (1997) *Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors*. Proceedings of the National Academy of Science, **94**, 11085-11089.
- Suzuki, K. and H. Shinshi (1995) *Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor*. The Plant Cell, **7**, 639-647.
- Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and S. Mayama (2001) *Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors*. Molecular Plant Microbe Interactions, **14**, 477-486.
- Takezawa, D. (1999) *Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat*. Plant Molecular Biology, **40**, 921-933.
- Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P. and D. Samac (2001) *Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminium*. Plant Physiology, **127**, 1836-1844.
- Tör, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Türk, F., Can, C., Dangl, J.L. and E.B. Holub (2002) *Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes*. The Plant Cell, **14**, 993-1003.
- Tucker, S.L., Thornton, C.R., Tasker, K., Jacob, C., Giles, G., Egan, M. and N.J. Tabot (2004) *A fungal metallothionein is required for pathogenicity of Magnaporthe grisea*. The Plant Cell, **16**, 1575-1588.

- Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishihama, R. and Y. Machida (1995) *Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants*. Proceedings of the National Academy of Science, **92**, 8660-8664.
- Villalba, M.F., Rickauer, M. and M.T. Esquerré (1997) *Cloning and characterization of cDNA encoding an elicitor of Phytophthora parasitica var. nicotianae that shows cellulose-binding and lectin-like activities*. Molecular Plant Microbe Interactions, **10**, 1045-1053.
- Voronin, V., Touraev, A., Kieft, H., van Lammeren, A.A.M., Heberle-Bors, E. and C. Wilson (2001) *Temporal and tissue specific expression of the tobacco ntf4 MAP kinase*. Plant Molecular Biology, **45**, 679-689.
- Zanetti, M.E., Terrile, M.C., Arce, D., Godoy, A.V., Segundo, B.S. and C. Casalongué (2002) *Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated stress*. Journal of Experimental Botany, **53**, 2455-2457.
- Zhang, S. and D.F. Klessig (1997) *Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco*. The Plant Cell, **9**, 809-824.
- Zhang, S., Du, H. and D.F. Klessig (1998) *Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from Phytophthora spp.* The Plant Cell, **10**, 435-449.
- Zhang, S., Liu, Y. and D.F. Klessig (2000) *Multiple levels of tobacco WIPK activation during induction of cell death by fungal elicitors*. The Plant Journal, **23**, 339-347.
- Zhou, J and P.B. Goldsbrough (1994) *Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis*. The Plant Cell, **6**, 875-884.
- Zhou, F., Menke, F.L.H., Yoshioka, K., Moder, W., Shirano, Y. and D.F. Klessig (2004) *High humidity suppress ssi4-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and defense gene expression*. The Plant Journal, **39**, 920-932.



## **CAPÍTULO III: LAS MAPK ESTÁN INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA DE *Capsicum chinense* Jacq. A *Phytophthora capsici* Leonian**

### **3.1 INTRODUCCIÓN**

En las plantas, las MAPK se han asociado con diversos estímulos abióticos y bióticos. Dentro de los primeros, están el frío y la sequía (Jonak *et al.*, 1996), el estrés osmótico (Droillard *et al.*, 2000) o los cambios de voltaje (Link *et al.*, 2002); dentro de los factores bióticos se pueden citar a los patógenos, que inducen la activación de la vía mediante sustancias secretadas o por el reconocimiento de moléculas que forman parte de su estructura (Cardinale *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2002; Nühse *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 1999; Song y Goodman, 2002; Zhang *et al.*, 1998). La correlación entre la activación de las MAPK y la inducción de las respuestas de defensa sugiere que estas proteínas están involucradas en la vía de señalización que determina la resistencia (Kumar y Klessig, 2000; Song y Goodman, 2002). Existen muchas evidencias de la participación de estas proteínas durante la resistencia y la interacción planta-patógeno (Kiba *et al.*, 1997; Mellersh *et al.*, 2002). Se sabe que las MAPK constituyen una de las más importantes vías de transducción de señales regulada por los genes *R* (Zhang y Klessig, 1998).

A partir de la secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* se sabe que, al menos en esta especie, existen 20 MAPK, 10 MAPKK y 60 MAPKKK (Ichimura *et al.*, 2002). Las MAP cinasas son proteínas que se localizan en el citoplasma, y una vez que se activan, se dimerizan y se translocan al núcleo (Adachi *et al.*, 1999), donde directa o indirectamente inducen la fosforilación de factores de transcripción, de coactivadores y de proteínas del nucleosoma (Hazzalin y Mahadevan, 2002).

Las MAPK de plantas presentan dominios conservados en la región central (Kültz, 1998). A pesar de que las secuencias peptídicas de la región amino terminal

de diferentes MAPK son muy variables, es posible encontrar algunas regiones con alto porcentaje de identidad, lo que sugiere que las regiones localizadas en el extremo amino son requeridas para algunas funciones de la misma o para conferir especificidad por algún sustrato (Ichimura, 2002). Las MAPK de plantas poseen un motivo Thr-X-Tyr entre los subdominios VII y VIII del dominio catalítico (Kültz, 1998). De acuerdo con un análisis de las secuencias deducidas de aminoácidos de MAPK de plantas, se han reconocido tres diferentes familias (Hirt, 1997). Su estructura consiste en dos lóbulos en cuya interfase contienen al sitio activo, el cual es blanco de la especificidad dual de las MAPKK que las activan mediante fosforilación en treonina y tirosina (Hardie, 1999). Las MAPKK son activadas mediante la fosforilación de dos residuos conservados de serina o treonina por las MAPKKK (Hirt, 2000). A continuación se mencionan algunos de los ejemplos de trabajos que demuestran que las MAPK están relacionadas con la respuesta de las células vegetales a los patógenos.

Song y Goodman (2002) clonaron el gen *osbimk1* de arroz, el cual participa en la vía de señalización que lleva a la respuesta de defensa contra hongos (*Magnaporthe grisea*) y bacterias, tanto en interacciones compatibles como incompatibles, donde se induce rápidamente durante las primeras 36 horas después de la inoculación. *Bwmk1*, codifica una proteína de 506 aminoácidos, que contiene un motivo de fosforilación dual TDY y 150 aminoácidos únicos en el extremo carboxilo terminal. Esta proteína podría ser responsable de la señalización durante la respuesta a la infección con *Magnaporthe grisea* y al daño mecánico en *Oryza sativa* (He *et al.*, 1999).

En *Arabidopsis thaliana* se encontraron 20 genes de MAP cinasas; sin embargo, se desconoce la función de todos ellos (Innes, 2001; Jonak *et al.*, 2002). Desikan y colaboradores (1999) demostraron que al exponer cultivos celulares de *Arabidopsis* a una proteína ("harpin") proveniente de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, se induce la activación de dos cinasas de 39 y 44 kDa, las cuales son fosforiladas en tirosina y que esta activación es reprimida por el inhibidor de

MAPKK, PD98059, el cual impidió la muerte celular y la respuesta de defensa (Desikan *et al.*, 1999).

En un trabajo posterior, Desikan y colaboradores (2001) demostraron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado como respuesta a un inductor bacteriano activa a AtMPK6, lo cual sugiere que el inductor activa la vía de MAPK (AtMPK6) mediante la explosión oxidativa y activa a AtMPK4 y AtMPK6 (Desikan *et al.*, 2001).

Frye y colaboradores (2001) utilizaron mutantes del gen que codifica la proteína EDR1 (una MAPKKK), las cuales no presentaron diferencias morfológicas comparadas con las silvestres, pero mostraron mayor resistencia a *Erysiphe cichoracearum*. Esta resistencia está relacionada con la inducción de las respuestas de defensa, incluyendo la muerte celular, y también se observó que la resistencia depende de la defensa inducible por ácido salicílico. Por lo que proponen un modelo en el cual EDR1 y CTR1 que pertenecen a la misma familia de MAPKKK, funcionan como reguladores negativos; al parecer, EDR1 interactúa con una proteína receptora y activa la vía de las MAPK. En presencia de una señal asociada a patógenos, CTR1 inactiva al receptor y por lo tanto, a la cascada de MAPK y EDR1, lo cual lleva a la activación de la defensa mediada por ácido salicílico. De esta manera, la vía de MAPK también puede regular la respuesta de defensa negativamente (Frye *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis* se ha observado que MPK4 es activada por estrés abiótico y participa en la respuesta de defensa mediada por ácido salicílico, ya que esta proteína induce su síntesis y la transcripción de los genes de defensa *pdf1* y *thi1*. Al analizar plantas mutantes en el gen *mpk4*, se pudo deducir que MPK4 juega un papel específico en la regulación de la respuesta de defensa (Innes, 2001).

Por otro lado, Asai y colaboradores (2002) lograron identificar los componentes de la vía de transducción de señales que participan durante el reconocimiento del patógeno por el receptor FLS2 (el receptor FLS2 liga a la flagelina, una proteína del flagelo bacteriano). Al parecer este evento, activa a MPK3 y a MPK6, llevando a la expresión de genes de defensa tempranos. Los resultados obtenidos en este trabajo también indican la convergencia de diferentes vías de

transducción de señales, ya que al realizar mutaciones en MEKK1, en MKK4 o en WRKY29, las plantas que las presentan también son resistentes a patógenos. Proponen un modelo en el cual el inductor actúa sobre el receptor LRR (FLS2), el cual mediante su dominio de cinasa fosforila a *AtMEKK1*, que posteriormente actúa sobre *AtMKK4* o *ATMKK5*, quienes mediante fosforilación activan a *AtMPK3/AtMPK6*, el cual a su vez fosforila al factor de transcripción *WRKY 22/29*, modificando la transcripción de genes de resistencia a enfermedades (Asai *et al.*, 2002).

En arroz se reportó por primera vez a *BWMK1* ("Blast and wound induced MAP kinase") como una nueva MAPK inducida durante la infección por *Magnaporthe grisea* y por daño mecánico. Su expresión se observó a las 4 horas después de la infección con hongos, y a los 30 min después del daño mecánico. Este gen codifica una proteína de 506 aminoácidos que contiene un nuevo motivo de activación TDY y cerca de 150 aminoácidos únicos en su región C-terminal. Al realizar ensayos de cinasa en gel de extractos protéicos provenientes de hojas inoculadas con el patógeno, se observó un ligero aumento en la actividad a las 8 horas después de la inoculación (He *et al.*, 1999).

Cheong y colaboradores en 2003, realizaron un estudio más detallado de la proteína que codifica *BWMK1* y que se encuentra en el núcleo, en el cual evaluaron la capacidad de *BWMK1* para fosforilar a OsEREBP1, un factor de transcripción que se une a promotores relacionados con la patogénesis o PR (Cheong *et al.*, 2003).

En tabaco, se han encontrado dos MAPK, SIPK, una proteína de 48 kDa que es activada por ácido salicílico, y WIPK, de 44 kDa que se activa durante la infección con TMV (Zhang y Klessig, 1998). Ambas han sido relacionadas con la inducción de muerte celular programada y la respuesta de hipersensibilidad (Innes, 2001). Además, hay evidencias de que las vías de transducción de señales que participan durante la respuesta a factores abióticos, como el daño mecánico y aquellas que participan durante la inducción de respuestas de defensa que son dependientes de los genes *R*, están entrelazadas (Romeis *et al.*, 1999).

A diferencia de otros trabajos, Droillard y colaboradores realizaron un estudio en tabaco en el cual evaluaron el efecto del estrés hipoosmótico y la adición de oligogaracturónidos en suspensiones celulares, observando mediante el uso de anticuerpos específicos que no hay diferencias en actividad de ambas proteínas en presencia de los oligogaracturónidos (Droillard *et al.*, 2000).

Kumar y Klessig reportaron la activación de las MAPK, SIPK y WIPK, después de la infección por patógenos o el tratamiento con inductores, y evaluaron la relación entre esta activación y otros compuestos característicos de la respuesta de defensa, como el ácido salicílico (SA), el óxido nítrico (NO), el etileno (Et) y el ácido jasmónico (JA). SIPK solamente es activada por NO y SA, los cuales no activan a WIPK, por lo que concluyen que SIPK está localizada río abajo del ácido salicílico y el óxido nítrico en la respuesta a patógenos, a diferencia de WIPK, del cual no se conoce el mecanismo (Kumar y Klessig, 2000).

Jin y colaboradores observaron que al eliminar 64 aminoácidos de la región amino terminal de NtMEK2, la cascada de MAPK se ve afectada, y lo más importante es que en estas mutantes hay una disminución en la resistencia mediada por el gen *N* durante la infección con el virus del mosaico del tabaco (TMV), por lo que concluyen que la vía NtMEK2-SIPK/WIPK juega un papel positivo durante la resistencia mediada por el gen *N*, y es probable que sea mediante la regulación de la respuesta de hipersensibilidad (Jin *et al.*, 2003). Liu y colaboradores (2000) y Yang y colaboradores (2001) clonaron los genes *ntmek2* y *sipkk*, observando que la cascada de MAPK puede regular negativamente la respuesta de defensa de las plantas durante una enfermedad (Liu *et al.*, 2000 y Yang *et al.*, 2001).

En *Lycopersicon peruvianum* se ha encontrado que las vías de señalización inducidas por diversos estímulos como la sistemina, los oligosacáridos y la radiación ultravioleta convergen al nivel de MAPK, y se obtuvieron las secuencias de dos de ellas: LeMPK1 y LEMP2. El hecho de que estas dos MAPK hayan sido activadas en respuesta a estos tres diferentes estímulos, indica que las vías convergen en algún punto, y en este caso, solamente la radiación UV presentó una MAPK adicional que se activó en respuesta a este estrés (Holley *et al.*, 2003).

Por otro lado, en *C. annuum*, Shin y colaboradores en 2001 clonaron dos MAP cinasas, MK1 y MK2. Estos genes codifican proteínas inducibles por estrés, y responden al daño mecánico, a la radiación ultravioleta y al frío. Mediante la comparación de las secuencias, observaron que la secuencia peptídica de MK1 tiene un 92% de identidad con WIPK, y que la transcripción del gen se induce durante el daño mecánico. La secuencia de MK2, en cambio, tiene un alto porcentaje de similitud con NTF4 y con SIPK, y su expresión fue constante en todos los tejidos. Además, se detectó que los cambios en la expresión, en la activación y su relación con el estímulo varían dependiendo del cultivar evaluado (Shin *et al.*, 2001).

Katou y colaboradores clonaron a StMEK1 de *Solanum tuberosum*, un ortólogo de NtMEK2, cuya sobreexpresión produce muerte celular en hojas de *Nicotiana benthamiana*. También, se detectó un aumento en la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta de defensa al exponer estas plantas a homogeneizados de *Phytophthora infestans* (Katou *et al.*, 2003).

En perejil, Kroj y colaboradores evaluaron la respuesta de resistencia a *Phytophthora sojae* en cultivos celulares. Esta respuesta de defensa incluye la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación transcripcional de genes de patogénesis (PR). Al aplicar un inhibidor de la NADPH oxidasa, observaron que la producción de fitoalexinas se bloqueó, pero la expresión de genes PR no se vio afectada, por lo que propusieron la existencia de una vía alterna para la activación de la expresión de estos genes. Mediante el uso de anticuerpos específicos identificaron tres MAPK activadas como respuesta al inductor Pep-13. La transformación de protoplastos con los ADNc correspondientes demostró que las MAPK están relacionadas con la expresión de genes PR como respuesta al inductor (Kroj *et al.*, 2003).

Cardinale y colaboradores observaron que existen diferencias en cuanto al estímulo al cual responden dos vías mediadas por MAPK. En el caso de SIMKK, esta regula la señalización por estrés salino e inductores, pero en el caso de PRKK solamente responde a la presencia de un inductor. Por lo anterior, proponen un

modelo en el cual las MAPK cinasas funcionan como puntos de convergencia de señales de estrés, activando a varias MAP cinasas, y la especificidad de la señal depende de las combinaciones de diferentes MAPK cinasas y MAP cinasas, así como de otros mecanismos intracelulares (Cardinale *et al.*, 2002).

Estudios realizados con diferentes inductores de *Phytophthora*, como los carbohidratos, las proteínas y otras moléculas pequeñas (Hahn, 1996), han contribuido a conocer los mecanismos de defensa (Zhang *et al.*, 1998), que incluyen cambios en la expresión génica de MAPK (Kamoun *et al.*, 1997). En la mayoría de los casos, la expresión de los genes que codifican MAPK no se ve afectada en presencia de algún patógeno; en general, las alteraciones se observan a nivel postraducciona. Sin embargo, existen algunas evidencias en las cuales se han observado cambios en ambos niveles, por lo que es importante realizar estudios al respecto (He *et al.*, 1999; Song y Goodman, 2002).

Aún se desconoce mucho sobre la señalización que se encuentra involucrada en la respuesta de defensa de *C. annuum* a patógenos, sólo se sabe que algunas genes se inducen en respuesta a bacterias (Jung y Hwang, 2000; Lee *et al.*, 2001), hongos (Oh *et al.*, 1999), oomicetos (Egea *et al.*, 2001) y virus (Egea *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003a; Shin *et al.*, 2003b; Yoo *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004a; Park *et al.*, 2004b; Kim *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005b), a nivel transcripcional (Jung y Hwang, 2000; Park *et al.*, 2001) y también se ha observado un incremento en la actividad de proteínas, como las  $\beta$ -1,3 glucanasas (Egea *et al.*, 1996; García-Pérez *et al.*, 1998) y las peroxidasas (Egea *et al.*, 2001). En *C. chinense*, se desconoce si la vía de transducción de señales mediada por las MAPK está involucrada en la modificación génica durante la respuesta de defensa, por lo que en este trabajo se investigó si las MAP cinasas se activan como respuesta a la adición de CWH de *P. capsici*.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de determinar si la vía de las MAPK participa en la respuesta de defensa de *C. chinense*, inducida por los CWH de *P. capsici*, se analizó la presencia de MAPK activas en los cultivos celulares en condiciones normales y cuando son incubados con los CWH, los cuales fueron preparados como se indica en la sección 2.3.2 del capítulo anterior.

### 3.2.1 INDUCCIÓN

La inoculación del cultivo celular se realizó en el décimo día, contando a partir de la fecha de siembra, debido a que en este momento el cultivo celular presenta menos estrés (Figura 2.1), asegurando que la respuesta que se observe se deba al contacto con el inductor. Se analizaron los extractos protéicos de cultivos inducidos con tres concentraciones de homogeneizados (60, 90 y 120 miliequivalentes de glucosa·mL<sup>-1</sup>), como se describió en el capítulo anterior.

### 3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MAPK

Trabajos previos han demostrado que la activación de las MAP cinasas se detecta pocos minutos después de la inducción (Cardinale *et al.*, 2000; Cheong *et al.*, 2003; Desikan *et al.*, 1999b; Desikan *et al.*, 2001; Droillard *et al.*, 2000; Zhang y Klessig, 1998), por lo que en el presente trabajo la actividad de MAPK fue evaluada durante un periodo de 30 min, tomando muestras cada 5 min, para cada una de las concentraciones (30, 60 y 90 meq de glucosa·mL<sup>-1</sup>). Se obtuvieron los extractos protéicos totales a partir de células en suspensión tratadas durante 0, 5, 10, 15, 20 y 25 min de contacto con el inductor y no tratadas con el homogenado. Posteriormente, se determinó la presencia de proteínas cinasas activas en los extractos correspondientes mediante el ensayo de cinasa en gel. Debido a que el sustrato utilizado en este ensayo, puede ser fosforilado por otras proteínas cinasas, mediante inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra MAP cinasas bisfosforiladas (Arroyo *et al.*, 2005; Lebrun-García *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999), se determinó si la proteína observada corresponde a una MAPK.

La obtención del extracto protéico se realizó a partir de 1 g de células en suspensión, pulverizando el tejido con nitrógeno líquido y homogeneizándolo en 0.5 mL del amortiguador de extracción (HEPES-Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 50 mM, ortovanadato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM, glicerol 10 %, PMSF 1 mM, aprotinina 1  $\mu$ M, DTT 5 mM y leupeptina 1  $\mu$ M) (Arroyo-Serralta *et al.*, 2005). El homogenado se centrifugó a  $23,700 \times g$  a 4 °C durante 45 min, se tomó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford (1976), utilizando como estándar una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA). Los extractos protéicos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

### 3.2.2.1 ENSAYO DE CINASA EN GEL

El ensayo de cinasa en gel se realizó de acuerdo con Arroyo-Serralta *et al.* (2005), como se describe a continuación. Se fraccionaron 25  $\mu$ g de los extractos protéicos mediante electroforesis de poliacrilamida al 15% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), adicionando  $0.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteína básica de mielina (MBP) antes de la polimerización. Como control negativo, el ensayo de cinasa en gel se realizó fraccionando los extractos en geles embebidos con  $0.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de caseína o de histona H1 (Arroyo *et al.*, 2005), respectivamente. Después de la electroforesis, se realizaron cuatro lavados con el amortiguador A (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; 2-propanol al 20%) a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles se equilibraron con el amortiguador B (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0;  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM) durante 90 min a temperatura ambiente. La desnaturalización se realizó incubando los geles en el amortiguador C (Urea 8 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8.0;  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM) a temperatura ambiente durante una hora. Por último, la renaturalización se realizó incubando los geles en el amortiguador D (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0;  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM; Tween 20 al 0.04 %) durante toda la noche a 4 °C, con cuatro cambios de amortiguador.

El ensayo de fosforilación se inició con la incubación del gel en la mezcla de reacción (HEPES-KOH 40 mM, pH 7.5; EGTA 1.5 mM; EDTA 1.5 mM; DTT 5 mM;

MgCl<sub>2</sub> 12 mM) durante una hora a temperatura ambiente. Luego se incubó durante una hora más en la mezcla de reacción adicionada con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 5  $\mu$ M (110 TBq·mmol<sup>-1</sup>). El [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP que no se incorporó se eliminó con 6 lavados de 30 min cada uno, en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % y pirofosfato de sodio al 1% C. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, y se detectó la actividad mediante una película autorradiográfica.

### 3.2.2.2 INMUNODETECCIÓN DE MAPK ACTIVADAS

Para la detección de MAPK activadas, se utilizó un anticuerpo comercial diseñado específicamente contra el motivo TEY bisfosforilado de estas proteínas. Se realizó la electroforesis bajo las mismas condiciones que las que se describieron anteriormente (sin los sustratos), y las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20 %) durante dos horas a 400 mA. Después de la transferencia, las membranas fueron teñidas con una solución de rojo de Ponceau (ácido acético 1 %; rojo de Ponceau 0.05 %), y digitalizadas. El colorante fue eliminado lavando la membrana con agua y amortiguador de transferencia. El bloqueo fue realizado durante 1 hora a temperatura ambiente con el amortiguador de bloqueo TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.6%) adicionado con leche descremada al 5 % (Cruz-García *et al.*, 1998). Las membranas fueron lavadas tres veces con TBST durante 15 min cada una, y la incubación con el anticuerpo primario se realizó a una dilución 1:5000 durante 12 horas a 4 °C. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante tres lavados de 15 min a temperatura ambiente con TBST, se bloquearon las membranas durante 1 hora bajo las condiciones antes descritas, y después, se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario (Lebrun-García *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999) en TBST con leche descremada al 2.5 %. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces a temperatura ambiente durante 15 min con TBST y la reacción se reveló con el "ECL western blot chemiluminescence kit".

### **3.2.3 CLONACIÓN DE SECUENCIAS DE MAPK**

Las secuencias de MAPK se obtuvieron a partir del ARN total de hojas de *C. chinense* infectadas con virus.

#### **3.2.3.1 AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE MAPK**

El aislamiento del ARN total se realizó por el método de Camacho-Villasana, el cual consistió en colocar 500  $\mu$ l del amortiguador de extracción (Tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7.0, N-lauril sarcosina 0.5 %) y 500  $\mu$ l de fenol saturado con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) en un tubo eppendorf. A esta mezcla se le agregaron 3.5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M. Se pulverizaron 0.2 g de tejido con nitrógeno líquido y se colocaron en el tubo preparado anteriormente. Se mezcló con un vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200  $\mu$ l de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó con el vórtex durante un min. Se dejó reposar durante 12 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf, se precipitó con 500  $\mu$ l de isopropanol, mezclando por inversión e incubando durante 7 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 min y se desechó el sobrenadante. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 75 %, centrifugando a 22000 x g y 4 °C durante 5 min. Después del segundo lavado, se secó la pastilla y se resuspendió en 200  $\mu$ l de TESAR (Tris-HCl 1M pH 7.6, EDTA 1M, N-lauril sarcosina 1%), se le agregaron 200  $\mu$ l de aq/CTAB y 200  $\mu$ l de bu/CTAB, y se mezcló con un vórtex durante 2 min. Posteriormente, se centrifugaron a 22000 x g durante 5 min para separar las fases. Se removió la fase superior de butanol y se transfirió a tubo nuevo. Se extrajo nuevamente la capa inferior con 200  $\mu$ l de bu/CTAB, se removió la fase superior y se colocó en el mismo tubo que la anterior. Se agregaron 150  $\mu$ l de una solución de NaCl 0.2 M a las fases de butanol, se agitó durante 30 s con un vórtex, se centrifugó durante 5 min a 22000 x g y 4 °C.

La capa superior fue transferida a un tubo limpio y se centrifugó nuevamente con 150  $\mu$ l de NaCl 0.2 M. La fase inferior se colocó en el mismo tubo de la fase acuosa antes colectada. A la fase acuosa se le agregaron 300  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló con un vórtex durante 30 s. Se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a 4 °C, y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se le agregaron 0.8 volúmenes de isopropanol y se precipitó a -20 °C por al menos 1 h. Se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C y se lavó la pastilla con etanol al 75 % dos veces mediante centrifugación a 22000 x g durante 10 min, Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en agua tratada con DEPC (Camacho-Villasana *et al.*, 2002).

Las secuencias de las MAPK fueron obtenidas mediante RT-PCR utilizando los cebadores degenerados PIG (5'-GGNGCYTACGGHATYGTGGTTGYTCK-3') y MK IX (5'-GAAHATYCAACCBACHGACCAHACATCAAT-3') que amplifican un fragmento de 564 nucleótidos. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 30 min a 45 °C; 1 ciclo de 3 min a 94 °C; 40 ciclos que incluyen 30 seg a 94 °C, 30 seg a 94 °C y 1 min a 72 °C; y un ciclo de 10 min a 72 °C).

El producto de la amplificación por RT-PCR fue fraccionado mediante electroforesis nativa en gel de agarosa al 1%, y posteriormente fue purificado del gel para ser ligado en el vector de clonación pGEM T-easy (PROMEGA) o TOPO pCR 2.1 (INVITROGEN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una alícuota de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

### **3.2.3.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli***

La inducción de la competencia se realizó como se describe a continuación. Se sembró la bacteria en una caja con medio de cultivo LB por agotamiento y se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se picó una colonia para inocular 3 mL de LB líquido y se cultivó toda la noche a 37 °C con agitación (250 rpm). Se tomó 1 mL del cultivo de toda la noche, se adicionó a 100 mL de medio LB y se cultivó a 37 °C hasta obtener una OD<sub>600</sub> = 0.46. El tubo se colocó en hielo

durante 15 min, y luego se centrifugó a 5000 x g durante 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 0.4 volúmenes del amortiguador TfbII (Acetato de potasio 30 mM, cloruro de rubidio 100 mM, cloruro de calcio 10 mM, cloruro de manganeso 50 mM y glicerol 15 %), se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó a 5000 x g durante 5 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió en 0.04 volúmenes del amortiguador TfbII (MOPS 10 mM, cloruro de calcio 75 mM, cloruro de rubidio 10 mM y glicerol 15 %), se incubó en hielo durante 15 min y después de alicuotar en volúmenes de 100 µL, los tubos se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarlas a -80 °C hasta su uso.

### **3.2.3.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

Se descongelaron las células competentes y el plásmido en hielo. Se colocaron 1.5 µL del plásmido al tubo con las células competentes, mezclando suavemente. Se incubó en hielo durante 30 min, se colocó durante 45 seg a 42° C, e inmediatamente se transfirió a hielo, donde se incubó durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 900 µL de medio de cultivo LB y se cultivó durante 1 h a 37 °C con agitación suave. Finalmente, alícuotas de 100 µL del cultivo bacteriano se sembraron masivamente en medio sólido LB conteniendo ampicilina (100 µg·mL<sup>-1</sup>), X-Gal e IPTG, durante toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas y se analizó la presencia de plásmidos recombinantes.

### **3.2.3.4 PURIFICACIÓN ADN PLASMÍDICO**

Las colonias blancas se aislaron y se cultivaron en medio de cultivo líquido LB a 37 °C, conteniendo ampicilina (100 µg·mL<sup>-1</sup>) durante toda la noche en agitación (250 rpm). Las bacterias se centrifugaron por 10 seg a máxima velocidad, se resuspendieron en 200 µL del amortiguador de resuspensión (50 mM Tris, pH 8.0; 10 mM EDTA y 100 µg·mL<sup>-1</sup> de RNasa A). Se le agregaron 200 µL de la solución de lisis (NaOH 200 mM y SDS 1%) y se mezcló por inversión suave hasta que la solución se clarificó. Se le agregaron 200 µL de la solución de neutralización

(acetato de potasio 3M, ajustando el pH a 5.5 con ácido acético) y se mezcló perfectamente por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad por 5 min y el sobrenadante se pasó a un tubo que contenía la solución de sílica (aproximadamente al 13% en H<sub>2</sub>O desionizada), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a máxima velocidad por 30 seg. Se aspiró el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 0.5 mL de la solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris 10 mM, pH 7.5, EDTA 2.5 mM y etanol 50%), se resuspendió la pastilla con vórtex y se centrifugó a máxima velocidad por 10 seg. Se aspiró el sobrenadante y se secó la pastilla por 10 min a TA y se resuspendió en 35 µL de agua desionizada, se incubó a 55 °C durante 2 min y se centrifugó a máxima velocidad durante 30 seg. Se aspiró el sobrenadante y se colectó en un tubo nuevo.

### **3.2.3.5 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL INSERTO**

La verificación de la presencia del inserto se realizó mediante restricción del ADN plasmídico con *Eco RI*, y el producto se visualizó en un gel de agarosa al 1 %.

### **3.2.3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MAPK**

El análisis de la expresión se realizó a partir de células en suspensión tratadas con 90 meq gluc·mL<sup>-1</sup> durante 15 y 24 horas.

#### **3.2.3.6.1 OBTENCIÓN DEL ARN TOTAL DE TEJIDO TRATADO CON CWH**

El análisis de la expresión se realizó mediante Northern blot reverso, para lo cual el ARN de células en suspensión tratadas con 90 meq gluc·mL<sup>-1</sup>, se obtuvo como se describe a continuación. Se pulverizó 0.1 g de tejido congelado con nitrógeno líquido y se colocó en un tubo con 1 mL del amortiguador de extracción (**TRIZOL®**), se incubó durante 10 min, se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se le agregaron 100 µL de la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó con vórtex durante 30 segundos y

se centrifugó 10 min a 4 °C a 12000 x g. Se colocó el sobrenadante en un tubo limpio, se le agregó un volumen de isopropanol frío y se incubó durante 30 min a -80 °C. Se centrifugó a 22000 x g durante 20 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla fue lavada dos veces con etanol al 70 %, centrifugando durante 10 min a 4 °C y 22000 x g en cada uno. La pastilla se secó a temperatura ambiente durante 15 min y se resuspendió en agua con DEPC (Chomczynski y Sachi, 1987)

### **3.2.3.6.2 HIBRIDACIÓN**

Las secuencias de MAPK fueron amplificadas mediante PCR como se describió en la sección 3.2.3.1 y se fijaron en una membrana mediante luz ultravioleta.

La membrana, que contenía los productos de PCR de cada una de las secuencias, se colocó en la solución de hibridación (fosfato de sodio 0.5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM, pH 8.0 y albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %) durante 24 horas para la prehibridación. La hibridación se realizó durante 24 horas en la misma solución, agregando el ADNc marcado con digoxigenina y sintetizado con Oligo dT. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente con SSC 2X, seguidos de tres lavados de 20 min con SSC 2X a 65° C, un lavado de 30 min con SSC 0.5X a 65° C, un lavado de 30 min con SSC 0.2X a 65° C, un lavado de 30 min con SSC 0.1X a 65° C. La membrana se equilibró durante 1 min en la solución de lavado 3 (100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl pH 7.5 y Tween 20 al 0.3 %), se bloqueó con la misma solución adicionada con leche descremada al 5% durante 1 hora, y se incubó con el anticuerpo diluido 1:10,000 en la solución de bloqueo. Se equilibró la membrana con la solución de detección (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM), se le agregó CSPD (Roche®) y finalmente se detectó mediante exposición a una película fotosensible.

### **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En esta sección se muestran los resultados correspondientes a la activación de las MAPK como respuesta a los CWH y la modificación de la expresión de genes de MAPK.

#### **3.3.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE MAPK**

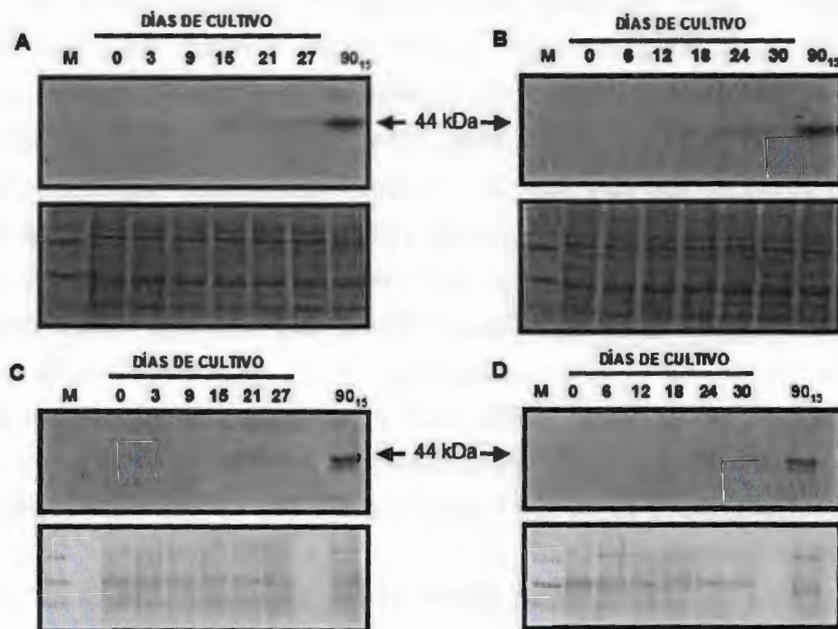
Antes de determinar si las MAPK se activan como respuesta a los CWH es necesario evaluar la presencia de MAPK activas en cultivos en crecimiento bajo condiciones normales.

##### **3.3.1.1 ACTIVIDAD DE MAPK A LO LARGO DEL CICLO DE CULTIVO**

Existen diversos reportes que indican que las MAP cinasas están involucradas en procesos de desarrollo (Bögge *et al.*, 1999), es decir que no son exclusivamente activadas durante la respuesta a estrés, por lo que es pertinente determinar si en cultivos celulares en crecimiento, estas proteínas se encuentran activadas normalmente.

Se tomaron muestras de cultivos a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 27 y 30 días del cultivo celular, y se analizó la presencia de MAP cinasas activadas mediante ensayos de cinasa en gel e inmunodetección contra MAPK bisfosforiladas (Figura 3.1).

Mediante estos ensayos se determinó que bajo condiciones normales del crecimiento del cultivo celular existen niveles basales de actividad de MAPK. Mediante el ensayo de cinasa en gel, se observó una proteína cinasa de la misma masa molecular que la que se induce como respuesta a los homogeneizados, a partir del día 15 del ciclo de cultivo. Al determinar si esta correspondía a una MAPK bisfosforilada, se encontraron proteínas de diferentes masas moleculares, incluyendo la de ~44 kDa. En todos los casos, los niveles de actividad fueron mucho menores que en los cultivos tratados (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Determinación de la presencia de MAPK activadas en el ciclo de cultivo. En cada caso, 25  $\mu\text{g}$  de proteína de células en suspensión de diferentes días del ciclo de cultivo fueron fraccionadas por electroforesis disociante en gel de poliacrilamida al 15%. Los geles fueron sometidos al ensayo de cinasa en gel (A y B) o las proteínas fueron transferidas y sometidas a inmunodetección con anticuerpos anti-MAPK activadas (C y D), como se describe en la sección de Materiales y Métodos. M: marcador de masa molecular; 90<sub>15</sub>: cultivos celulares expuestos a CWH de *P. capsici* durante 25 min, como control positivo.

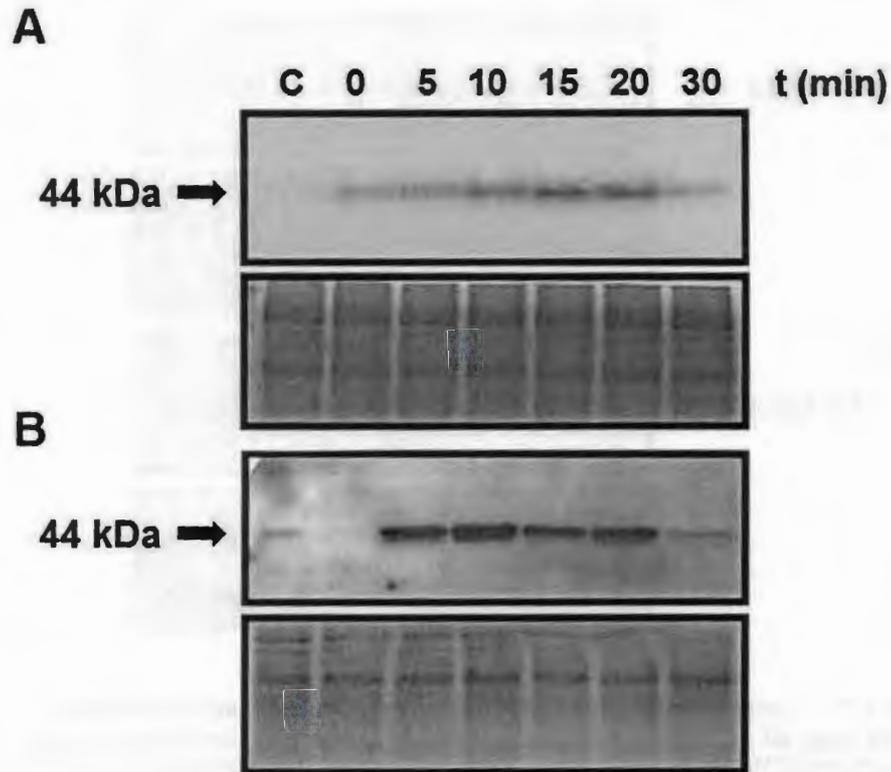
### 3.3.1.2 EFECTO DE LA INDUCCIÓN CON CWH DE *P. capsici* EN LA ACTIVIDAD DE MAPK

Se analizó la actividad de MAP cinasas en cultivos celulares expuestos a 60, 90 y 120 meq glucosa·mL<sup>-1</sup>, para determinar si esta vía se activa como respuesta a los homogeneizados de *P. capsici*. Los cultivos celulares se indujeron con los extractos de pared celular durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min.

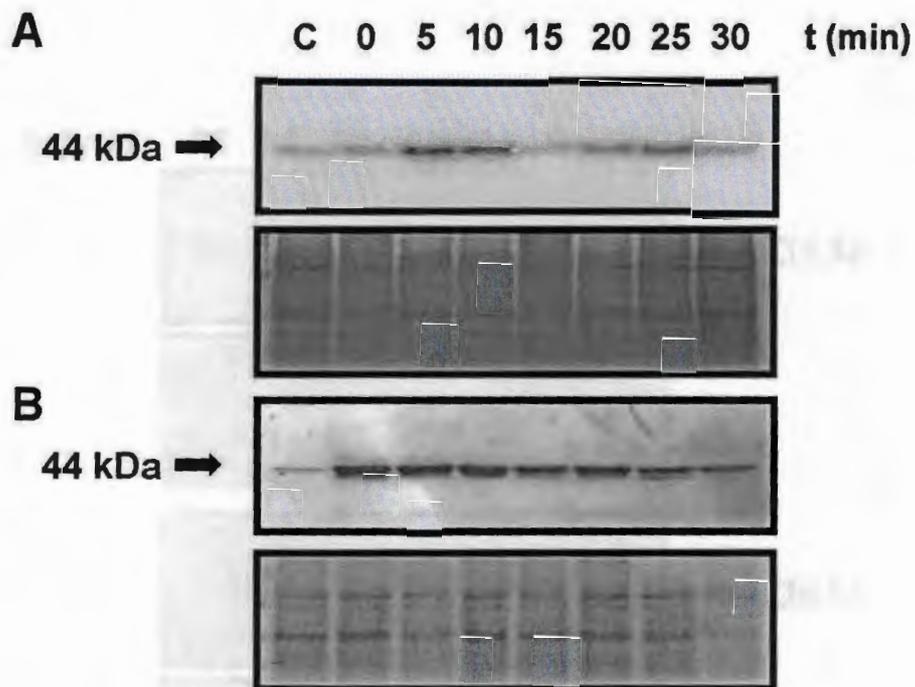
Las MAPK de plantas reportadas hasta el momento poseen un masa de 39 kDa (Desikan *et al.*, 1999b), 40 kDa (Kumar y Klessig, 2000; Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 2000), 43 kDa (Desikan *et al.*, 2001; Ligterink *et al.*, 1997), 44 kDa (Bögre *et al.*, 1997; Cardinale *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 1999b; Desikan *et al.*, 1999a; Duerr *et al.*, 1993; Kumar y Klessig, 2000; Zhou *et al.*, 2004), 45 kDa (Voronin *et al.*, 2001), 46 kDa (Cardinale *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 1999; Usami *et al.*, 1995), 47 kDa (Desikan *et al.*, 2001; Suzuki y Shinshi, 1995), 48 kDa (Holley *et al.*, 2003; Kumar y Klessig, 2000; Lee *et al.*, 2001; Romeis *et al.*, 1999; Stratmann y Ryan, 1997; Takezawa, 1999; Zhang y Klessig, 1997; Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2004), 49 kDa (Adam *et al.*, 1997), 50 kDa (Lebrun-García *et al.*, 1998; Pedley y Martín, 2004), 63 kDa (Lalle *et al.*, 2005) y 66 kDa (Kumar *et al.*, 2002). La proteína cinasa encontrada mediante los ensayos de cinasa en gel, posee una masa aproximada de 44 kDa (Figuras 2A, 3A, 4A, Y 5A), lo que sugiere que podría ser una MAPK.

La presencia de actividades de MAPK en las suspensiones celulares se analizó mediante ensayos de cinasa en gel y mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra el motivo de activación bisfosforilado. En conjunto, ambas técnicas revelan la activación bajo las tres concentraciones de homogeneizados de *P. capsici*, de dos MAP cinasas de alrededor de 43 y 44 kDa, respectivamente. (Figuras 3.2B, 3.3B, 3.4B, 3.5B y 3.6).

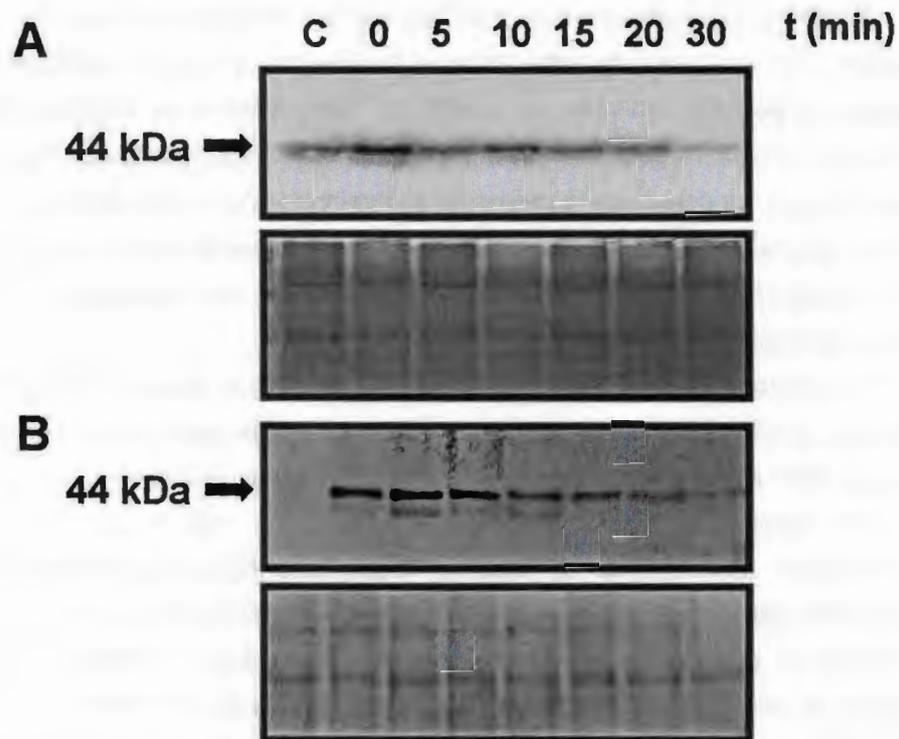
En todos los tratamientos se observó esta actividad, en algunos casos se presentó en el cultivo celular sin inductor. Probablemente su activación se induzca tanto por el vacío que se le aplicó a los cultivos durante la colecta como por la aplicación del inductor. El ensayo de cinasa en gel utiliza a la proteína básica de mielina, MBP, la cual es uno de los substratos de las MAPK (Erickson *et al.*, 1990); sin embargo, también es sustrato de otras proteínas cinasas como las cinasas dependientes de AMP cíclico, la proteína cinasa C y proteínas cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (Erickson *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1991), las cuales también se inducen durante la respuesta a estrés biótico (Bouché *et al.*, 2005), por lo que es necesario verificar si la actividad observada corresponde a una MAPK.



**Figura 3.2 Activación de MAPK en *C. chinense* por efecto de los CWH de *P. capsici*.** En cada caso, 25  $\mu\text{g}$  de proteína extraída de cultivos celulares adicionados con agua estéril (C) o con los CWH ( $60 \text{ meq glucosa} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) por diferentes períodos de tiempo (0, 5, 10, 15, 20, 30 min.), fueron fraccionadas por electroforesis disociante en gel de poliacrilamida al 15%. Los gels fueron sometidos al ensayo de cinasa en gel (A) o las proteínas fueron transferidas y sometidas a inmunodetección con anticuerpos anti-MAPK activadas (B), como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El panel inferior en A es una tinción de Coomassie; el panel inferior en B es la membrana teñida con Rojo de Ponceau. El experimento se repitió más de dos veces y se muestran resultados representativos.



**Figura 3.3 Activación de MAPK en *C. chinense* por efecto de los CWH de *P. capsici*.** En cada caso, 25  $\mu\text{g}$  de proteína extraída de cultivos celulares adicionados con agua estéril (C) o con los CWH (90 meq glucosa $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por los períodos que se indican (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min.), fueron fraccionadas por electroforesis disociante en gel de poliacrilamida al 15%. Los geles fueron sometidos al ensayo de cinasa en gel (A) o las proteínas fueron transferidas y sometidas a inmunodetección con anticuerpos anti-MAPK activadas (B), bajo las mismas condiciones que el ensayo anterior. El panel inferior en A es una tinción de Coomassie; el panel inferior en B es la membrana teñida con Rojo de Ponceau. El experimento se repitió más de dos veces y se muestran resultados representativos.



**Figura 3.4** Activación de MAPK en *C. chinense* por efecto de los CWH de *P. capsici*. En cada caso, 25  $\mu\text{g}$  de proteína extraída de cultivos celulares adicionados con agua estéril (C) o con los CWH (120 meq glucosa- $\text{mL}^{-1}$ ) por los períodos que se indican (0, 5, 10, 15, 20 y 30 min.), fueron fraccionadas por electroforesis disociante en gel de poliacrilamida al 15%. Los geles fueron sometidos al ensayo de cinasa en gel (A) o las proteínas fueron transferidas y sometidas a inmunodetección con anticuerpos anti-MAPK activadas (B), bajo las mismas condiciones que los ensayos anteriores. El panel inferior en A es una tinción de Coomassie; el panel inferior en B es la membrana teñida con Rojo de Ponceau. El experimento se repitió más de dos veces y se muestran resultados representativos.

La proteína cinasa observada en los cultivos celulares tratados con 60 meq gluc- $\text{mL}^{-1}$  fue detectada desde el tiempo cero, a partir del cual esta fue incrementando conforme transcurrió el tiempo de la adición de los CWH. Se observó una máxima actividad a los 10 min, y luego, fue disminuyendo hasta llegar a niveles basales a los 30 min (Figura 3.2).

Al determinar la presencia de proteínas cinasas en gel con  $90 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se observó un nivel basal de actividad en el tratamiento con agua y mientras que al agregar las paredes celulares, se detectó un incremento en la actividad de la proteína de  $\sim 44 \text{ kDa}$ . Al determinar la presencia de MAPK bisfosforiladas mediante inmunodetección, se determinó la presencia de dos bandas correspondientes a  $\sim 43$  y  $\sim 44 \text{ kDa}$  desde el tiempo cero. Al igual que en el tratamiento anterior, existe un mayor nivel de actividad entre los 5 y 10 min, y después, va disminuyendo hasta llegar al nivel basal (Figura 3.3).

En el tratamiento con  $120 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$  se observó la mayor actividad en el tiempo cero, para luego disminuir (Figura 3.4). En todos los tratamientos, a los 30 min de la adición de los CHW se observan niveles muy bajos de actividad.

Se detectó la activación de dos MAPK de  $\sim 43$  y de  $44 \text{ kDa}$ , respectivamente. La segunda de ellas es difícilmente detectada mediante los ensayos de cinasa en gel; sin embargo, los patrones de activación detectados por esta técnica y por los ensayos de inmunodetección fueron similares a los observados en otros modelos, iniciando a los pocos minutos de inducción (Cardinale *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Nühse *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 1999; Suzuki y Shinshi, 1995). En algunos tratamientos se puede observar desde el inicio de la inducción, lo cual no es sorprendente, dado que este comportamiento ha sido reportado en cultivos celulares de tabaco tratados con inductores de origen bacteriano (Lee *et al.*, 2001).

La actividad de las MAPK detectadas en este trabajo permanece durante minutos a partir de la adición de los CWH, a diferencia de lo que se ha observado en cultivos celulares de otras especies, donde la actividad se mantiene hasta horas después del tratamiento (Desikan *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998); sin embargo, también existen trabajos en los cuales la actividad de las MAPK ya no se observa a la hora del tratamiento (Lee *et al.*, 2001), lo cual concuerda con la disminución en la actividad que se observó en *C. chinense*.

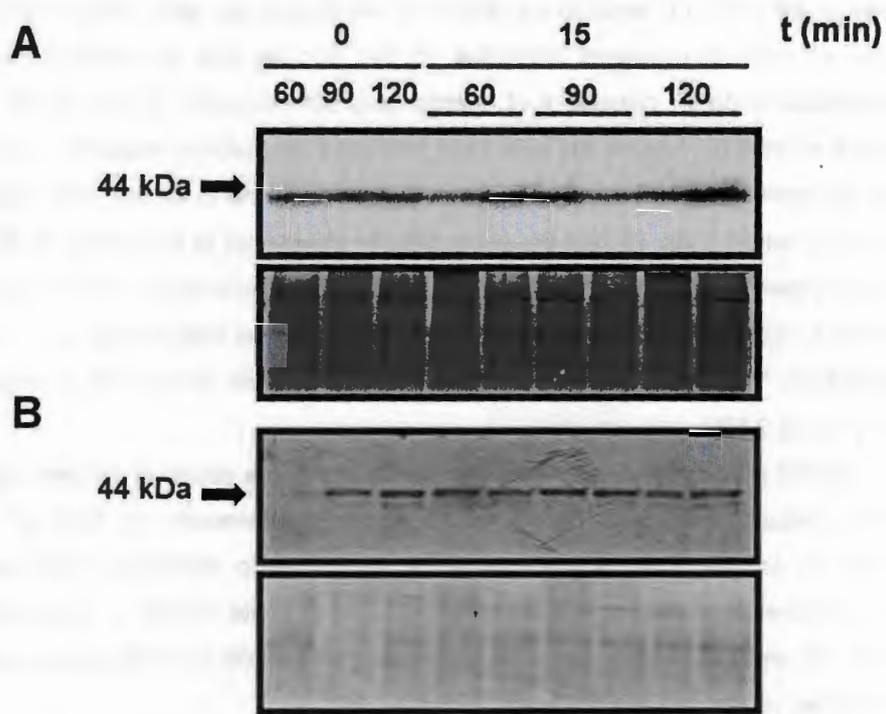
Los ensayos fueron realizados independientemente, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos para determinar cuál de las tres concentraciones

dió una mayor actividad. Con la finalidad de comparar los efectos de cada tratamiento, se realizó el ensayo de cinasa en un mismo gel, que incluyó extractos protéicos de cultivos celulares inducidos 15 min con las tres concentraciones de homogeneizados de *P. capsici*, y el tiempo cero de inducción (Figura 3.5A). Los resultados mostraron que en los extractos protéicos de cultivos inducidos con 120 meq de glucosa·mL<sup>-1</sup>, la actividad fue mayor que en el resto de los tratamientos, tanto a los 0 como a los 15 min de inducción. Se comprobó la presencia de MAPK activadas, y mediante inmunodetección, se observó nuevamente la presencia de las dos MAPK en casi todos los tratamientos, con excepción del tratamiento con 60 meq de glucosa·mL<sup>-1</sup> al tiempo cero de inducción, donde sólo se observa la proteína de 44 kDa (Figura 3.5B).

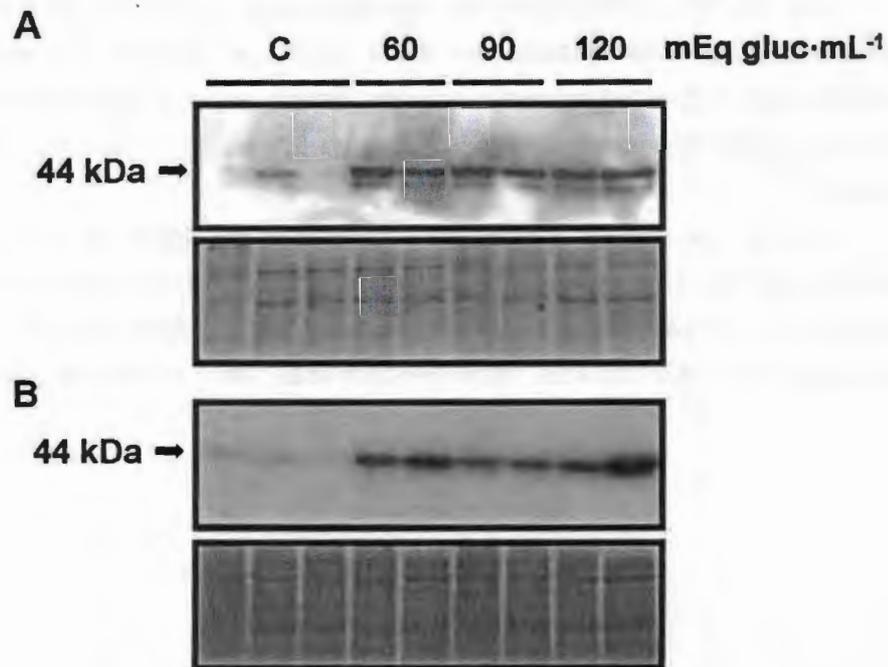
Debido a que se detectaron MAP cinasas activadas desde el tiempo cero, se realizó un ensayo de cinasa en gel y otro de inmunodetección de MAP cinasas activadas en ausencia de homogeneizados, comparando extractos protéicos de cultivos celulares sin inductor y de cultivos inducidos durante 15 min, y se observó la presencia de una MAP cinasa activada solamente en uno de los cultivos celulares a los que se les agregó solamente agua (Figura 3.6).

Es probable que esta MAP cinasa se active como respuesta a otro tipo de estrés, y no como una respuesta a la adición de paredes celulares de *P. capsici*. Sin embargo, es importante señalar que los niveles observados son mucho menores comparados con los cultivos celulares tratados con el homogenado (Figura 3.5).

Con la finalidad de determinar si estas MAPK se activan específicamente por la inducción, y no por otro tipo de estrés, se evaluaron controles que incluyen cultivos celulares no tratados, tratados con agua, con glucosa y con paredes. Al compararlos mediante el ensayo de cinasa en gel se observó actividad solamente en los tratamientos en los cuales se agregaron los CHW, y no cuando se agregó glucosa, agua y cuando se usaron los cultivos celulares no tratados (Figura 3.7 B). Este mismo comportamiento se observó al realizar la inmunodetección de MAPK bisfosforiladas, confirmando que la señal observada es producto de la presencia de las dos proteínas observadas en los demás tratamientos (Figura 3.7 A y 3.7 B).



**Figura 3.5 Activación de MAPK en *C. chinense* por efecto de los CWH de *P. capsici*.** Se fraccionaron 25 µg de los extractos protéicos totales de células en suspensión tratadas con diferentes concentraciones (60, 90 y 120 meq gluc·mL<sup>-1</sup>) de homogeneizados de *P. capsici* durante 0 y 15 min. Ensayo de cinasa en gel (A) e inmunodetección de MAPK bisfosforiladas (B). Se fraccionaron mediante electroforesis desnaturalizante 25 µg de proteínas extraídas de cultivos celulares inducidos con 60, 90 y 120 meq glucosa·mL<sup>-1</sup> durante 0 y 15 min. Las condiciones para el ensayo de cinasa en gel y la inmunodetección fueron las mismas que para los ensayos anteriores.

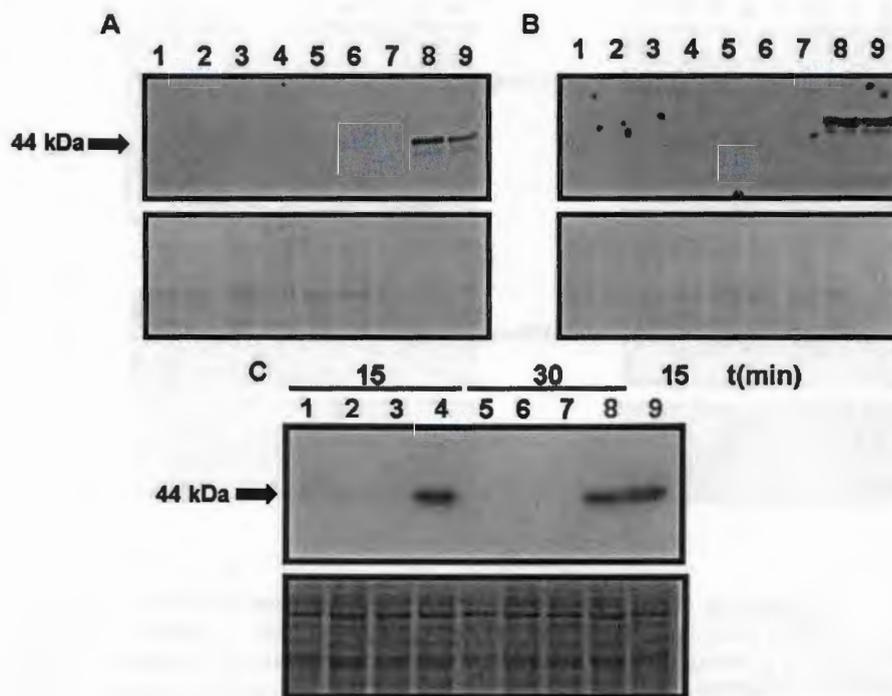


**Figura 3.6** Determinación de la activación de MAPK en *C. chilense* por efecto de los homogenizados de *P. capsici*. Se fraccionaron extractos 25  $\mu$ g de extractos protéicos totales de cultivos celulares tratados con diferentes concentraciones de homogeneizados de *P. capsici* (60, 90 y 120 meq gluc·mL<sup>-1</sup>) y agua durante 15 min (C). A: Ensayo de cinasa en gel utilizando a la proteína básica de mielina como sustrato, y B: inmunodetección de MAPK bisfosforiladas. Las condiciones para la inmunodetección fueron las mismas que para los ensayos anteriores.

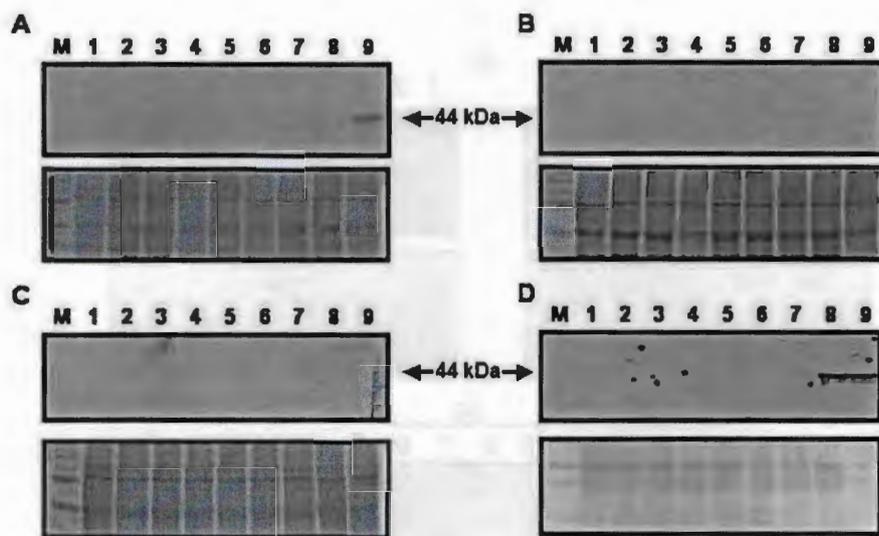
Los resultados demostraron que las proteínas cinasas encontradas mediante los ensayos de cinasa en gel poseen masas moleculares aproximadas de ~43 y de 44 kDa, respectivamente (Figuras 3.2A, 3.3A, 3.4A y 3.5A). Estas masas moleculares están dentro del rango de aquellas reportadas para MAPK descritas en otras especies.

Con las tres concentraciones, se observaron resultados similares, la activación de dos MAP cinasas, por dicha razón, se eligió la concentración intermedia para realizar los siguientes estudios, debido a que la respuesta fue más evidente que con 60 meq de glucosa·mL<sup>-1</sup>, y no tan rápida como con 120 meq glucosa·mL<sup>-1</sup>.

Además del uso de anticuerpos y el ensayo de cinasa en gel, existen diferentes estrategias que permiten determinar si estas proteínas son MAPK. Éstas incluyen el uso de sustratos que no son fosforiladas por las MAPK, como la caseína y la histona (Arroyo-Serralta *et al.*, 2005; Erickson *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1991).



**Figura 3.7** Determinación de la activación de MAPK en *C. chinense* por los homogenizados de *P. capsici*. Extractos protéicos totales de cultivos celulares de *C. chinense* fueron tratados con agua, glucosa ( $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y homogeneizados de *P. capsici* ( $90 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 15 y 30 min. Como control se obtuvieron extractos protéicos totales de cultivos celulares sin tratamiento. **A:** Cultivos celulares tratados durante 0 (1-4) y 15 min (5-8), cultivos no tratados (1 y 5), con agua (2 y 6), con glucosa (3 y 7) y con  $90 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$  de los CHW (4 y 8). **B:** Cultivos celulares tratados durante 0 (1-4) y 30 min (5-8), cultivos no tratados (1 y 5), con agua (2 y 6), con glucosa (3 y 7) y con CHW (4 y 8). **C:** Cultivos celulares tratados durante 15 (1-4) y 30 min (5-8), cultivos no tratados (1 y 5), con agua (2 y 6), con glucosa (3 y 7) y con CHW (4 y 8). En todas los ensayos el carril 9 corresponde a extractos protéicos de cultivos celulares tratados con  $90 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 15 min, analizados en la figura 3.3.



**Figura 3.8** Las cinasas que fosforilan a la MBP no fosforilan a la caseína ni a la histona H1. Extractos protéicos de cultivos celulares sin tratamiento y tratados con agua, glucosa ( $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y homogeneizados de *P. capsici* ( $90 \text{ meq gluc}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 30 min, fueron fraccionados mediante SDS-PAGE. La actividad de MAPK se evaluó mediante ensayo de cinasa en gel usando MBP (A), con caseína (B), o histona H1 (C) como sustratos. Se realizó la inmunodetección de MAP cinasas bisfosforiladas en los mismos extractos (D). Cultivos celulares del tiempo cero sin tratamiento (1), con agua (2), con glucosa (3), con paredes de *P. capsici* (4); células no tratadas (5), tratadas durante 30 min con agua (6), con glucosa (7) y con paredes de *P. capsici* (8); y muestra control con MAPK activadas ( $90_{25}$ ).

Las proteínas cinasas que se activan al adicionar los CHW no fosforilan a la caseína, ni a la histona H1 (Figura 3.8), lo cual coincide con lo que se ha reportado para MAP cinasas (Arroyo-Serralta *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2002)

Estos resultados sugieren que en cultivos celulares de *C. chinense* las MAP cinasas podrían estar participando en la respuesta a *P. capsici*.

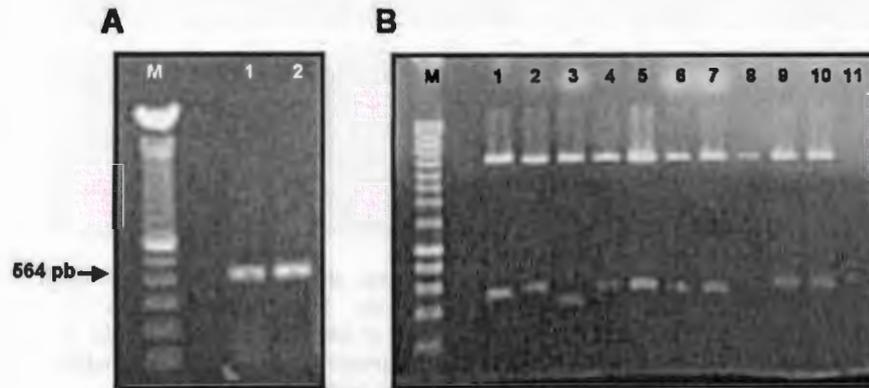
Este trabajo proporciona la primera evidencia de que en *C. chinense*, las MAP cinasas podrían estar involucradas en la señalización durante la respuesta a *P. capsici*.

### 3.3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MAPK

Las secuencias de MAPK fueron obtenidas mediante RT-PCR, insertadas en el vector TOPO pCR 2.1 y secuenciadas.

#### 3.3.2.1 OBTENCIÓN DE LA SONDA

Las secuencias de MAPK fueron obtenidas a partir de plantas infectadas con virus (datos no mostrados), el ARN total fue obtenido como se indica en la sección de materiales y métodos.



**Figura 3.9 Amplificación y verificación de los fragmentos de ADNc de MAPK.** Los productos de PCR (A) y de restricción (B) fueron fraccionados mediante electroforesis nativa en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A. Productos de la amplificación de MAPK a partir de hojas de *C. chinense* infectadas con virus (carriles 1 y 2). B. Liberación del fragmento contenido en los plásmidos de 11 clonas.

Se obtuvieron 20 clonas, de las cuales la mayoría presentaron el fragmento del tamaño esperado (564 pb). Se secuenciaron 17 de ellas y se obtuvieron tres secuencias diferentes (MPK1, MPK2 y MPK3). Debido a que se amplificó la región conservada de las MAPK (Figura 3.10), las diferencias no son muy evidentes; sin

embargo, fueron suficientes para diferenciar entre ellas durante el análisis de expresión.

En el cuadro 1 se muestran los resultados del análisis de la comparación de cada una de las secuencias con las reportadas en la base de datos.

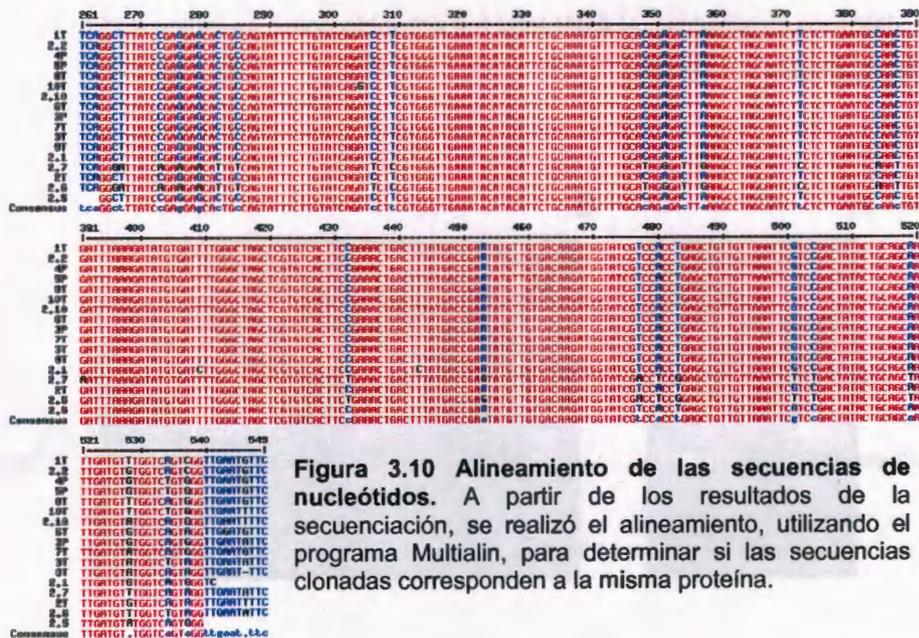


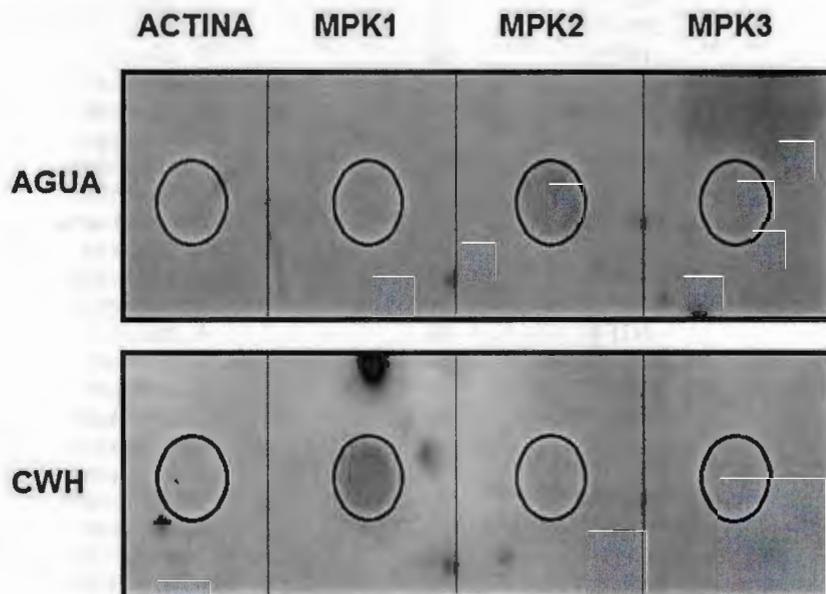
Figura 3.10 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos. A partir de los resultados de la secuenciación, se realizó el alineamiento, utilizando el programa Multialin, para determinar si las secuencias clonadas corresponden a la misma proteína.

**Cuadro 3.1 Identidad de las secuencias obtenidas.**

<b>EMBL</b>	<b>MAPK</b>	<b>% IDENTIDAD</b>	<b>ESPECIE</b>
AJ608158	StMPK1	94	<i>Solanum tuberosum</i>
	MAPK	94	<i>N. tabacum</i>
	MAPK1	93	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	NbSIPK	92	<i>N. benthamiana</i>
	NtSIPK	92	<i>N. tabacum</i>
	StMPK2	92	<i>S. tuberosum</i>
	NTF4	89	<i>N. tabacum</i>
	MAPK2	89	<i>C. annuum</i>
AJ608159	MAPK	94	<i>N. tabacum</i>
	StMPK1	93	<i>S. tuberosum</i>
	MAPK1	93	<i>L. esculentum</i>
	MAPK	92	<i>L. esculentum</i>
	NbSIPK	91	<i>N. benthamiana</i>
	NtSIPK	91	<i>N. tabacum</i>
	MPK2	90	<i>L. esculentum</i>
	StMPK2	90	<i>S. tuberosum</i>
AJ608160	NTF4	89	<i>N. tabacum</i>
	MAPK2	89	<i>C. annuum</i>
	MAPK2	99	<i>C. annuum</i>
	StMPK2	96	<i>S. tuberosum</i>
	MPK2	96	<i>L. esculentum</i>
	NTF4	94	<i>N. tabacum</i>
	NbSIPK	90	<i>N. benthamiana</i>
	NtSIPK	90	<i>N. tabacum</i>
	MAPK1	90	<i>L. esculentum</i>
	StMPK1	90	<i>S. tuberosum</i>
MAPK	91	<i>N. tabacum</i>	
MAPK	89	<i>L. esculentum</i>	

### 3.3.2.2 EXPRESIÓN DE MAPK EN CULTIVOS TRATADOS CON CWH

El análisis de la expresión se realizó mediante northern blot reverso, utilizando como sondas el ADNc de células tratadas con agua y CWH, marcado con digoxigenina.



**Figura 3.11. Efecto del tratamiento con CWH en los niveles de transcritos de MAPK.** Se analizaron los niveles de transcritos en cultivos celulares tratados durante 15 y 24 horas con agua o con 90 meq gluc·mL<sup>-1</sup>. La secuencia de actina, utilizado como control de carga fue obtenida como se indica en la sección de Materiales y Métodos del capítulo IV.

Los resultados del análisis de expresión muestran que de las tres MAPK clonadas, dos de ellas (MPK1 y MPK2) se modifican: los niveles de transcritos de MPK1 se incrementan como respuesta al tratamiento con CWH, a diferencia de MPK2, cuyos niveles disminuyen. Se sabe que las MAPK son reguladores, tanto negativos (Petersen *et al.*, 2000) como positivos de la respuesta de defensa de las plantas (He *et al.*, 1999; Song y Goodman, 2002).

Estos resultados no permiten determinar el papel de cada una; sin embargo, es probable que la MPK2, cuyos niveles disminuyen como respuesta al tratamiento, regule de manera negativa a la respuesta de defensa, mientras que MPK1 podría estar participando en el establecimiento de los sistemas de defensa.

Con estos resultados, no es posible determinar si las MAPK que se activan como respuesta al tratamiento son las mismas, cuya expresión se modifica.

### 3.4 CONCLUSIONES

En los cultivos celulares de *C. chinense* tratados con *P. capsici* se observó la activación de dos proteínas cinasas de ~43 y 44 kDa, en respuesta a la adición de homogeneizados de *P. capsici*. La masa molecular, la inmunodetección y los ensayos de actividad con diferentes sustratos (MBP, caseína e histona H1) sugieren que son MAP cinasas. Ambas son activadas como respuesta a la adición de los CHW de manera similar a la activación de las MAP cinasas reportadas.

La expresión de dos genes de MAPK se modifica como respuesta a los CWH de *P. capsici*.

La activación de las MAPK y la modificación en la expresión génica de las mismas indica un posible papel de esta vía en la respuesta de defensa de *C. chinense* contra *P. capsici*.

### 3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, M., Fukuna, M. and E. Nishida (1999) *Two coexisting mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer*. The EMBO Journal, **18**, 5347-5358.
- Adam, A.L., Pike, S., Hoyos, E., Stone, J.M., Walker, J.C. and A. Novacky (1997) *Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from Erwinia amylovora*. Plant Physiology, **115**, 853-861.
- Arroyo-Serralta, G.A., Kú-González, A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and J.J. Zúñiga-Aguilar (2005) *Exposure to toxic concentrations of aluminium activates*

- a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 27-35.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gómez, G.L., Boller, T., Ausubel, F.M., and J. Sheen (2002) *MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity*. *Nature*, **415**, 977-983.
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H. and E. Heberle-Bors (1999) *A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division*. *The plant cell*, **11**, 101-113.
- Camacho-Villasana, Y.M., Ochoa-Vallejo, N., Walling, L. and E.A. Bray (2002) *An improved method for isolating RNA from dehydrated and nondehydrated chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant tissues*. *Plant Molecular Biology Reporter*, **20**, 407-414.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T. and H. Hirt (2000) *Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36734-36740.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F. and H. Hirt (2002) *Convergence and divergence of stress induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases*. *The Plant Cell*, **14**, 703-711.
- 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, W.H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. and M.J. Cho (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 Physiology*, **132**, 1961-1972.
- Chomczynski, P. and N. Sachi (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar, J.J. and J.M. Vázquez-Ramos (1998) *Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins*. *Physiologia Plantarum*, **102**, 573-581.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T. and S.J. Neill (1999) *Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defense response in Arabidopsis thaliana suspension cultures*. *Planta*. **210**, 97-103.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K. and S. Neil (2001) *Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6*. *Plant Physiology*, **126**, 1579-1587.
- Droillard, M.J., Thibivilliers, S., Cazalé, A.C., Barbier-Brygoo, H. and C. Laurière (2000) *Protein kinases induced by osmotic stress and elicitor molecules in tobacco cell suspensions, two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase*. *FEBS Letters*, **474**, 217-222.
- Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T. and T. Jacobs (1993) *MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from flowering plant*. *The Plant Cell*, **5**, 87-98.

- Egea, C., Alcázar, M.D. and M.E. Candela (1996)  *$\beta$ -1,3 glucanase and chitinase as pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two *Capsicum annuum* cultivars infected with cucumber mosaic virus*. *Biologia plantarum*, **38**, 437-443.
- Egea, C., Ahmed, A.S., Candela, M. and M.E. Candela (2001) *Elicitation of peroxidase activity and lignin biosyntheses in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici**. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 151-158.
- Erickson, A.K., Payne, D.M., Martino, P.A., Rossomando, A.J., Shabanowitz, J., Weber, M.J., Hunt, D.F. and T.W. Sturgill (1990) *Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 19728-19735.
- Frye, C., Tang, D. and R. Innes (2001) *Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 373-378.
- Hahn, M.G. (1996) *Microbial elicitors and their receptors in plants*. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 387-412.
- Hardie, D.G. (1999) *Plant protein serine/threonine kinases: classification and function*. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, **50**, 97-131.
- Hazzalin, C.A. and L.C. Mahadean (2002) *MAPK regulated transcription: a continuously variable gene switch?*. *Nature Reviews*, **3**, 30-39.
- He, C., Fong, S.H., Yang, D. and G.L. Wang (1999) *BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **12**, 1064-1073.
- Hirt, H. (1997) *Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction*. *Trends in Plant Sciences*, **2**, 11-15.
- Holley, S.R., Yalamanchili, R.D., Moura, D.S., Ryan, C.A. and J.W. Stratmann (2003) *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 Physiology*, **132**, 1728-1738.
- Ichimura, K. (2002) *Mitogen activated protein kinase cascade in plants: a new nomenclature*. *Trends in Plant Science*, **7**, 301-308.
- Innes, R.W. (2001) *Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense*. *Trends in Plant Science*, **6**, 392-394.
- Jin, H., Liu, Y., Yang K.Y., Kim, C.Y., Baker, B. and S. Zhang (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., Ligterink, S., Baker, P.J., Huskisson, N.S. and H. Hirt (1996) *Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought*. *Proceedings of the National Academy of Science*, **93**, 11274-11279.

- Jonak, C., Ökresz, L., Bögre, L. and H. Hirt (2002) *Complexity, crosstalk and integration of plant MAP kinase signalling*. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 415-424.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., Groot, K.E., Vleashouers, V.G.A.A. and F. Govers (1997) *A gene encoding a protein elicitor of Phytophthora infestans is down-regulated during infection of potato*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **10**, 13-20.
- Katou, S., Yamamoto, A., Yoshioka, H., Kawakita, K. and N. Doke (2003) *Functional analysis of a mitogen-activated protein kinase kinase StMEK1*. *Journal of General Plant Pathology*, **69**, 161-168.
- Kiba, A., Miyake, C., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. and T. Shiraishi (1997) *Superoxide generation in extracts from isolated plant cell walls is regulated by fungal signal molecules*. *Phytopathology*, **87**, 846-852.
- Kim, K.J., Park, C.J., An, J.M., Ham, B.K., Lee, B.J. and K.H. Paek (2005a) *CaAlaAT1 catalyzes the alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper*. *Planta*, **221**, 857-867.
- Kim, K.J., Park, C.J., Ham, B.K., Choi, S.B., Lee, B.J. and K.H. Paek (2005b) *Induction of a cytosolic pyruvate kinase 1 gene during the resistance response to Tobacco mosaic virus in Capsicum annum*. *Plant Cell Reports*, **25**, 359-364.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and D. Scheel (2003) *Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxydative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 2256-2264.
- Kültz, D. and M. Burg (1998) *Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascade*. *The Journal of Experimental Biology*, **201**, 3015-3021.
- Kumar, D. and D.F. Klessig (2000) *Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**, 347-351.
- Lalle, M., Visconti, S., Marra, M., Camoni, L., Velasco, R. and P. Aducci (2005) *ZmMPK6, a novel maize MAP kinase that interacts with 14-3-3 proteins*. *Plant Molecular Biology*, **59**, 713-722.
- Lebrun-García, A., Ouaked, F., Chiltz, A. and A. Pugin (1998) *Activation of a MAPK homologues by elicitors in tobacco cells*. *The Plant Journal*, **15**, 773-781.
- Lee, J., Klessig, D.F., and T. Nürbenger (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*. *The Plant Cell*, **13**, 1079-1093.
- Lee, S.C. and B.K. Hwang (2002) *Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stress in Capsicum annum*. *Planta*, **216**, 387-396.
- Link, V.L., Hofmann, M.G., Sinha, A.K., Ehnes, R., Strnad, M. and T. Roitsch (2002) *Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated*

- protein kinases by voltage and defense-related stimuli*. *Plant Physiology*, **128**, 271-281.
- Liu, Y., Schiff, M. and S.P. Dinesh-Kumar (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.
- Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J. and M.C. Heath (2002) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interaction*. *The Plant Journal*, **29**, 257-268.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., and T. Boller (2000) *Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6*. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 7521-7526.
- Oh, B.J., Ko, M.K., Kostenyuk, I., Shin, B. and K.S. Kim (1999) *Coexpression of a defensin gene and thionin-like gene via different signal transduction pathways in pepper and Colletotrichum gloeosporoides interactions*. *Plant Molecular Biology*, **41**, 313-319.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G., Yoo, T.H. and K.H. Paek (2001) *A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. *Molecules and Cells*, **11**, 122-127.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., You, J.S. and K.H. Paek (2002) *Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. *Plant Molecular Biology*, **48**, 243-254.
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C. and K.H. Paek (2002) *Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway*. *The Plant Journal*, **37**, 186-198.
- Pedley, K.E. and G.B. Martin (2004) *Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 49229-49235.
- Petersen, M., Brodersen, P., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jenssen, A.B. and J. Mundy (2000) *Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance*. *Cell*, **103**, 1111-1120.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. and J.D.G. Jones (1999) *Rapid Avr9- and Cf9- dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses*. *The Plant Cell*, **11**, 273-287.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W. and K.H. Paek (2001) *Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of proteinase inhibitor gene*. *Plant Science*, **161**, 727-737.
- Shin, R., Park, C.J., An, J.M. and K.H. Paek (2003) *A novel TMV-induced hot pepper cell wall protein gene (CaTin2) is associated with virus-specific hypersensitive response pathway*. *Plant Molecular Biology*, **51**, 687-701.

- Song, F. and R.M. Goodman (2002) OsBIMK1, a rice MAP kinase involved in disease resistance responses. *Planta*, **215**, 997-1005.
- Stratmann, J.W. and C.A. Ryan (1997) *Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors*. Proceedings of the National Academy of Science, **94**, 11085-11089.
- Suzuki, K. and H. Shinshi (1995) *Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor*. *The Plant Cell*, **7**, 639-647.
- Takezawa, D (1999) *Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1. a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat*. *Plant Molecular Biology*, **40**, 921-933.
- Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishihama, R. and Y. Machida (1995) *Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants*. Proceedings of the National Academy of Science, **92**, 8660-8664.
- Voronin, V., Touraev, A., Kieft, H., van Lammeren, A.A.M., Heberle-Bors, E. and C. Wilson (2001) *Temporal and tissue specific expression of the tobacco ntf4 MAP kinase*. *Plant Molecular Biology*, **45**, 679-689.
- Wen, J.Q., Oono, K. and R. Imai (2002) *Two novel mitogen-activated protein signalling components, OsMEK1 and OsMAPK1, are involved in a moderated low temperature signaling pathway in rice*. *Plant Physiology*, **129**, 1880-1891.
- Yang, K.Y., Liu, Y. and S. Zhang (2000) *Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco*. Proceedings of the National Academy of Science, **98**, 741-746.
- Yoo, T.H., Park, C.J., Ham, B.K., Kim, K.J. and K.H. Paek KH (2004) *Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV-mediated but salicylate-independent resistance response in hot pepper*. *Plant Cell Physiology*, **45**, 1537-1542.
- Zhang, S., Du, H. and D.F. Klessig (1998) *Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from Phytophthora spp*. *The Plant Cell*, **10**, 435-449.
- Zhang, S., Liu, Y. and D.F. Klessig (2000) *Multiple levels of tobacco WIPK activation during induction of cell death by fungal elicitors*. *The Plant Journal*, **23**, 339-347.
- Zhou, J. and P.B. Goldsbrough (1994) *Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **6**, 875-884.
- Zhou, F., Menke, F.L.H., Yoshioka, K., Moder, W., Shirano, Y. and D.F. Klessig (2004) *High humidity suppress ssi4-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and defense gene expression*. *The Plant Journal*, **39**, 920-932.

## **CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA COMO RESPUESTA A LOS HOMOGENEIZADOS DE *P. capsici* Leonian**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

La respuesta de defensa de las plantas a los patógenos es un conjunto de mecanismos inducidos por moléculas que secretan los patógenos o que forman parte de la estructura de los mismos o de la célula vegetal. Éstas son reconocidas por receptores celulares (Nimchuck *et al.*, 2003), desencadenando una serie de mecanismos de transducción de señales (Apel y Hirt, 2004; Bouché *et al.*, 2005; Ligterink *et al.*, 1997; Meijer y Munnik, 2003) que tienen como resultado la modificación de la expresión génica (Kim y Zhang, 2004).

De manera general, en *C. annuum* se sabe que durante la respuesta de defensa a virus (*Tobacco mosaic virus*, TMV), bacterias (*X. campestris*) y oomicetos (*P. capsici*), se induce la actividad y la acumulación de transcritos correspondientes a proteínas PR, incluyendo a las  $\beta$ -1,3-glucanasas (Egea *et al.*, 1996; Egea *et al.*, 1999; Candela *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1997; Kim y Hwang, 1997), PR1 (Candela *et al.*, 1993), PR2 (Candela *et al.*, 1993), PR3 (Candela *et al.*, 1993), PR4 (Park *et al.*, 2001), PR10 (Jung y Hwang, 2000; Shin *et al.*, 2001) y PR16 (Park *et al.*, 2004). Además de los genes PR, se ha demostrado la expresión diferencial de transcritos de otros genes en respuesta al TMV, al comparar la interacción compatible y la incompatible (Shin *et al.*, 2001). Dentro de éstos se han encontrado inhibidores de proteinasas (Shin *et al.*, 2001), una transferasa de lípidos (Park *et al.*, 2002), una proteína de pared celular (Shin *et al.*, 2003), una ornitina descarboxilasa (Yoo *et al.*, 2004), una 2-oxoglutarato cinasa (Kim *et al.*, 2005a), una piruvato cinasa citosólica (Kim *et al.*, 2005b) y peroxidasas (Alcázar *et al.*, 1995; Egea *et al.*, 2001).

En trabajos sobre la interacción entre *C. annuum* y *X. campestris* pv. *vesicatoria*, se ha demostrado que durante la respuesta de defensa se induce la

expresión de genes como la osmotina, la transferasa de lípidos y las  $\beta$ -1,3-glucanasas, entre otros (Jung y Hwang, 2000). También se reportó la inducción del gen de una proteína de unión a quitina (Lee *et al.*, 2001), genes PR como las quitinasas, PR1 y PR10 (Lee y Hwang, 2005), factores de transcripción (Kim *et al.*, 2004), ciclooxigenasas (Kim *et al.*, 2002) y marcadores de la resistencia sistémica adquirida (Lee y Hwang, 2003).

En *C. chinense* no se conoce si existen modificaciones en la expresión génica durante su interacción con los patógenos, incluyendo a *P. capsici*. En este trabajo se demostró la inducción de los sistemas de defensa en células en suspensión de *C. chinense* por los CWH, y la activación de dos MAPK. En otras especies, las MAPK activan factores de transcripción, como los WRKY (Kim y Zhang, 2004; Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004), que participan en diferentes procesos celulares, incluyendo la respuesta de defensa (Eulgem *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2006), regulando la señalización (Li *et al.*, 2006) y activando genes de defensa (Eulgem *et al.*, 2000). Existen reportes de la inducción de la expresión de WRKY en *C. annuum* durante la respuesta de defensa contra el TMV y *X. campestris* (Park *et al.*, 2006), indicando que es probable que en *C. chinense* se modifique su expresión.

El objetivo de este capítulo fue determinar si los CWH modifican la expresión de genes de defensa. Los resultados obtenidos mostraron la expresión diferencial de algunos genes, por ejemplo, la expresión de genes PR entre otros, mientras que los niveles de transcritos de genes relacionados con el estrés oxidativo disminuyeron.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de la expresión diferencial se realizó mediante hibridación (Northern blot reverso), para lo cual se clonaron las secuencias de genes relacionados con la respuesta de defensa, utilizando dos estrategias: mediante la

síntesis de una biblioteca de ADNc o la clonación dirigida utilizando cebadores degenerados.

#### **4.2.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA DE ACTINA Y OTROS GENES DE DEFENSA DE *C. chinense*.**

El ARN fue extraído como se describe a continuación: Se pulverizó 0.1 g de tejido congelado con nitrógeno líquido y se colocó en un tubo con 1 mL de TRIZOL®, se incubó durante 10 min, y se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se le agregaron 100 µL de la mezcla de cloroformo:isoamílico (24:1), se agitó con vórtex durante 30 segundos y se centrifugó 10 min a 4 °C a 12000 x g. Se colocó el sobrenadante en un tubo limpio, se le agregó un volumen de isopropanol frío y se incubó durante 30 min a -80 °C. Se centrifugó a 22000 x g durante 20 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla fue lavada dos veces con etanol al 70 %, centrifugando durante 10 min a 4 °C y 22000 x g en cada uno. La pastilla se secó a temperatura ambiente durante 15 min y se resuspendió en agua con DEPC (dietilpirocarbonato) (Chomczynski y Sachi, 1987).

El aislamiento del ADNc de la actina, WRKY y NPR1 de *C. chinense* se realizó mediante ensayos de RT-PCR con cebadores específicos. El ARN utilizado para la amplificación consistió en una mezcla del ARN total de cultivos celulares tratados con 90 meq glucosa·mL<sup>-1</sup> durante diferentes tiempos (15 y 24 horas).

La amplificación de la secuencia de actina y de los genes de defensa fue realizada bajo las mismas condiciones que se utilizaron para MAPK. La ligación, la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α y la verificación de la presencia del inserto fue verificada de la misma manera que para las MAPK (sección 3.2.3.2-3.2.3.5).

#### **4.2.2 SÍNTESIS DE LA BIBLIOTECA DE ADNc DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *C. chinense*.**

Para la síntesis de la biblioteca se utilizó el protocolo "Smart cDNA Synthesis kit" (Clontech). Para ello, se tomaron 2 µg del ARN total tratado con

DNasa I, y se colocó en la premezcla para PCR (dNTPs 2 mM, cebador CDS III/ 3' (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGACATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3') 2 μM). Se mezcló utilizando un vórtex, se incubó a 72 °C durante 2 min, se enfrió en hielo y se centrifugó nuevamente para colectar el contenido en el fondo del tubo. Posteriormente, se agregó una solución que contenía el cebador "Smart" (5' -3'), 100 unidades de transcriptasa reversa, dNTP 2 mM, DTT 200 μM y el amortiguador para la síntesis de la primera cadena (Tris-HCl 5 mM, pH 8.3; MgCl<sub>2</sub> 0.6 mM; KCl 75 mM). Los tubos fueron incubados a 42 °C durante 60 min y se colocaron en hielo para terminar la reacción. Se tomó 1 μL del producto y se le agregaron los siguientes componentes: el amortiguador "Advantage PCR2" (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7.5), la mezcla de dNTP 0.2 mM, el cebador 5' (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 0.4 μM, el cebador CDS III/3' (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGACATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3') 0.4 μM, y 2 μL de la solución de "Polymerase Advantage". Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C durante 1 min y 20 ciclos de 15 seg a 95 °C seguidos de 6 min a 68 °C.

El producto fue tratado con Proteinasa K a 45 °C durante 20 min. La proteínasa fue eliminada con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y el ADN se precipitó con 10 μL de acetato de sodio 3 M, 1.3 μL de glucógeno (20 μg·mL<sup>-1</sup>) y 260 μL de etanol al 95 %. La pastilla se lavó con etanol al 80 % y se resuspendió en agua desionizada.

Para su ligación en el vector, el ADNc se digirió previamente con 200 unidades de la enzima *Sfi I* a 50 °C durante 2 horas con 10 μL del amortiguador para *Sfi I* (Tris-HCl 600 μM (pH 7.5), NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 600 μM y DTT 100 μM), y 0.5 μg de BSA acetilada.

Antes de la ligación, el ADNc se fraccionó por tamaños en columnas Chroma Spin-400, con el fin de eliminar ADNc menores de 400 pb. Para ello, se dejó la columna a temperatura ambiente durante 1 hora antes de utilizarla, se resuspendió la mezcla por inversión y se removieron las burbujas de aire. Se abrió la columna para dejar fluir el amortiguador de almacenamiento, cuando terminó de

salir por goteo, se le agregaron 700  $\mu\text{L}$  del amortiguador de columna. A continuación, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla del ADNc digerido con *Sfi I*, permitiendo la absorción de la mezcla, se agregaron 700  $\mu\text{L}$  del amortiguador de columna y se colectaron las fracciones por separado. El tamaño del ADN contenido en las fracciones fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.1 %; las fracciones con ADN de más de 600 pb se colocaron en un solo tubo y se precipitaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche con 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3M), 1.3  $\mu\text{L}$  de glucógeno ( $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y 2.5 volúmenes de etanol frío al 95%. Al día siguiente se centrifugó y se retiró el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 7  $\mu\text{L}$  de agua desionizada.

La eficiencia de la ligación varía dependiendo de la relación inserto-vector. Debido a que el ADN con el que se cuenta es muy poco para ser cuantificado, se recomienda hacer reacciones de ligación que contengan diferentes proporciones inserto-vector. Por esta razón se realizaron cuatro reacciones de ligación, colocando por separado 4 volúmenes diferentes de ADNc (0.5  $\mu\text{L}$ , 1.0  $\mu\text{L}$ , 1.5  $\mu\text{L}$  y 2.5  $\mu\text{L}$ ) con una mezcla que contenía 500 ng de vector, el amortiguador de ligación (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, cloruro de magnesio 10 mM, DTT 10 mM y BSA  $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), ATP (1 mM) y ADN ligasa T4 (200 unidades). Cada reacción de ligación se manejó de manera independiente. Los tubos se incubaron durante toda la noche a  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Al cabo de ese tiempo, se empaquetó por separado cada una de las ligaciones en cápsidas virales mediante extractos comerciales del fago  $\lambda$  y se tituló la biblioteca.

#### **4.2.2.1 TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE ADNc**

Para la titulación de la biblioteca, se tomó una alícuota de la cepa LE 392 de *E. coli*, se sembró masivamente en medio de cultivo LB sólido con  $\text{MgSO}_4$  10 mM, y se cultivó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente, se aisló una colonia y se cultivó en 7 mL de medio LB líquido con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y maltosa al 0.2 %. Se tomaron 140  $\mu\text{L}$  del cultivo de toda la noche y se cultivó hasta una  $\text{OD}_{600} = 0.8$ . Se

tomaron 100  $\mu\text{L}$  de diferentes diluciones de la biblioteca ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$ ) y se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  del cultivo bacteriano, se incubó a 37 °C durante 15 min y se transfirió la mezcla a un tubo conteniendo 3 mL de medio de cultivo LB conteniendo  $\text{MgSO}_4$  10 mM y agar al 7.5 %. Se mezcló suavemente y se vació en cajas petri con medio de cultivo LB conteniendo  $\text{MgSO}_4$  10 mM y agar al 15%. Las cajas petri fueron incubadas invertidas a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se contaron las placas de lisis.

La amplificación de la biblioteca de ADNc fue realizada sembrando los fagos de la misma manera que se realizó para la titulación, pero se utilizaron cajas de Petri grandes. Posteriormente se colectaron los fagos añadiendo amortiguador SM (Tris-HCl 35 mM, pH 7.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mM, NaCl 100 mM y gelatina al 2 %) a las cajas con las placas de lisis e incubando durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación a 50 rpm. Se colectaron el líquido sobrenadante conteniendo los fagos en un tubo estéril y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 11,000 x g durante 10 min. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo estéril y se tituló la biblioteca nuevamente, como se realizó anteriormente. Finalmente, se almacenó con DMSO al 7 % a -80°C, hasta su uso.

#### **4.2.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE ADNc**

Una vez amplificada, se realizó la caracterización de la biblioteca, evaluando mediante PCR el tamaño promedio de los insertos contenidos en las placas de lisis de cada una de las reacciones de ligación, elegidas al azar. Las placas de lisis fueron colectadas con una punta cortada en el extremo y los fagos fueron eluidos del trozo de agar con 500  $\mu\text{L}$  de medio SM conteniendo 25  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4 °C, para colectar el sobrenadante que contenía los fagos, y se almacenó con DMSO al 7% a -20 °C.

Posteriormente, se hizo una amplificación por PCR de los insertos contenidos en 25 clonas tomadas aleatoriamente de cada placa de lisis, empleando cebadores universales y parámetros estándar. Las clonas fágicas con insertos de 900 pares de bases o más fueron convertidas en plásmidos mediante la transfección de cada fago en la cepa BM25.8 de *E. coli*. Para realizarlo, la cepa bacteriana se sembró en medio de cultivo LB sólido durante toda la noche a 31 °C. Al día siguiente, se picó una colonia aislada de cada caja petri y se sembró en 10 mL de medio de cultivo LB hasta que alcanzó una densidad óptica entre 1.1 y 1.4 a 600 nm con luz visible. Entonces se agregó cloruro de magnesio hasta una concentración final de 10 mM, se mezcló y se colocaron 200  $\mu$ L del cultivo en tubos eppendorf (aproximadamente 60 tubos, uno por cada placa de lisis), se adicionaron entonces 150  $\mu$ L de los fagos eluidos, y se incubó a 30 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se agregaron 400  $\mu$ L de medio de cultivo LB y se dejó incubar a la misma temperatura durante una hora. Por último, se sembró masivamente en LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y agar al 15 %, se dejó crecer durante aproximadamente 8 horas, para luego picar dos colonias de cada caja para extraer el plásmido mediante absorción con sílica. Se determinó el tamaño de los insertos mediante PCR y se enviaron a secuenciar.

#### **4.2.3 ANÁLISIS DE NIVELES DE TRANSCRITOS**

El análisis de expresión génica diferencial se realizó mediante Northern blot reverso, utilizando ADNc como sonda. El ARN fue extraído como se describió en la sección 3.3.4.5. La síntesis del ADNc del ARN de células tratadas y control se llevó a cabo como se indica en la sección 4.2.2, pero marcándolo con digoxigenina.

La membrana, que contenía los productos de PCR de cada una de las secuencias, se colocó en la solución de hibridación (amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM, pH 8.0 y albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %) durante 1 hora para la prehibridación. La hibridación se realizó durante al menos 12 horas en la misma solución, agregando la sonda marcada. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente con SSC 2 X,

seguidos de tres lavados de 20 min con SSC 2 X a 65° C, un lavado de 30 min con SSC 0.5 X a 65° C, un lavado de 30 min con SSC 0.2 X a 65° C, un lavado de 30 min con SSC 0.1X a 65° C. La membrana se equilibró durante 1 min en la solución de lavado 3 (100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl pH 7.5 y Tween 20 al 0.3 %), se bloqueó con la misma solución adicionada con leche descremada al 5% durante 1 hora, y después se incubó con el anticuerpo diluido 1:10,000 en la solución de bloqueo. Se equilibró la membrana con la solución de detección (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM), se le agregó CSPD (Roche®) y finalmente, se detectó mediante exposición a una película fotosensible.

## 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

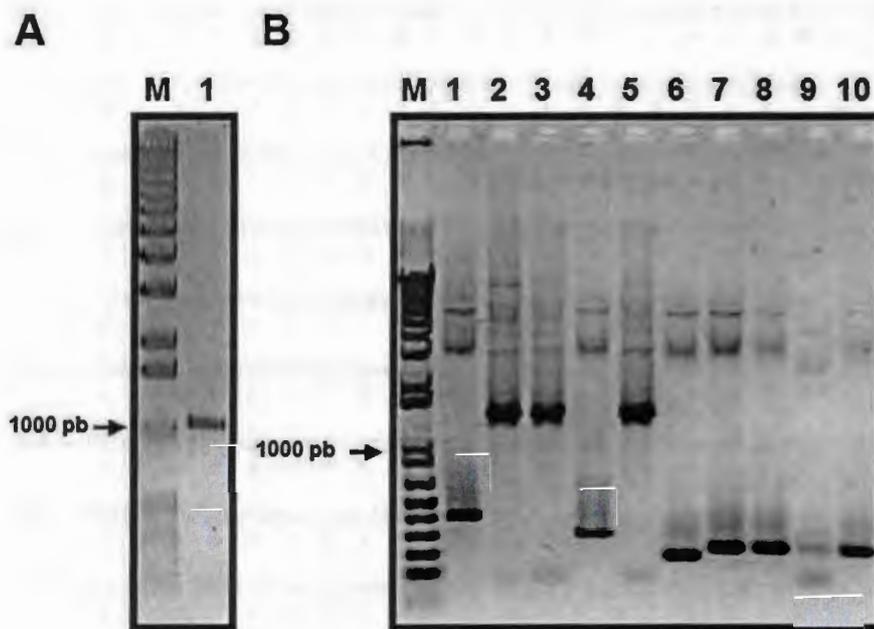
Los resultados que se muestran a continuación incluyen la clonación de la secuencia de actina de cultivos celulares de *C. chinense*, la cual se utilizó como un control de carga de RNA en las hibridaciones, la síntesis y la caracterización de la biblioteca de ADNc de células en suspensión de *C. chinense*, el análisis de las secuencias obtenidas a partir de ésta, y el análisis de los efectos de la adición de CWH de *P. capsici*, sobre los niveles de transcrito de las clonas seleccionadas.

### 4.3.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA DE ACTINA DE *C. chinense*

La síntesis del ADNc se realizó mediante RT-PCR, utilizando cebadores degenerados. En la figura 4.1 se observa la secuencia de eventos de la clonación, solamente se muestra la clonación de la secuencia de actina (los mismos pasos se siguieron para la clonación de WRKY y NPR1, de aproximadamente 1500 y 1600 pb, respectivamente).

En el panel A se observa la presencia de una banda de aproximadamente 1000 pb, esta fue purificada y ligada en el vector pGEM T-Easy. El producto de la ligación fue introducido en células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, y los

plásmidos recombinantes obtenidos se muestran en el panel B. La verificación del tamaño de los insertos mediante PCR mostró que tres de las clonas contenían insertos de aproximadamente 1,300 pb, debido a que para la amplificación por PCR se emplearon cebadores universales M13, lo que incrementa el tamaño de cualquier inserto en aproximadamente 300 pb. Las demás clonas se desecharon.



**Figura 4.1** Clonación del ADNc de la actina de *C. chinense*. A: Amplificación mediante RT-PCR del fragmento de actina de *C. chinense*. M: escalera de 1 kb, 1: Producto del RT-PCR. B: Verificación de la presencia y del tamaño de los insertos contenidos en los plásmidos mediante PCR. M: Escalera de 1 kb, 1 a 10: Producto de PCR de los plásmidos contenidos en 10 colonias.

Una de las clonas se envió a secuenciar y los datos indicaron que se trata de una secuencia de 873 pb, que codifica un fragmento de 308 aminoácidos (Figura 4.2). La identidad de la secuencia fue determinada mediante su comparación por el método Blast (en la página WEB de la NCBI) con secuencias reportadas en bancos de datos (EMBL y Genbank). Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple

de la secuencia deducida de aminoácidos con las reportadas para otras especies (Figura 4.3).

```

1 - TTGGCAGATGCTGAGGATATTC AACCTCTCGTCTGTGACAATGGAACAGGAATGGTTAAG - 60
  - L A D A E D I Q P L V C D N G T G M V K

61 - GCTGGATTGCTGGAGATGATGCCCAAGGGCTGTCTTCCCTAGCATTGTGGGACGTCCT - 120
  - A G F A G D D A P R A V F P S I V G R P

121 - CGTCACACTGGTGTGATGTTGGCATGGGCCAGAAAGATGCGTATGTTGGTGACGAGGCT - 180
  - R H T G V M V G M G Q K D A Y V G D E A

181 - CAATCCAAAAGGGGTATTTGACTTTGAAATATCCAATGAACATGGTATTGTTAGCAAC - 240
  - Q S K R G I L T L K Y P I E H G I V S N

241 - TGGGATGACATGGAGAAGATTGGCATCATACCTTTTACAATGAACTTCGTGTGGCTCCA - 300
  - W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P

301 - GAGGAGCACCCAGTCTCCTCACAGAAGCTCCTTAACCCAAAAGCCAATCGAGAGAAG - 360
  - E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K

361 - ATGACTCAGATCATGTTTGAAACCTTCAACACCCCTGCCATGTATGTTGCAATTCAGGCC - 420
  - M T Q I M F E T F N T P A M Y V A I Q A

421 - GTCCTTTCCCTCTATGCCAGTGGACGTACAACCTGGAATTGTGCTGGATTCTGGAGATGGT - 480
  - V L S L Y A S G R T T G I V L D S G D G

481 - GTCAGCCACACAGTTCCTCATATGAAGGTTATGCCCTCCCACACGCAATCCTGCGTCTT - 540
  - V S H T V P I Y E G Y A L P H A I L R L

541 - GATCTGGCAGGGCGTGATCTCACAGATCACCTCATGAAGATTCTCACGGAAGAGGTTAC - 600
  - D L A G R D L T D H L M K I L T E R G Y

601 - TCTTTCACCACCACAGCCGAGCGGAAATGTTAGGGATGTGAAGGAGAAGCTGTCTTAC - 660
  - S F T T T A E R E I V R D V K E K L S Y

661 - ATTGCTCTTGACTATGAACAAGAACTTGAACAGCAAAGACCAGCTCATCCGTGGAGAAG - 720
  - I A L D Y E Q E L E T A K T S S S V E K

721 - AGCTACGAGCTTCTTGATGGACAGGTATCACCATTGGTGCTGAGCGATTCCGTTGCCCT - 780
  - S Y E L P D G Q V I T I G A E R F R C P

781 - GAAGTGCTGTTC AACCATCAATGATCGGAATGGAAGCTGCTGGTATTTCATGAAACCACA - 840
  - E V L F Q P S M I G M E A A G I H E T T

841 - TACAATCCATCATGAAGTGTGACGTTGATATC - 873
  - Y N S I M K C D V D I

```

Figura 4.2 Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcACT, que corresponde a un segmento del transcrito de actina de *C. chinense* (AM168448).

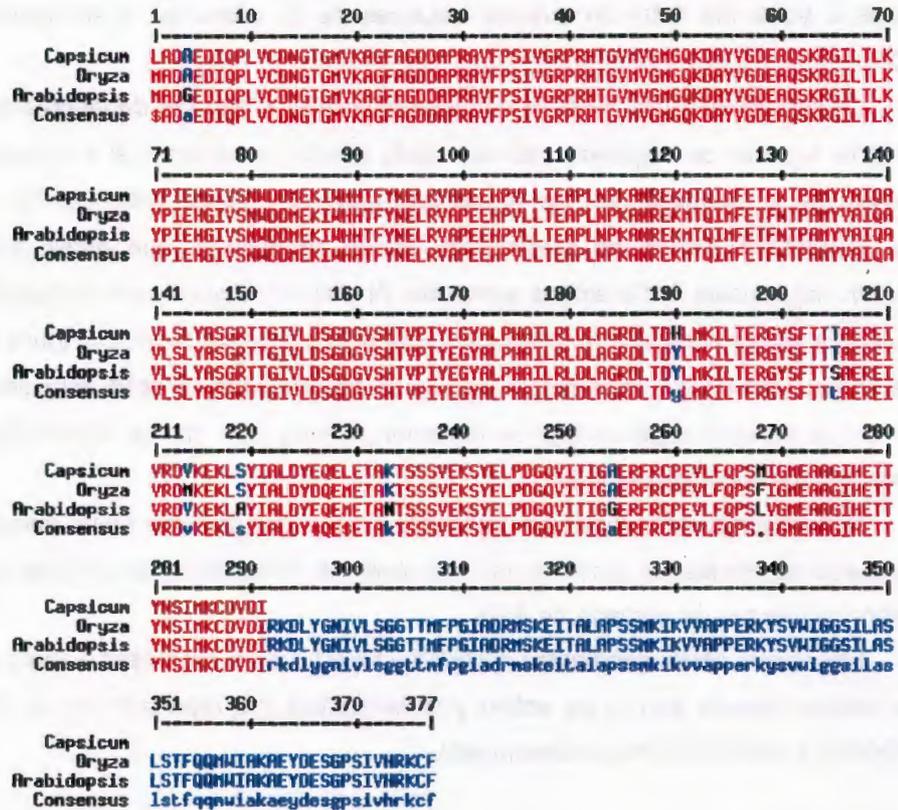


Figura 4.3 Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la actina de *C. chinense*. La secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcACT (AM168448) fue alineada con las secuencias deducidas de *Arabidopsis thaliana* (NM112046) y de *Oryza sativa* (AB047313) (Corpert, 1988).

Comparada con la secuencia de actina de *Phaseolus acutifolius* (AY338231), el porcentaje de identidad fue del 86% y el valor E de 0.0. Con la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (NM\_112046) tiene un 84 % de identidad y el valor E es de 0.0. Respecto a la secuencia de *Oryza sativa* (AB047313) tiene valores similares (Altschul *et al.*, 1997). Estos datos indican que la secuencia de ADNc obtenida en el presente trabajo corresponde a un gen de actina, que fue

obtenida a partir del ARN de cultivos celulares de *C. chinense*, y se denominó CcACT.

La secuencia CcACT no está completa debido a que los cebadores están diseñados a partir de regiones internas. Esto puede observarse al comparar la secuencia de nucleótidos con las reportadas para *A. thaliana* (NM112046) y *O. sativa* (AB047313) (datos no mostrados), donde se observa que éstas últimas presentan secuencias hacia ambos extremos. Al obtener la secuencia deducida de aminoácidos no se encontró la metionina inicial ni el codón de término (Figura 4.2), que al compararla con la secuencia deducida de aminoácidos de otras especies, se observó que aunque el porcentaje de identidad es muy alto, posee diferencias en algunos aminoácidos (Figura 4.3).

Sin embargo, esta región es suficiente para poder utilizarla como sonda en los ensayos de hibridación para lo cual fue obtenida. Esta clona será usada como indicador del control de cargado de ARN.

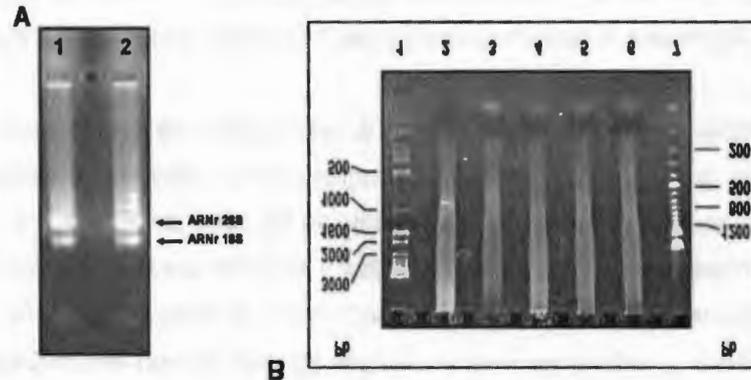
Las clonas correspondientes a WRKY y NPR1 fueron obtenidas y analizadas de la misma manera que la de actina y la secuencia fue reportada en la EMBL (AM900560 y AM900559, respectivamente).

#### **4.3.2 OBTENCIÓN DE SONDAS HOMÓLOGAS DE GENES DE DEFENSA**

La clonación de genes de defensa se realizó mediante la síntesis de una biblioteca de ADNc y su posterior escrutinio utilizando la estrategia de secuenciación masiva aleatoria. La biblioteca de ADNc de células en suspensión de *C. chinense* se sintetizó mediante la tecnología Smart® Clontech.

El primer requisito para la síntesis de una biblioteca de ADNc, es el de obtener una muestra de ARN de alta calidad. Se ha determinado empíricamente que al fraccionar por electroforesis en geles de agarosa, en una muestra íntegra de ARN la banda del ARN 28S presenta una brillantez mayor que la del ARN 18S, mientras que en una muestra degradada, además de un barrido a lo largo de todo el carril, ocurre una disminución de la intensidad del ARN 28S. En la Figura 4.4A puede observarse un fraccionamiento electroforético de dos muestras de ARN total

extraído de las células en suspensión de *C. chinense*. De esta manera, se confirmó el ARN tenía la calidad suficiente para emplearse como sustrato en la síntesis de la biblioteca de ADNc.



**Figura 4.4 Síntesis de la biblioteca de ADNc.** A. Evaluación de la calidad del ARN para la síntesis de la biblioteca de ADNc. Muestras de 2  $\mu\text{L}$  de ARN total extraído de células en suspensión de *C. chinense* fueron fraccionados mediante electroforesis nativa en gel de agarosa y teñidos con 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. 1 y 2: ARN total de dos extracciones independientes. Las flechas señalan la posición de los ARN ribosomales 28S y 18S. B. ADNc sintetizado a partir de ARN de diferentes especies, incluyendo *C. chinense*. Una alícuota de la amplificación por PCR del ADNc de células en suspensión de *C. chinense* fue fraccionada por electroforesis nativa en gel de agarosa y teñida con 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. 1: escalera de ADN de 1 Kb; 2: ADNc de células HeLa (control positivo); 3: ADNc de *C. chinense*; 4: ADNc de *Malus domestica*; 5: ADNc de *Trametes* sp.; 6: ADNc de *Mycosphaerella fijiensis*; 7: escalera de ADN de 100 pb.

El siguiente paso consistió en la síntesis del ADNc, mediante la tecnología Smart®. En esa tecnología se hace uso de un cebador adaptador que se alinea en el extremo 5' de la primera cadena de ADNc cuando todavía está unida al ARN mensajero templado, permitiendo la extensión del ADNc y garantizando que únicamente los ADNc completos puedan ser amplificados por PCR.

En la figura 4.4B (carriles 1 y 2) se observa que el ADNc sintetizado tiene un tamaño comprendido entre los 200 pb y mayores de 10 Kb, observándose además bandas discretas correspondientes a ARN transcritos mayoritarios. La población de

ADNc incluye muestras de diferentes tamaños, incluyendo muchos menores de 400 pb; mientras que existen transcritos pequeños en la célula, es probable que algunos de los productos menores de 500 pb sean ADNc inconclusos o productos inespecíficos. Por esa razón, el siguiente paso fue el fraccionamiento de la población total de ADNc mediante una cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephacryl S-400, descartando las fracciones con tamaños menores de 500 pb.

El ADNc aparece desde la fracción 9, pero a partir de las fracciones 13 y 14 el tamaño de la población disminuye, mientras que a partir de la fracción 15 el tamaño de todos los productos está por debajo de los 1000 pb (Figura 4.5).

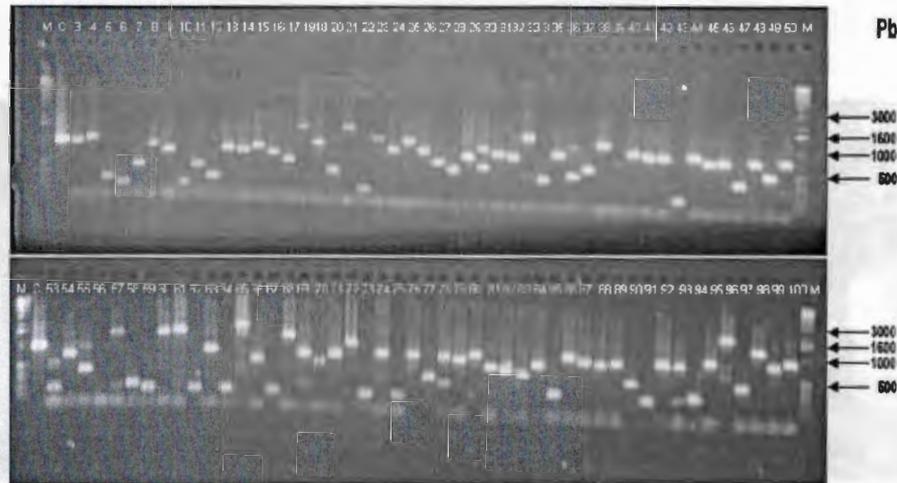
Las fracciones 9 a 12 fueron reunidas y el ADNc fue cortado con la enzima *Sfi* I (que corta en los adaptadores de los extremos). El ADNc digerido fue ligado al vector  $\lambda$ TriplEx2, y diferentes reacciones de ligación fueron empaquetadas con extractos de lambda. Finalmente, el título de la biblioteca fue de  $1.4 \times 10^6$  ufp·mL<sup>-1</sup>. La biblioteca se caracterizó analizando el tamaño de 25 placas de lisis de cada ligación, mediante PCR utilizando los cebadores de secuenciación del plásmido pTriplEX2.



**Figura 4.5** Fraccionamiento del ADNc por cromatografía de exclusión molecular. Una alícuota de las fracciones obtenidas al fraccionar el ADNc total en una columna de Sephacryl S-400, fueron fraccionadas por electroforesis nativa en gel de agarosa y teñidas con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. 1 y 20: escalera de ADN de 1 Kb; 2 a 19: fracciones obtenidas al lavar la columna con el amortiguador de elución. La línea discontinua con doble flecha representa la migración de 1000 pb de la escalera de ADN.

El tamaño promedio de los insertos analizados de la biblioteca de ADNc fue de 900 pares de bases (Figura 4.6).

La determinación del tamaño de los insertos se realizó inicialmente mediante su liberación con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Bam* HI; sin embargo, en algunos casos se obtuvieron dos o tres bandas de diferente tamaño, lo cual indica que las secuencias contenían sitios internos de reconocimiento para una o ambas enzimas, cortándola en dos o más fragmentos. Por esta razón, en lo sucesivo este análisis se realizó mediante PCR. Los insertos fueron enviados a secuenciar y las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLAST para determinar su identidad (Cuadro 1).



**Figura 4.6** Tamaño promedio de los insertos de la biblioteca de ADNc de *C. chinense*. Los productos de PCR de diferentes clones con cebadores universales, fueron fraccionados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Se muestran las clones 3 a 100 de un total de 100 placas de lisis analizadas. M: escalera de ADN de 1 Kb.

A partir de esta biblioteca de ADNc, se analizaron 300 placas de lisis, 50 de las cuales fueron enviadas a secuenciar. Todas contenían ADNc completos, incluyendo las regiones 5' y 3' no traducibles de 36 secuencias diferentes. La mayoría de las secuencias tiene identidad con genes que en otras especies han mostrado relación con la respuesta de defensa contra diferentes tipos de estrés (Cuadro 1). Las secuencias se reportaron en el banco de datos de la EMBL (ver anexo I).

#### 4.3.2.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Para determinar la identidad de las secuencias, se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos (datos no mostrados), como se muestra en la sección anterior para actina (Cuadro 1).

A pesar de que los cultivos celulares se encuentran bajo condiciones controladas, se obtuvieron secuencias de genes inducidos como respuesta a diferentes tipos de estrés (Park *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003), como las metalotioneínas (Ozturk *et al.*, 2002). Esto sugiere que los cultivos de *C. chinense* podrían presentar niveles basales de estos genes.

En general, las secuencias tienen similitud con secuencias de Solanaceas, incluyendo a las especies *Lycopersicon esculentum*, *C. annuum*, *Solanum* spp. y *Nicotiana tabacum*. El menor porcentaje de identidad fue del 70 %, y lo presentó una omega-6 desaturasa (AJ879069), al ser comparada con una secuencia de *N. tabacum* (AAT72296). El mayor porcentaje de identidad (98%) lo presentó una de las cinco proteínas PR10 (aún no reportada en la EMBL) con la correspondiente secuencia reportada para *C. annuum* (AF244121). Se obtuvieron 5 secuencias de PR10 (AJ879115, AJ878871 y 3 no reportadas), 2 metalotioneínas (AJ879116 y AJ879063) y 2 omega-6 desaturasas (AJ879071 y AJ879071).

**Cuadro 4.1. Identidad de los ADNc obtenidos a partir de una biblioteca de ADNc de células en suspensión de *C. chinense*.**

EMBL	PROTEÍNA	Valor E	IDENTIDAD	ESPECIE
AJ879117	ACC oxidasa*	0.0	92 %	<i>S. tuberosum</i> AY098939
AJ879118	Poliubiquitina	0.0	92 %	<i>C. annuum</i> AY489136
AJ879119	Esterasa*	0.0	97 %	<i>C. annuum</i> AF072533
AJ879936	Posible receptor	3e-83	72 %	<i>Oryza sativa</i> XP_469710
AJ879121	GST1*	1e-172	87 %	<i>S. commersonii</i> AF002692
AJ879115	PR10 (1)*	1e-172	90 %	<i>C. annuum</i> AY829648
AJ879116	Metalotioneína	1e-146	96 %	<i>C. annuum</i> AY488882
AJ879120	DEA1	8e-121	89 %	<i>L. esculentum</i> AY509122
AJ879070	Proteína conjugada a ubiquitina	8e-146	88 %	<i>N. tabacum</i> AB026056
AJ879063	Metalotioneína*	8e-173	97 %	<i>C. annuum</i> AY829650
AJ879062	Proteína de pared celular (1)*	1e-168	96 %	<i>C. annuum</i> AF242730
AJ879069	$\Omega$ -6 desaturasa	2e-171	70 %	<i>N. tabacum</i> AAT72296
AJ879064	V ATPasa*	7e-161	94 %	<i>S. tuberosum</i> DQ284486
AJ879065	Transportador ABC*	1e-82	81 %	<i>Populus nigra</i> AB041505
AJ879071	$\Omega$ -6 desaturasa *	1e-119	71 %	<i>N. tabacum</i> AAT72296
AJ879072	Proteína tipo extensina	6e-12	85 %	<i>Glycine max</i> AAM75351

EMBL	PROTEÍNA	Valor E	IDENTIDAD	ESPECIE
AJ879066	Peroxidasa aniónica*	2e-171	86 %	<i>S. tuberosum</i> M21334
AJ879067	GST/peroxidasa*	0.0	87 %	<i>L. esculentum</i> AF193439
AJ878871	PR10 (TSI1)*	1e-101	89 %	<i>S. virginianum</i> AY660753
AJ879068	L37a	4e-36	95 %	<i>O. sativa</i> NP_916930
AJ973135	Glutación peroxidasa*	0.0	92 %	<i>N. tabacum</i> AB041518
AM040266	Proteína 14-3-3*	0.0	90 %	<i>S. tuberosum</i> Y11687
AM040273	Proteín que responde a etileno*	1e-76	76 %	<i>O. sativa</i> XP_467394
AM040268	Malato deshidrogenasa citosólica	0.0	95 %	<i>S. tuberosum</i> DQ294258
AM040269	Alcohol deshidrogenasa	0.0	96 %	<i>S. tuberosum</i> X53242
AM040271	GST12*	6e-05	82 %	<i>Glycine max</i> AF243367
AM040274	Proteína dedo de zinc	2e-42	66 %	<i>A. thaliana</i> AM62942
AM040272	Proteína de pared celular (3)*	2e-156	94 %	<i>C. annuum</i> AF242730
AM040267	Proteína inducida por fosfato (phi-1)*	9e-164	87 %	<i>N. tabacum</i> AB018441
AM040275	ORF1	3e-08	85 %	<i>E. gunnii</i> CT981654
AM040276	Proteína que interactúa con actina	6e-104	74 %	<i>A. thaliana</i> CAB16815
AM040277	Factor de replicación	3e-72	50 %	<i>A. thaliana</i> AAM61372
AM040278	Proteína inducida por auxinas	6e-85	89 %	<i>L. esculentum</i> AAZ20313

EMBL	PROTEÍNA	Valor E	IDENTIDAD	ESPECIE
NR	PR10 (3)*	0.0	98 %	<i>C. annuum</i> AF244121
NR	PR10 (4)*	3e-170	90 %	<i>C. annuum</i> AY829648
NR	PR10*	6e-159	89 %	<i>C. annuum</i> AY829648
NR	Tin1-2	3e-176	90%	<i>C. annuum</i> AF480414
NR	ORF	0.0	99 %	<i>L. esculentum</i> mRNA
NR	Inhibidor de proteinasa 1B	7e-40	74 %	<i>N. tabacum</i> Q03199
NR	ATPasa	2e-112	84 %	<i>S. tuberosum</i> DQ235180
NR	Proteína ribosomal	0.0	85 %	<i>Petunia</i> <i>axilaris</i> AF479174

\*NR: No reportada.

#### 4.3.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

La hibridación diferencial se desarrolló como se describe en la sección de Materiales y Métodos. En total se analizaron 48 genes, de los cuales 42 fueron obtenidos a partir de la biblioteca de ADNc y el resto mediante RT-PCR dirigido (como se describió para la secuencia de actina en la sección 4.2.1). En el cuadro 4.2 se detalla la posición de cada clona individual en las membranas de nylon. Como se mencionó, cada una de las dos membranas fue hibridada independientemente con las sondas DIG-H<sub>2</sub>O o DIG-CWH, y las señales de la hibridación fueron comparadas de acuerdo con su posición. Los resultados se muestran en la Figura 4.8, en donde se observa que efectivamente, en algunas de las clonas blanco se modificaron los niveles de transcrito por efecto de la adición de los CWH de *P. capsici* a las células en suspensión de *C. chinense*.

Los genes cuyos niveles de expresión se incrementaron incluyen principalmente genes PR, específicamente de la familia de las PR10, las cuales son ribonucleasas que han sido estudiadas en otros modelos (Park *et al.*, 2004).

Se han identificado más de 100 miembros de la familia de las PR10, los cuales se encuentran distribuidos en dos grupos. Los genes que se analizaron en este proyecto pertenecen al grupo de las ribonucleasas que se caracterizan por ser intracelulares (Liu y Ekramoddoullah, 2006). Las secuencias obtenidas en este proyecto presentan alta homología con la reportada en *C. annuum*, y al igual que ésta, cuatro de ellas presentan el dominio característico de las ribonucleasas (Park *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las PR10 proveen de resistencia a las plantas mediante su actividad antifúngica (Chadha y Das, 2006), antiviral y mediante la inhibición del crecimiento de *P. capsici in vitro* (Park *et al.*, 2004).

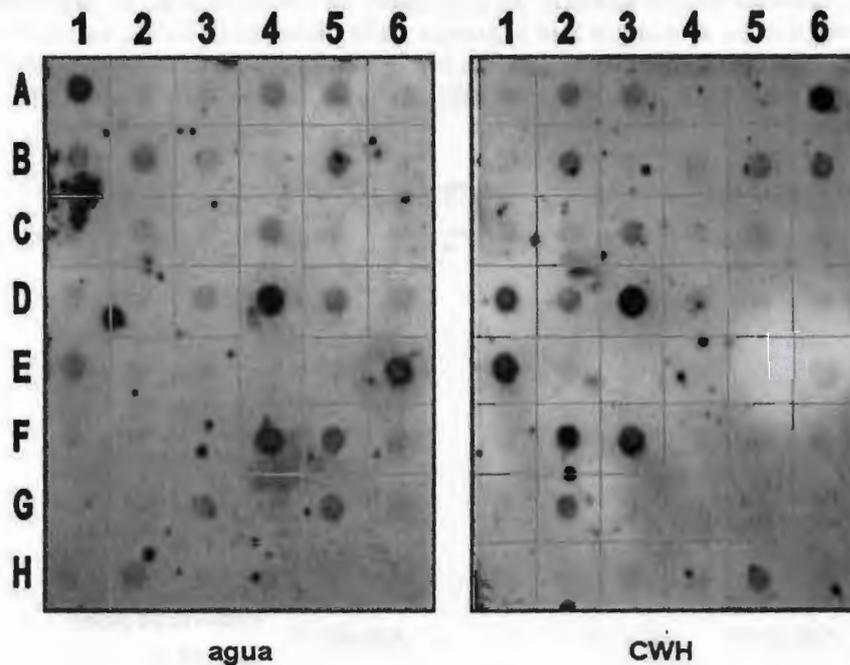
Además de su actividad, se ha observado la modificación de la expresión como respuesta a diferentes tipos de estrés (Liu y Ekramoddoullah, 2006) en *O. sativa*, *C. annuum*, *Pinnus monticola*, entre otros. En estos trabajos se ha observado que la expresión de PR10 se incrementa como respuesta a hongos (Hahimoto *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). En *C. annuum* se observó la inducción de su expresión como respuesta al Tobacco mosaic virus (Park *et al.*, 2004).

**Cuadro 4.2** Identidad de los ADNc de *C. chinense* transferidos a las membranas de nylon.

		CÓDIGO	IDENTIDAD	CÓDIGO	IDENTIDAD
		A1	ACC oxdasa	D6	Prot. respuesta a etileno
		A2	Polubiquitina	E1	PR putativa
		A3	Esterasa	E2	Malato deshidrogenasa
		A4	Proteína asociada	E3	Alcohol deshidrogenasa
		A5	Glutatión-S-transferasa	E4	GST 12
		A6	PR10	E5	Proteína con dedo de zinc
		B1	Metaloioneína 1	E6	Proteína pared celular 3
		B2	Enz. Induc. araquidónico.	F1	Proteína Phi-1
		B3	Enz. Conjug. de ubiquitina	F2	Proteína hipotética
		B4	Metaloioneína 2	F3	PR putativa
		B5	Proteína de pared celular	F4	Oxidasa ligada a FAD
		B6	omega-6 desaturasa 1	F5	Factor de replicación A
		C1	ATPasa	F6	Proteína inducida auxinas
		C2	Transportador ABC	G1	Actina
		C3	omega-6 desaturasa 2	G2	MAP cinasa 1
		C4	Proteína tipo Extensina	G3	MAP cinasa 2
		C5	Peroxidasa aniónica	G4	MAP cinasa 3
		C6	GST/peroxidasa	G5	Ornitina descarboxiasa
		D1	PR putativa	G6	WRKY
		D2	Proteína ribosomal 60S	H1	NPR1
		D3	PR putativa	H2	ATPasa
		D4	Glutatión peroxidasa	H3	Inducida por TMV
		D5	14-3-3	H4	Proteína hipotética 2
				H5	Inhibidor de proteinasas

	1	2	3	4	5	6
A	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●



**Figura 4.7** Los CWH de *P. capsici* modifican la expresión génica en células en suspensión de *C. chinense*. Aliquotas idénticas de los productos de PCR de cada clona fueron fijadas por duplicado en membranas de nylon e hibridadas independientemente con sondas de ADNc sintetizadas a partir de ARN de células control (H<sub>2</sub>O) o inducidas durante 15 y 24 h (*P. capsici*). La reacción fue revelada mediante detección no isotópica y las membranas fueron expuestas a una película fotosensible y reveladas.

El orden en el cual se colocaron las muestras en las membranas, se muestra en el cuadro 4.2, y el resultado de la hibridación con los ADNc se muestra en la figura 4.8.

**Cuadro 4.3 Resultados del análisis de expresión de las clonas de *C. chinense*.**  
 En la columna que se encuentra a la izquierda de la clave de la EMBL se indica si hubo incremento (+) o disminución (-) de los niveles de transcritos como respuesta a los CWH. Aquéllas que no tienen ningún símbolo no se modificaron por el tratamiento.

*	EMBL	GEN	*	EMBL	GEN
-	AJ879117	ACC oxidasa	+	NR	PR10 (4) Malato
+	AJ879118	Poliubiquitina		AM040268	deshidrogenasa citosólica
+	AJ879119	Esterasa*		AM040269	Alcohol deshidrogenasa
-	AJ879936	Posible receptor		AM040271	GST12
-	AJ879121	GST1		AM040274	Proteína dedo de zinc
+	AJ879115	PR10 (1)	-	AM040272	Proteína de pared celular (3) inducida por fosfato
-	AJ879116	Metalotioneína		AM040267	(phi-1)
	AJ879120	DEA1	+	AM040275	ORF1
	AJ879070	Conjugada a ubiquitina	+	NR	PR10
	AJ879063	Metalotioneína	-	AM040276	Oxidasa ligada a FAD
	AJ879062	Proteína de pared celular (1)*	-	AM040277	Factor de replicación
+	AJ879069	$\Omega$ -6 desaturasa		AM040278	Proteína inducida por auxinas
	AJ879064	V ATPasa		AM168448	Actina
	AJ879065	Transportador ABC	+	AJ608158	MPK1

*	EMBL	GEN	*	EMBL	GEN
+	AJ879071	$\Omega$ -6 desaturasa	-	AJ608159	MPK2
	AJ879072	Proteína tipo extensina		AJ608160	MPK3
+	AJ879066	Peroxidasa aniónica	-	NR	Omitina descarboxilasa
	AJ879067	GST/peroxidasa		AM900560	WRKY
+	AJ878871	PR10 (TSI1)		AM900559	NPR1
+	AJ879068	L37a		NR	ATPasa
+	NR	PR10 (3)		NR	Inducida por TMV
-	AJ973135	Glutatión peroxidasa		NR	Proteína hipotética 2
-	AM040266	Proteína 14-3-3	+	NR	Inhibidor de proteinasas
-	AM040273	Proteína que responde a etileno			

NR: No reportada en la base de datos.

Las proteínas PR, que son inducidas durante la infección por patógenos, son características de las interacciones incompatibles donde la planta es resistente al patógeno. Existen 17 familias que pertenecen a este tipo de proteínas, dentro de las que se encuentran las PR10, que tienen similitud con ribonucleasas y con ciertos alérgenos encontrados en las plantas. No han sido bien estudiadas, pero existen evidencias de su importancia en la resistencia de *C. annuum* contra el *Tobacco mosaic virus* (TMV) por su actividad de ribonucleasa (Park *et al.*, 2004). Otra evidencia importante del papel de estas proteínas en la resistencia contra patógenos fue proporcionada por el mismo grupo de investigación mediante la transformación ectópica de plantas de *C. annuum* con un miembro de la familia PR10, a quien nombraron TSI1. La sobreexpresión aumentó la resistencia de las plantas a un amplio espectro de patógenos, incluyendo al *Pepper mild mottle virus* (PMMV) y al *Cucumber mosaic virus* (CMV), así como también a la bacteria *Xanthomonas*

*campestris* pv. *vesicatoria* y a oomicetos como *P. capsici* (Shin *et al.*, 2002). Como ya se mencionó, las proteínas PR son inducidas durante una infección por patógenos, y debido a la importancia que éstas poseen en la resistencia de plantas de *C. annuum*, es muy probable que en *C. chinense* también sean las responsables de la resistencia contra patógenos, por lo que son buenos candidatos para determinar la respuesta del cultivo celular a la infección.

Los resultados obtenidos indican que como respuesta al tratamiento con CHW, en las células en suspensión se induce la expresión de los genes PR10 (Cuadro 4.3). Este gen se ha estudiado en *C. annuum*, donde el incremento en los niveles de transcritos de PR10 se observa 6 días después de la inoculación del TMV en plantas resistentes al virus y a partir de las 8 h de la infección de *C. annuum* resistentes a *X. campestris* (Park *et al.*, 2002). En las células en suspensión se detectó el incremento en los niveles de expresión en una mezcla de ARN de tejido tratado durante 15 y 24 horas, por lo que su acumulación fue en tiempos más cortos que los observados en plantas de *C. annuum* (Park *et al.*, 2002).

Las esterases se han asociado con la inhibición de la formación del apresorio de *C. gloesporoides* en *C. annuum*. En este modelo se observó que al sobreexpresarla protege a los frutos de la infección por este patógeno (Kim *et al.*, 2001). En los cultivos celulares se indujo la expresión de este gen como respuesta a la adición de los CWH, por lo que es probable que participe durante la respuesta de defensa de *C. chinense* contra *P. capsici*.

Las peroxididasas participan durante la explosión oxidativa de la respuesta de hipersensibilidad, catalizando la reducción de peróxido de hidrógeno en agua (Carpin *et al.*, 1999), y están asociadas con la acumulación de lignina (Hilaire *et al.*, 2001) y la suberización que evitan que el patógeno infecte el resto de la planta (Bernards *et al.*, 1999). En los cultivos celulares tratados con los CWH se observó un ligero incremento en la expresión del gen que codifica esta enzima; sin embargo, no se descarta su papel en la defensa de *C. chinense*, debido a que existe una explosión oxidativa en los cultivos celulares como respuesta al tratamiento (Capítulo

2), es posible que no se haya detectado la modificación en los transcritos por los tiempos en los que se evaluó este parámetro.

Los inhibidores de proteinasas también se han asociado con la respuesta a estrés. En *C. annuum* se ha demostrado que sus niveles de ARNm se incrementan como respuesta a estrés abiótico (Kim *et al.*, 2001), mientras que en este trabajo se demostró que en *C. chinense* se induce su expresión como respuesta a estrés biótico.

La 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACC oxidasa) es una enzima que participa en el último paso de la ruta de biosíntesis del etileno. El etileno es importante en la respuesta de defensa de las plantas al estrés biótico, ya que es sintetizado durante las interacciones incompatible y compatible. Se ha observado que cuando las plantas poseen una deficiencia en la vía de señalización por etileno son más susceptibles o más resistentes al ataque por patógenos, dependiendo de la planta y el patógeno del que se trate (Johnson y Ecker, 1998; Ohume-Takagi *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los niveles de ARN mensajero de la ACC oxidasa se ven afectados 24 horas después de la inoculación de tubérculos de papa con *Fusarium eumartii* y por el tratamiento con ácido indol acético (Zanetti *et al.*, 2002). A diferencia de lo que se ha reportado, los resultados obtenidos en este trabajo, indican que los niveles de expresión de la ACC oxidasa disminuyen, por lo que es probable que el etileno no se acumule en los cultivos celulares durante la inducción.

La glutatión S-transferasa es una enzima que participa en la detoxificación celular durante la explosión oxidativa, y es importante en el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida, ya que las especies reactivas de oxígeno actúan como señales e inducen la expresión de genes de defensa en sitios lejanos a la infección (Apel y Hirt, 2004). En sitios cercanos a la infección están relacionadas con la inducción de la muerte celular característica de la respuesta de hipersensibilidad, difundiéndose a células cercanas al sitio necrosado e induciendo genes de defensa involucrados en la protección celular (Apel y Hirt, 2004; Levine *et al.*, 1994; Mellersh *et al.*, 2002). La expresión de la GST se induce durante la respuesta a estrés tanto biótico como abiótico, ya sea de manera específica a alguno de estos o de manera

generalizada, y se sabe que su principal regulación es a nivel transcripcional (Dixon, *et al.*, 2002). En los cultivos celulares se observó que los niveles de transcritos de los genes relacionados con la explosión oxidativa disminuyen como respuesta al tratamiento.

Una proteína de pared celular de *C. annuum* fue estudiada por Shin y colaboradores en el 2003, quienes demostraron su relación con la respuesta de hipersensibilidad inducida específicamente durante la infección con el virus mosaico del pepino (CMV). La expresión de este gen se induce tanto local como sistémicamente durante la infección con la variante no virulenta del TMV, a diferencia de la infección con bacterias, y en las respuestas al etileno, al ácido salicílico y al jasmonato de metilo entre otros, pero lo más relevante fue que su sobreexpresión aumenta la resistencia a la infección por CMV y al TMV (Shin *et al.*, 2003). Se clonaron tres secuencias de proteínas de pared celular, en cuanto a la expresión de estos, solamente una de ellas se modificó, disminuyendo sus niveles de ARNm en los cultivos tratados con los CWH.

#### 4.4 CONCLUSIONES

Se sintetizó una biblioteca de ADNc de *C. chinense*, la cual posee un título de  $1.4 \times 10^6$  ufp·mL<sup>-1</sup>, con un tamaño promedio de insertos 900 pb. A partir de ella, se clonaron 42 ADNc de genes de *C. chinense*, de los cuales la mayoría se han relacionado con la respuesta de defensa a diferentes tipos de estrés.

Se demostró que la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa se modifica como respuesta a los homogeneizados de *P. capsici* en células en suspensión de *C. chinense*.

#### 4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcázar, M.D., Egea, C., Espín, A. and M.E. Candela (1995) *Peroxidase isoenzymes in the defense response of Capsicum annuum to Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*, **94**, 736-742.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.
- Apel, K. and H. Hirt (2004) *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction*. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373-399.
- Bernards, M.A., Fleming, W.D., Llewellyn, D.B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A. and G.L. Plourde (1999) *Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato*. *Plant Physiology*, **121**, 135-145.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A. and H. From (2005) *Plant specific calmodulin binding proteins*. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 435-466.
- Carpin, S., Crèvecoeur, M., Greppin, H. and C. Penel (1999) *Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini*. *Plant Physiology*, **120**, 7999-810.
- Chadha, P. and R.H. Das (2006) *A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity*. *Planta*, **225**, 213-222.
- Chomczynski, P. and N. Sachi (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.
- Corpet, F. (1988) *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. *Nucleic acids Research*, **16**, 10881-10890.
- Dixon, D.P., Laphorn, A. and R. Edwards (2002) *Plant glutathione transferases*. *Genome Biology* 3: reviews 3004.1-3004.10
- Egea, C., Alcázar, M.D. and M.E. Candela (1996)  *$\beta$ -1,3-glucanase and chitinase as a pathogenesis-related proteins in the defense reactin of two Capsicum annuum cultivars infected with Cucumber mosaic virus*. *Biologia Plantarum*, **38**, 437-443.
- Egea, C., Ahmed, A.S., Candela, M. and M.E. Candela (2001) *Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, **158**, 151-158.
- Egea, C., Dickinson, M.J., Candela, M. and M.E. Candela (1999)  *$\beta$ -1,3-glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (Capsicum annuum) cultivars infected with Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*, **107**, 312-318.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and I.E. Somssich (2000) *The WRKY superfamily of plant transcription factors*. *Trends in Plant Science*, **5**, 199-206.
- Ferl, R.J. (1996) *14-3-3 proteins and signal transduction*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 49-73.
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S and Koshiba T (2006) *A novel rice PR10 protein , RsOsPR10, specifically induced in rots by biotic*

- and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiology* **45**, 550-559.
- Hilaire, E., Young, S.A., Willard, L.H., McGee, J.D., Sweat, T., Chittor, J.M., Guikema, J.A. and J.E. Leach (2001) *Vascular defense response in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **14**, 1411-1419.
- Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim, Y.J. and B.S. Kim (1997) *Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici**. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **51**, 305-322.
- Johnson, P.R. and J.R. Ecker (1998) *The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective*. *Annual Review of Genetics*, **32**, 227-254.
- Jung, H.W. and B.K. Hwang (2000) *Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria**. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**, 136-142.
- Lee, S.C. and B.K. Hwang (2002) *Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stress in *Capsicum annuum**. *Planta*, **216**, 387-396.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and C. Lamb (1994) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response*. *Cell*, **79**, 583-593.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K.M. and X. Yu (2003) *Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold hardening*. *Physiologia Plantarum* **119**, 544-553.
- Liu, J.J. and A.K.M. Ekramoddoullah (2006) *The family 10 of plant pathogenesis-related proteins. Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **68**, 3-13.
- Kim, Y.J. and B.K. Hwang (1997) *Isolation of a basic 34 kiloDalton  $\beta$ -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **50**, 103-115.
- Kim, S., Hong, Y.N., An, C.S. y K.W. Lee KW (2002) *Expression characteristics of serine proteinase inhibitor II under variable environmental stress in hot pepper (*Capsicum annuum* L.)*. *Plant Science*. **161**, 27-33.
- Kim, Y.C, Yi, S.Y., Mang, H.G., Seo, Y.S., Kim, W.T. and D. Choi (2002) *Pathogen-induced expression of cyclo-oxygenase homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* cv. *Pukang*)*. *Journal of Experimental Biology*, **53**, 383-385.
- Kim, S.H., Hong, J.K., Lee, S.C., Sohn, K.H., Jung, H.W. and B.K. Hwang (2004) *CaZFP1, Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub>-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in *Capsicum annuum**. *Plant Molecular Biology*, **55**, 883-904.
- Kim, C.Y. y S. Zhang (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.

- Kim, K.J., Park, C.J., An, J.M., Ham, B.K., Lee, B.J. and K.H. Paek (2005a) *CaAlaAT1 catalyzes the alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper*. *Planta*, **221**, 857-867.
- Kim, K.J., Park, C.J., Ham, B.K., Choi, S.B., Lee, B.J. and K.H. Paek (2005b) *Induction of a cytosolic pyruvate kinase 1 gene during the resistance response to Tobacco mosaic virus in Capsicum annuum*. *Plant Cell Report*, **25**, 359-364.
- Lee, S.C., Kim, Y.J., and B.Y. Hwang (2001) *A pathogen-induced chitin binding protein gene from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding*. *Plant Cell Physiology*, **42**, 1321-1330.
- Lee, S.C. and B.K. Hwang (2005) *Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in Capsicum annuum*. *Planta*, **221**, 790-800.
- Li, J., Brader, G. and T. Palva (2004) *The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense*. *The Plant Cell*, **16**, 319-331.
- Li, J., Brader, G., Kariolaa, T. and E.T. Palva (2006) *WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense*. *The Plant Journal*, **46**, 477-491.
- Ligterink, W., Kroj, T., Nieden, U., Hirt, H. and D. Scheel (1997) *Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense in plants*. *Science*, **276**, 2054-2057.
- Liu, Y., Schiff, M. and S.P. Dinesh-Kumar (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.
- Meijer, H.J.G. and T. Munnick (2003) *Phospholipid based signalling in plants*. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 265-306.
- Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J. and M.C. Heath (2002) *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions*. *The Plant Journal*, **29**, 257-268.
- Ozturk, Z.M., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., and H.J. Bohnert (2002) *Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley*. *Plant Molecular Biology*, **48**, 551-573.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G., Yoo, T.H. and K.H. Paek (2001) *A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. *Molecules and Cells*, **11**, 122-127.
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., You, J.S. and K.H. Paek (2002) *Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to Tobacco mosaic virus*. *Plant Molecular Biology*, **48**, 243-254.
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C. and K.H. Paek (2002) *Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway*. *The Plant Journal*, **37**, 186-198.

- Park, C.J., An, J.M., Shin, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J. and K.H. Paek (2004) *Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection*. *Planta*, **219**, 797-806.
- Park, C.J., Shin, Y.C., Lee, B.J., Kim, K.J., Kim, J.K. and K.H. Paek (2006) *A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and Xanthomonas campestris*. *Planta*, **223**, 168-179.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W. and K.H. Paek (2001) *Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and characterization of proteinase inhibitor gene*. *Plant Science*, **161**, 727-737.
- Shin, R., Park, C.J., An, J.M. and K.H. Paek (2003) *A novel TMV-induced hot pepper cell wall protein gene (CaTin2) is associated with virus-specific hypersensitive response pathway*. *Plant Molecular Biology*, **51**, 687-701.
- Xu, X., Chen, G., Fan, B. and Z. Chen (2006) *Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors*. *The Plant Cell*, **18**, 1310-1326.
- Yoo, T.H., Park, C.J., Ham, B.K., Kim, K.J. and K.H. Paek (2004) *Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV-mediated but salicylate-independent resistance response in hot pepper*. *Plant Cell Physiology*, **45**, 1537-1542.
- Zanetti, M.E., Terrile, M.C., Arce, D., Godoy, A.V., Segundo, B.S., and C. Casalongué (2002) *Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated stress*. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2455-2457.

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue determinar si en cultivos celulares de *C. chinense* se establecen los sistemas de defensa como respuesta a *P. capsici*.

Una característica importante de la respuesta de defensa en los cultivos celulares es el oscurecimiento (García-Pérez *et al.*, 1998). Esto se observó en los cultivos de *C. chinense* como respuesta a *P. capsici*, lo cual probablemente está asociado a la muerte celular como respuesta al tratamiento.

En este trabajo se demostró que al inducir los cultivos celulares con 60, 90 y 120 meq glucosa  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, se presenta una alcalinización del medio de cultivo. También se determinaron los niveles de actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, observándose modificaciones en los patrones de actividad a las 12 y 24 horas del tratamiento. Además, se demostró la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular y extracelular en los cultivos celulares como respuesta al tratamiento. En conjunto, estas evidencias sugieren que los homogeneizados de *P. capsici* inducen los sistemas de defensa de *C. chinense*.

La presencia de MAPK activadas como respuesta a los CWH sugiere que esta vía de transducción podría estar involucrada en el establecimiento de la respuesta de defensa (Zhang y Klessig, 2001). Mediante ensayos de cinasa en gel e inmunodetección, se demostró que no existen MAPK activadas en las células en suspensión cultivadas bajo condiciones normales, pero que la adición de diferentes concentraciones de homogeneizados de *P. capsici* provoca la activación de dos MAPK de alrededor de 43 y 44 kDa, respectivamente. Los ensayos de inmunodetección se revela, de manera adicional y con menor intensidad, la presencia de una banda de alrededor de 43 kDa, la cual presenta el mismo comportamiento que la banda de 44 kDa. En otros trabajos se ha demostrado que las MAPK se activan como consecuencia del reconocimiento específico de moléculas derivadas de *Phytophthora*, como los glucanos (Daxberger *et al.*, 2007), por lo que es probable que la activación observada se deba a los componentes de la

pared de *P. capsici*. Existen reportes de que las MAPK se activan como respuesta al incremento de los niveles del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Desikan *et al.*, 1999; Neill *et al.*, 2002); sin embargo, posteriormente se demostró que esta activación de MAPK es independiente de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Desikan *et al.*, 2001). En las células en suspensión la mayor diferencia en los niveles del peróxido de hidrógeno se observó una hora después de la inducción, y la actividad de las MAPK se detecta desde los 5 minutos, por lo que es probable que esta actividad no sea debido al incremento en los niveles del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino que ocurra de manera independiente en respuesta al tratamiento con los CWH. Las modificaciones en los niveles de transcritos como respuesta a los homogeneizados de *P. capsici* sugieren la presencia de dos MAPK que se regulan a nivel transcripcional durante la respuesta de defensa. Con los resultados obtenidos no es posible determinar si las MAPK que se activan como respuesta al tratamiento son las mismas que las que se expresan diferencialmente; sin embargo, se puede decir que en *C. chinense*, la regulación de las MAPK como respuesta a los CWH se presenta a nivel transcripcional y postraducciona, como sucede en *N. tabacum* (Song y Goodman, 2002).

Se obtuvieron las secuencias de genes que se han relacionado con la respuesta de defensa en otras especies vegetales, incluyendo *C. annuum* (Park *et al.*, 2000). El análisis de los niveles de transcritos de los genes obtenidos mostró cambios en la mayoría de ellos. Estas modificaciones incluyeron el incremento o disminución en los niveles de transcritos. Los resultados son la primera evidencia de la inducción de la expresión de los genes PR (PR10) como respuesta a *P. capsici*. Se sabe que la proteína PR10 posee actividad antimicrobiana y se ha demostrado mediante bioensayos, que ésta limita el crecimiento de *P. capsici in vitro* (Park *et al.*, 2002). Por los antecedentes y los resultados obtenidos, es posible que este gen sea fundamental en la limitación del crecimiento de *P. capsici* en *C. chinense*. Es importante determinar el papel de PR10 durante la infección de plantas de *C. chinense* con *P. capsici*, porque debido a su actividad antimicrobiana, podría ser utilizado para el mejoramiento de *C. chinense*, ya que además de su efecto sobre el

crecimiento de *P. capsici*, también se ha demostrado que disminuye los niveles de partículas del TMV en *C. annuum* (Park *et al.*, 2002).

Por los trabajos realizados en otras especies vegetales (Kim y Zhang, 2004; Kroj *et al.*, 2003), es probable que las MAPK estén regulando la modificación en la expresión génica observada; sin embargo, con los resultados obtenidos no es posible determinar si existe alguna relación.

Este trabajo presenta las primeras evidencias de los eventos a diferentes niveles (bioquímicos y moleculares) que se llevan a cabo en cultivos celulares de *C. chinense* durante la respuesta de defensa inducida por *P. capsici*, los cuales incluyen la alcalinización del medio de cultivo, la activación de proteínas PR ( $\beta$ -1,3-glucanasas), la explosión oxidativa (acumulación de  $H_2O_2$ ), la activación de las MAPK y la modificación de la expresión génica.

## **CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

Los homogeneizados de *P. capsici* inducen el establecimiento de los sistemas de defensa en células en suspensión de *C. chinense*, los cuales se caracterizan por el incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno intra- y extracelular, la alcalinización del medio de cultivo, la activación de MAPK y de  $\beta$ -1,3-glucanasas, y la modificación de la expresión génica.

Los resultados obtenidos en este proyecto serán la base para el desarrollo de futuros trabajos encaminados a entender la respuesta de defensa de *C. chinense* ante patógenos, utilizando como modelo de estudio las células en suspensión, debido a que se comprobó que en este sistema es posible inducir la respuesta de defensa.

La síntesis de la biblioteca de ADNc también es una herramienta importante en el estudio de la interacción planta-patógeno, ya que permite obtener secuencias completas de genes de *C. chinense* y utilizarlos para transformar plantas con la finalidad de entender la función de cada uno de ellos, o para la transformación de plantas para su mejoramiento genético. La mayoría de los genes secuenciados hasta el momento, están relacionados con la respuesta de defensa, por lo que son candidatos importantes para el mejoramiento genético de esta especie. La mayor parte de la biblioteca de ADNc sintetizada no ha sido secuenciada, por lo que será una fuente para la obtención de genes de *C. chinense*. Actualmente, se están realizando trabajos encaminados a establecer los protocolos para la transformación de *C. chinense* con algunos de los genes clonados.

Se demostró que la expresión de PR10 se modifica como respuesta al tratamiento con paredes de *P. capsici*; sin embargo, no se determinaron los niveles de transcritos a través del tiempo, por lo que es necesario realizar trabajos futuros para determinarlos. De la misma manera es necesario analizar los niveles de los transcritos de cada uno de los genes clonados, porque es probable que se modifiquen en los tiempos no evaluados.

Se demostró que las MAPK se activan y que los niveles de transcritos de dos MAPK se modifican como respuesta a la inducción. Una vez demostrada la activación de MAPK, el siguiente paso es determinar los componentes de esta vía de transducción y sus proteínas blanco, con la finalidad de entender los mecanismos mediante los que se activa la respuesta de defensa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Daxberger, A., Nemark, A., Mithöfer, A., Flieggmann, J., Ligterink, W., Hirt, H. and J. Ebel (2007) *Activation of members of a MAPK module in  $\beta$ -glucan elicitor-mediated non-host resistance of soybean*. *Planta*, **225**, 1559-1571.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K. and S.J. Neil (1999) *Hairpin 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 S. Neil (2001) *Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6*. *Plant Physiology*, **126**, 1579-1587.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., and R. Edwards (2002) *Plant glutathione transferases*. *Genome Biology*, **3**, 1-10.
- Kim, C.Y. y S. Zhang (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.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and D. Scheel (2003) *Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 2256-2264.
- Neill, S.J., Deshikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and J.T. Hancock (2002) *Hydrogen peroxide and nitric oxide signaling molecules*. *Journal of experimental botany*, **53**, 1237-1247.
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C. and K.H. Paek (2002) *Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway*. *The Plant Journal*, **37**, 186-198.
- Song, F. and R.M. Goodman (2002) *OsBIMK1, a rice MAP kinase involved in disease resistance responses*. *Planta*, **215**, 997-1005.
- Zhang, S. and D.F. Klessig (1998) *Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by Tobacco mosaic virus infection*. *Proceedings of the National Academy of Science*, **95**, 7433-7438.
- Zhang, S. and D. Klessig (2001) *MAPK cascades in plant defense signalling*. *Trends in Plant Science*, **6**, 520-527.

**ANEXO I: SECUENCIAS DE LOS ADNc DE C. chinense  
CLONADOS**

**MPK1 (AJ608158)**

1 - GGTGCTACGGCATTGTTTCTCTGCTTGAACCTCGGAGCAAAATGAAATGTAGCAATA - 60  
1 - G A Y G I V C S R L N S E T M E N V A I - 20  
61 - AAAAAAGTTGCTAATGCTTTTGACACAGATTGATGCCAAGAGGACTTTGAGAGAGATC - 120  
21 - K K V A N A F D N K I D A H R T L R E I - 40  
121 - AAGCTTCTCGGCMFEGSATCATGAANCATTTGCGATCAGAGATATTAATTCACGG - 180  
41 - K L L R E M D H E N I V A I R D I I P P - 60  
181 - CCACAAAGAGAAGCCTTAATGATGTTTATATCGCATATGAGCTTATGGATACTGATCTC - 240  
61 - P Q R E A F N D V Y I A Y E L M D T D L - 80  
241 - CATCAAATTAATTCGCTCGAATCAGGCTTTATCCGAGGAGCAGTCCAGTATTTCTGTAT - 300  
81 - H Q I I R S N Q A L S E E H C Q Y F L Y - 100  
301 - CAGATCCTCGTGGGTTGAATACATACATCTGCAATGTTTTCACAGAGACTTAAAF - 360  
101 - Q I L R G L K Y I H S A N V L H R D L K - 120  
361 - CCTAGCAATCTTCTTGAATGCCBACTGTSATTTAAAGATAATGATTTTGGGCTAGCT - 420  
121 - P S N L L L N A N C D L K I C D F G L A - 140  
421 - CGTGTCACTCCGAACTGACTTTATGACCGAATATGTTGTACAGATGSTATCGTCCA - 480  
141 - R V T S E T D F M T E Y V V T R W Y R P - 160  
481 - CCTGAGCTGTGTTAAATTCGTCGGACTATAGTSCAGCAATGATGTTTGGTCAGTGGT - 540  
161 - P E L L L M S S D Y T A A I D V W S V G - 180  
541 - TGCATGTTTC - 549  
181 - C M F X - 200

MPK2 (AJ608159)

1 - GGTGCTACGGAAATCGTTTGCCTCGGTTGAATTCGGAGACGAATGAACATGTTGCGATA - 60  
 1 - G A Y G I V C S A L N S E T N E H V R I - 20  
 61 - AAAAAAATGCTAATGCTTTGACAAACAGATTGATGCCAAGAGGACTTTGAGAGAGATC - 120  
 21 - K K I A N A F D N K I D A K R T L R E I - 40  
 121 - AAGCTTCTTCGGCATAATGGATCATGAAAACATTGTTGGGATCAGAGATAAATTCACCG - 180  
 41 - K L L R H M D E E N I V A I R D I I P P - 60  
 181 - CCACAAAGAGAAAGCCTTTAATGATGTTTATATCGCATATGAGCTTATGGATACTGATCTC - 240  
 61 - P Q R E R F N D V Y I A Y E L M D T D L - 80  
 241 - CATCAAAATTAATTCGCTCAATCAGGCTTTATCGGAGGAGCACTGCCAGTATTTCTTGAT - 300  
 81 - H Q I I R S N Q A L S E E H C Q Y F L Y - 100  
 301 - CAGATCCTTCGTTGGTTGAAATACATACATTTGCAAAATGTTTGCACAGAGACTTAAAG - 360  
 101 - Q I L R G L K Y I E S A N V L E R D L K - 120  
 361 - CCTAGCAATCTTCTCTTGAATGCCAATGTTGATTTAAAGATATGATGATCTTGGGCTAGCT - 420  
 121 - P S W L L L N A N C D L K I C D L G L A - 140  
 421 - CGTGTCACTTCGAAACTGACTCTATGACCGAATATGTTGTGACAGATGGTATCGTCCA - 480  
 141 - R V T S E T D S M T E Y V V T R W Y R P - 160  
 481 - CCGAGCTGTTGTTAAATTCCTCCGACTATACTGCAGCAATGATGTTGGTCTGAGG - 540  
 161 - P E L L L N S S D Y T A A I D Y W S V G - 180  
 541 - - 540  
 181 - X - - 200

MPK3 (AJ608160)

1 - GGTGCTACGGAAATCGTTTGCCTCGGTTGAATTCGGAGACGAATGAACATGTTGCGATA - 60  
 1 - G A Y G I V C S A L N S E T N E H V R I - 20  
 61 - AAAAAAATGCGAATGCTTTTGATAACAAAATGATGCCAAGAGAGGACTTTGCGTGAATC - 120  
 21 - K K I A N A F D N K I D A K R T L R E I - 40  
 121 - AAGCTTCTTCGACATAATGGATCATGAAAATATTGTTGGGATCAGAGACATAATTCACCT - 180  
 41 - K L L R H M D E E N I V A I R D I I P P - 60  
 181 - CCTCAAGGGAAGCATTAAATGATGCTATATTGCATATGAGCTTATGGACTGATCTC - 240  
 61 - P Q R E R F N D V Y I A Y E L M D T D L - 80  
 241 - CATCAAAATTAATTCGCTCAATCAGGCTTTATCAGAAACATGTCAGTATTTCTTGAT - 300  
 81 - H Q I I R S N Q G L S E E H C Q Y F L Y - 100  
 301 - CAGATCCTTCGTTGGTTGAAATACATACATTTGCAAAATGTTTGCATAGGATTTGAG - 360  
 101 - Q I L R G L K Y I E S A N V L E R D L K - 120  
 361 - CCTAGCAATCTCTCTTGAATGCCAATGTTGATTTAAAGATAATGATTTTGGGCTAGCT - 420  
 121 - P S W L L L N A N C D L K I C D F R L A - 140  
 421 - CGTGTCACTTCGAAACTGACTTTATGACCGAGTATGTTGTGACAGATGGTATCGACCT - 480  
 141 - R V T S E T D E M T E Y V V T R W Y R P - 160  
 481 - CCGGAGCTGTTGTTAAATTCCTCCGACTATACTGCAGCAATGATGTTGGTCTGAGG - 540  
 161 - P E L L L N S S D Y T A A I D Y W S V G - 180  
 541 - TGCATATTC - 549  
 181 - C I F X - - 200

## ACC oxidase (A.J879117)

1 - CGCCCATGTCGCTGGTACCCCGAATTCGCCATTACGGCCGGGACATDGAACAGAG - 60  
- A P L C W Y P G I R P L R P S T L S \* R  
61 - AAACAGAAAGAGATGGAGATCCGGTAATGACATTCAGCAGCTTGAGGTGACAGAG - 120  
- K Q K K M E I P V I D F S K L E G D E R  
121 - AAGTGCACCCATGGGACTTCTCCGTCAGGCTTGTGAGAAATGGGGTTTCTTATGATAGA - 180  
- S A T M G L L R Q A C E K W G P F M I E  
181 - GAACATGGAAATGACATTTACTTGAATGACAAATGTGAGCAGCTGGTGAATCAGCATA - 240  
- W N G I D I Y L M D W V K Q L V N Q H Y  
241 - TGAGCTAACATGAGAAACGGTTCTATGAAATCAGAGGTAATCTATAGCTTACAGAAAGAA - 300  
- E A N H K K K R P Y E S E V S I S L Q K K  
301 - AGAAAATATCAGCAGCAGACTGGGAAAGCAATTCCTTTGTTGCAATCCTCCAGATTC - 360  
- E H I S H T D W E S T F F V W H R P S S  
361 - CLACTCTATGAAATCAGGCTCTCTCAAGAACTTTCAGAGCAGTAAATGCTCAAT - 420  
- H I Y E I Q S L S E E I C H V D A V I  
421 - TGATCAGCTATCAGACTTCCAGAAATCTTTCAAGATATGTGAGAACCTTGGCT - 480  
- D Q I I E L A E M I S E L M C E N I G I  
481 - AGAGAAAGATACATCAAGAAAGCAATTTCAAGAGCAGGCTCTCTGTTGAGACAA - 540  
- E K S Y I K E A F S R S K G F S V G T K  
541 - AGTGCATATATCCTCAATGTCCTGCTGATCTGCTAGGGATTCGCGAGCAGC - 600  
- V A I Y P Q C P R P D L V R G L R E N T  
601 - AGATGCTGGTATCATCTTTACTCCAGAGCAAGATTCCTGGCCITGAAATCTT - 660  
- D A S G I I L L L Q D E Q V P G L E P F  
661 - CAAGAGCGGACACTGGGTGACATTCACCTTCCAGAGCAAGCAACTTTTGTGACAT - 720  
- K D G E H W V D I S S S K N H R L P V H I  
721 - CGGTGATCAATCGGATTTGAGCAAGGGATGTATAGAGATATCAACCCGAGTAT - 780  
- G D Q I E I L S H G M Y K S I Q H R V M  
781 - GGCTGAAAAGAGGGAAATGACTTTCATTCGCCCTTTTACAAACCGAATGGTGGG - 840  
- A E K D S H R L S I A F P Y H P H G E A  
841 - CATCTTTCTCCAGCAACAGGCTCTTATGCTCTCTCAGCTAGCTTCCAGAAATATT - 900  
- I Y S P A P K I L Y P S H L R F H D Y I  
901 - GAATCTTATCCAAACCAATTTGCGAAGAAAGCCCGGAAITGAGTATGCGAAGC - 960  
- N I Y S K T K F A E K G P R P E Y A N T  
961 - ATTGCCAATGACATTGAGACTTCCCTTGAAAGTAAAGATACGCTTTCAGATTT - 1020  
- L A N G H \* R L F L E K \* G L R P P S L  
1021 - ATGCTGATCATTATCATTTGACAGATCTCTTCCCTTTTATCCCTTTTCAATTTGA - 1080  
- C L I L I I \* Q I S F P L L P F F H P E  
1081 - GAITTTTGGCTTAAATTCAGAGAGGCTAATGATATAGCTTCTTTACCATGTAA - 1140  
- I F L G \* S S K E A H V Y K L P L P C E  
1141 - GATTGCATTAAGATTTATGCTCAAGCTAGGATTCCTTGAAGAGCTGTACACTTCA - 1200  
- I A L E V Y G Q S \* D C F E K L L B L H  
1201 - CATGACCAATGACTCTTACAGGGAGCAAAABAAAABAAAABAAAABAAAABAAA - 1260  
- I D Q \* L L Q R S K K K K K K K K K K

Proteína de respuesta a etileno (AM040273)

1 - TCCTGTTGGAAATTCATGGCTATTTGGATGATAACGAGCCCAAAAATGAAAATA - 60  
 - S R W N I I G V F N M I T R R K K \* K Y  
 61 - CTCTAGCAATTTGGAGCGGACAAATTTCCACACAGGAAAACACTATGACCATGATTCG - 120  
 - L \* Q L \* A D N E P T Q E T A M T M I T  
 121 - CCAGCCTCCGAGATCTGGACGAGCTTTTTTTTTCTCCGAGAGCCGCCAATGTGTTGG - 180  
 - P S S E I W T S P P P F S G S A P L C W  
 181 - TACCCGGGAATTCGGCCATTACGGCCGGGGAGTGGTGAATGATTGAAGCGAGGTAGCG - 240  
 - Y P G I R P L R F G S G \* L I E G E Y G  
 241 - ATGGAGGCGAGTCAACCCCTGCTGATGGTACGAGTGGAGTGCAGCAGTCAACGGTTAT - 300  
 - H E G E S T L V W V A V S E S T I N G Y  
 301 - CCACATGCTTCCATTAGCAAGTAAAGAGCAATCGAGTGGACTCTTAAACAGTGGTTCGT - 360  
 - P H A S I S S K G A F E W T L W K I V R  
 361 - TCCACACCTTCGTGTTCAAACTCCCTTTCTCAATGTACAACTCCCGATGAGCAAGCT - 420  
 - S N T S G P K L L F L N V Q V P D E D G  
 421 - TTGAGCATATGGATAGCTATTTGCATCAGCTGGAGATTTCAGGGCCATGAAMACAGG - 480  
 - P E D M D S I F A S P E D P K G M K W R  
 481 - GACAGATTAGGAGACTCCATCTGGAGTCTTTTAAACCGCTGTCAAGATTTGGG - 540  
 - D K I R G L H L L E C F V W R C H E I G  
 541 - GTTCTTGTGAGCATGGACAAAGAAAGTGAATCCAGGAAATCAATTTGCCAGAGTC - 600  
 - V P C E A W T K K G D P K E I I C H E V  
 601 - AAAGCTGTACAGCCAGATCTTCTGTGGTGGTTGCCGTGGTCTGGTCCCTTTTCAGAGG - 660  
 - K R V Q P D L L V V G C R G L G P P Q R  
 661 - GTTTTGTGGGACTGTAAAGAGTTCTGTGTCAAGCATGCTGAATGCTGTGTGTATCA - 720  
 - V F V G T V S E F C V K H A E C P V V T  
 721 - ATTAAGGCACTGCAGCTGGACTCCTCAAGGCCCAAGATGATTAATTCATTTGGTGT - 780  
 - I K R S A A E T P Q D P I D D \* F I W C  
 781 - ATTTAGCCCTTCATGTTCAACAAAGCATGCATAATGATGTCTACTTGTCCAGCCGTA - 840  
 - I \* P L N Y Q R C M H I R C L L V T A \*  
 841 - AAAGATTGCGGAAATTCATTTGGTGTGTCTGTGTAGCCTATATCTGTGCTTCT - 900  
 - K D C G D P H P G A V S V A Y I C L P S  
 901 - TGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 931  
 - C \* K K K K K K K K X

PR10 (AJ879145)

1 - ACACCACAATTACATTATATTCACCTTATTATCCCTCCTCTTCTTCTTATTTCCTCTTGTTC - 60  
 - T P H Y I I F I L L S S L F L I S S L E  
 61 - AAGCCAAATTAAACAAACAACTTATGGGTATCAATACTATGCTCATGATGCCCAACC - 120  
 - K A H \* S H H I M G I W T Y A H E S T T  
 121 - ACAGTGCACCTACAGGTTGTTCAAGCTTTGGTCTTGTATCTGCAACCTTATCCCA - 180  
 - T V A P T R L F K A L V L D S D H L I P  
 181 - AAAGTATGCTGATGTTAGGGCAATGAGACTGTGATGGAATGAACCACTCAAGAG - 240  
 - K V M P D V K D I E T V D G D E T I K K  
 241 - ATGACCTTGTGAGGCTGGTCCAAATAAAGTCTTGAACACAGAGTCAATGCTGAT - 300  
 - H F V E G G P I E Y L K H K I H V V D  
 301 - GAGAAACTTGGTATGTAATATTCCTTGTGGAGGAGATGTTCTTGGAGCAATG - 360  
 - E K H L V S K Y S I V E G D V L G D H L  
 361 - GAATCAATTCCTATGAAAGCAATTTGAAGCTTCTGGAATGGAGATGATGTTGCAG - 420  
 - E S I T Y E V H F E A S G H G S C V C K  
 421 - ACAGCAGTGGTACACCAAGAGGTTATCAATGTTGTTGATGAGAGAGACCAATGTA - 480  
 - T T S E Y H T K G D H V V S E E H H V  
 481 - GGCAAGAGAGAGCCTTGCCTTCTCAGGCTGTGAGGCTTCTCTCCCAATCT - 540  
 - G E E K A I D L L E A V E A T L L A H P  
 541 - TCTGCTACGCTTAAATGAGAAAATTAATCAGATCCATACCTGAGAGTGGGCTTAT - 600  
 - S V Y A \* M H K H \* S D P Y L R S R T Y  
 601 - AATAATTAATTCGGATTTATCAATTCGTCAGAGTCCAGGAGTGGATTTTCAA - 660  
 - H N Y I R S E I H S S K V P R D \* V L Q  
 661 - TATGTCATAGCTTTTGTGAGTGTGTTCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCT - 720  
 - Y R H S L L L S Y P P F Q M Y V M E \* T  
 721 - TTCATAGAGATGGTGTACCAAGTAAATACC - 785  
 - F H K E W C I K S \* Y X

PR10 (TSH) (AJ878871)

1 - ACACCACAATTACATTATATTCACCTTATTATCCCTCCTCTTCTTCTTATTTCCTCTTGTTC - 60  
 - T P H Y I I F I L L S S L F L I S S L E  
 61 - AAGCCAAATTAAACAAACAACTTATGGGTATCAATACTATGCTCATGATGCCCAACC - 120  
 - K A H \* S H H I M G I W T Y A H E S T T  
 121 - ACAGTGCACCTACAGGTTGTTCAAGCTTTGGTCTTGTATCTGCAACCTTATCCCA - 180  
 - T V A P T R L F K A L V L D S D H L I P  
 181 - AAAGTATGCTGATGTTAGGGCAATGAGACTGTGATGGAATGAACCACTCAAGAG - 240  
 - K V M P D V K D I E T V D G D E T I K K  
 241 - ATGACCTTGTGAGGCTGGTCCAAATAAAGTCTTGAACACAGAGTCAATGCTGAT - 300  
 - H F V E G G P I E Y L K H K I H V V D  
 301 - GAGAAACTTGGTATGTAATATTCCTTGTGGAGGAGATGTTCTTGGAGCAATG - 360  
 - E K H L V S K Y S I V E G D V L G D H L  
 361 - GAATCAATTCCTATGAAAGCAATTTGAAGCTTCTGGAATGGAGATGATGTTGCAG - 420  
 - E S I T Y E V H F E A S G H G S C V C K  
 421 - ACAGCAGTGGTACACCAAGAGGTTATCAATGTTGTTGATGAGAGAGACCAATGTA - 480  
 - T T S E Y H T K G D H V V S E E H H V  
 481 - GGCAAGAGAGAGCCTTGCCTTCTCAGGCTGTGAGGCTTCTCTCCCAATCT - 540  
 - G E E K A I D L L E A V E A T L L A H P  
 541 - TCTGCTACGCTTAAATGAGAAAATTAATCAGATCCATACCTGAGAGTGGGCTTAT - 600  
 - S V Y A \* M H K H \* S D P Y L R S R T Y  
 601 - AATAATTAATTCGGATTTATCAATTCGTCAGAGTCCAGGAGTGGATTTTCAA - 660  
 - H N Y I R S E I H S S K V P R D \* V L Q  
 661 - TATGTCATAGCTTTTGTGAGTGTGTTCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCT - 720  
 - Y R H S L L L S Y P P F Q M Y V M E \* T  
 721 - TTCATAGAGATGGTGTACCAAGTAAATACC - 785  
 - F H K E W C I K S \* Y X

Omega 6 desaturasa (AJ879069)

1 - ACNCTCAACCTTGAGGCTCTAAGAAAGAGGAAABCATCCACTTATTAATCTTGAGCT - 60  
 - H S W I N A L R R E N H I Q L I H L E L  
 61 - TTCGGATGACCAAAATGGAGCAGGTGGCAATATGAGTCTCTAGCAGCTAAGATGG - 120  
 - S G L S H M S A S G H M S S P A A K N G  
 121 - AGAAAGAAAGTCACTCCAGAGAGTTCATCTCCAGGCTCCCTTACACCTGGAG - 180  
 - E K S H L G R V P S A K P P T I S D  
 181 - CGTTAGAGGCCATTCCTCTACTCTCTTCCAGCACTCTCATTCCTCTCTACTA - 240  
 - V K K A I P P E C F Q R S L I R S P Y Y  
 241 - CCTCATAGAGATCTCATATATATCTCAATTACTATATACATGACAGCCACTACTTCC - 300  
 - L I K D L I I I S I T Y Y I A A Y P P  
 301 - CTCCTTCCATACCACTACTTACCCTTGCAATGGCTGCTTACTGGTCAATCAGGCTG - 360  
 - S I P Y P L T Y L A W P A Y W V I Q G C  
 361 - TATTGACCCGAAATAAGGTCAITGGCAATGATGACGACACCAATGCTCAATGATA - 420  
 - V G T G I W V I G H E C G H G P S D Y  
 421 - CCAATGGGTAGATGACAGCCTGGCTTATCTCTCACTCTGCAATGACAGCCTCTT - 480  
 - Q W V D D T V G L I L E S A Q L T P P Y  
 481 - CTCATGGAAATAGTCACTGCTGCTACCAATGCCACCCGGTCCCTTGAATGATGA - 540  
 - S W K I S R R R H H A N T G S L E N D E  
 541 - GGCTACATCCCAGGTTAATGTCACACTTGAAGTGGTACTATCAATACTGGACACCC - 600  
 - V Y I P R P H S K L R W Y Q Y L D W P  
 601 - AGTAGGACGATAGGTACTTGCCTTATCCCTCCTCTTGGCTGGCCCTTATACTTGT - 660  
 - V G R V G V L A P T L L P A W P L Y L V  
 661 - CTTCATACTCTGGCAGGAGTACGACAGGTTACATGTCATTAATGATCAAAATGCC - 720  
 - F E I S G K K Y E R P T C H Y D P W S P  
 721 - ACTATATCTGAGCCGAGGACTACAAATCTCATCTCAAGTCCAGGCTGCTTGCAGC - 780  
 - L Y S E R E R L Q I L I S D A G V L A A  
 781 - TACTATGTTGATCGGTAGCTTGGCAAAAGGTTTACCTGGCTTGTATGATCTA - 840  
 - T Y V Z Y R V A L A H S F T H L V C I Y  
 841 - TGAGGTCCCTCTTATGAGAGGCTTATAGTGTAACTACTTTCACCTTTTGCACAC - 900  
 - G V P L L I V H G F I V L I T L H N T  
 901 - TCAGCTTCACTCCAGTATGATTTCAAGAGTGGGATTAATCAAGAGGAGCTCTAG - 960  
 - H A S L P E Y D S T S W D T L R G A S S  
 961 - CTAGGATGACAGGACTACAGGCTGCTGAGAGGCTGCTA - 1023  
 - Y G R Q R L F V C A T G V S X

Omega 6 desaturase (A.1879071)

1 - CAAAGCCTATGCTAAACTAAAGAAATCTCTTGTACTTTGAGATTCAGATTGAA - 60  
 - K A I A K T K R R S L V W F E I Q D \* T  
 61 - CAAAGTGGGTGCTGGTGGCAATAATCTACTCCACACACTAAAGCAGAGAGAGAAA - 120  
 - K W S A G G N M S T F T T K A E E K K E  
 121 - ATCTCTCGAAGMGTGCCATTTGAAAGCCTCATTTACAAATGAGTATACAGAGAG - 180  
 - S L E R Y P I S K P F P T I S D I K K A  
 181 - CTAGCCCTCCACAGCTTTGAAACGATCTCTCAATTCGTTCTGCTCTCTCTCTCTCAGG - 240  
 - I P P H C F E R S L I R S S S Y L V Q D  
 241 - ATCTCATACTTGTCTAGCTTTTATACACTTGCCTCACCTACAATCCCTGCTCTCAA - 300  
 - L I L V Y V F Y Y I A S T Y I F V L P T  
 301 - CCCGATACATACTAGCATGGCTCTTACTGAGATCTTCAAGGTTCTTTAGCACCG - 360  
 - P Y Q Y L A N P L Y W I F Q G S P S T G  
 361 - GATATGGGTGATGCCCAGAAAGCAGCATCACTCTTATGAGTACCAATGGCTGA - 420  
 - L W V I A E E C G N Q S P S D Y Q W L N  
 421 - ATGACTGTGCTGTTTGTCTCTACTCTGCACTTTACACCAATTTCTCAAGGAAAT - 480  
 - D T V G F V L H S A L L T P Y P S W K Y  
 481 - ACAGTCACTGCTGCACTAGCCAACTAAATGCTTCACTTGAAGCAAGTAAATCATGTC - 540  
 - S E R R H H A M T H S L E N D E N H V P  
 541 - CTAGCTTAAACCAACTAAAGTGGTACCCAAATTAATCAATATAATCCAATGAGAA - 600  
 - K L K T K L R W Y T K L Y I N W P V G R  
 601 - GATATTCATACTTATGTTCACTTCACTGCTGCTGCTGCTGCTTATACTATGCCATCAG - 660  
 - L P I L M F T L T A G L P L Y Y A I N V  
 661 - TAGCCGTAAAGCCCTATGAGCCCTTTGCAAGTCACTATGATCCATATAGCCCGATTACA - 720  
 - A C K F Y E R F A S H T D F Y S P I I N  
 721 - ATGACCGTGAAGACTTCAAACTCACTCTCAAGTATGAGTTTGAATGCAAGCTACTATG - 780  
 - D E R L Q I T I S D V G L I A A S T V  
 781 - TATGTATCGGCTGCTATGGCAGAGGGCTACTGCTCATATGATCATGGGCTGC - 840  
 - L T R V A N A D G L T H L I C I Y S V P  
 841 - CAGCTGATATGAACTGCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 900  
 - V W I V W S P I V L I T L L N H T L S  
 901 - CATGCCCACATGATTCCTCCAAAGAGCTGATTCAGAGGCTCTACTACTATG - 960  
 - L P H Y D S S E H S W I R G A L A T V D  
 961 - ACAGGACTACGGTGGTCTGACTAAGATCTCCACACATTAAGATACATGATTTTG - 1020  
 - R D Y G G A D \* D L P Q H Y R Y T C P A  
 1021 - CATCATCTGCTCAACATAACAATTAATGCAATGCAATGAGGCACTAAGCTATCAG - 1080  
 - S S V L K H T T L Q C H G G N \* S Y Q A  
 1081 - CCAGTACTCGGAAATACTACCAAATCGAAGGACTCATTTACAAAGCAATATGAGG - 1140  
 - S T R R I L F I E W N S I L Q S W M E G  
 1141 - GATTTGATGATCTATGTTGAGAAAGAGAGATCTCAAGCAGAGCATTTTGG - 1200  
 - F \* M H L C \* E R \* R I S R P R K P L V  
 1201 - TATAACAGACTAGTAAAGTGAAGAAATCAACAACTAGTTGCTAAGATGACA - 1260  
 - \* T E L V K V E N S F R T S L L S I S K  
 1261 - AAGTGTGAGTGTGTTTCAATATAAGTACTGAGTGTGATGTTGATGTTGCTTAAAGC - 1320  
 - M E F L C V F I I K Y W I C H V A L D L  
 1321 - TTATTGAGAACATTTCTATGAAATTAATCTTATTTTGGGAAAGAAAAA - 1380  
 - I V E T F S L \* K \* Y L \* F L G K K K K  
 1381 - AAAAAAAAAAAAAA - 1397  
 - K K K K K X

Esterasa (AJ879119)

1 - AATGCTGTCATTTCTACTACCAATGTTGGACCTTTGTTTCTTCATGCCAATGTTTGGC - 60  
 - N A C H P Y Y N V G A L P S S C Q \* P A  
 61 - TGGAATTTCTTTGTCAGGACCTGCTGGAACTGGGCAATGGTATCTCCCTTGAAT - 120  
 - W D L P C Q G L A G N L G H G Y L P \* I  
 121 - TCGTTTGGCCCTGAAATCCTCTTCTGACCTTACGACATGCTCAGGATGGGTTATAT - 180  
 - S P S P \* H R L P A A Y D D D A M D G L Y  
 181 - TGGAATTAATCACTCAAGTGAATGGTCCSAAATATCAGATTTGATACCTTAT - 240  
 - W I K S T Q D E V V R K Y S D L S H V Y  
 241 - CTTTITGGATCTAGTGTGGTGAACATMCTTACCATGCAAGGTTACGGTTCMCT - 300  
 - L P G S S C S G N I A Y N A G L R V A A  
 361 - GGGCATCAAGAACCTGAGCAATGAAATCAAGGCTAATTTGCACTCAACATAT - 360  
 - G A Y K E L E P V K I K G L I L H Q P Y  
 361 - TTCATGGAAGAACGACAGATCTGAGAGAGACTAAGGATGATCACTTTGCCA - 420  
 - P S G K H R T E S E E K I K D D Q L L P  
 421 - TTACATCAATTCACAAATGCTGACTGCTCTGCCAAGGGACCTGATCATGAT - 480  
 - L H A I D K H F D L S L P K G T L D D D  
 481 - CATGAATTCACATCACTTTCTAATGGGGTCCAGCATTTAGATGATGATGCTC - 540  
 - H E Y S H P F L H G G S K H L D D V I A  
 541 - CAGGCTGAGAACTCTTGTACTGGTCTCTGAGATCTCTGTTGATGATGATGCTC - 600  
 - Q G W K I L V Y T G V S S D P L V D H A R  
 601 - AACTTTCGAATTTATGAGAGAAAGGCAATAAATCTTCAAGCTCTTGGAGTGGT - 660  
 - N P A H P M E E K G I R T P K L P G D G  
 661 - TATCAATCAATGAGGGTTTGAACATCAAGGCAAGCTTANTTGGCCGCCCAAG - 720  
 - Y H A I E S P E P S K A A A L I G A P K  
 721 - GATTCATATGCTACTCAAAATTAATAATGAGCCAGTACCTCTGCTAAGTATG - 780  
 - D P I C A T T H \* K Y G Q V A S C \* R S  
 781 - GTTGTCTCATTCCTCAAAATAATCAAGTGGCTCTTCTTGCATAATAGGGGTTT - 840  
 - V C F I S P K \* I K \* A S L C K \* E G F  
 841 - AATGCTGCTCTGCTTGTAGAGATCTTTAAATATATATATTTCTTGTAGAAAT - 900  
 - T S S F L L E I T L K Y Y I S L E D Q S  
 901 - TTTAGATGAGTATTTGCTCGAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA - 960  
 - F R D E L L L L E K K K K K K K K X

Glutathion S-transferasa 12 (GST12) (AM040271)

1 - TGGTACCCGGGAATGACCATTCGCGCGGGAGACAAATGCTGAGGAAACAAAGT - 60  
 - G T R E S A I T A G E S K H A E E H E V  
 61 - AATGCTGACAAACATATGCAAGCAAGTATGCTATGAGAGTGGAGTGGCTCTCABAA - 120  
 - I L H K T Y A S R Y A H R V E L A L K I  
 121 - CAAGGCAATACAGTTTGAATAATGATGAGATTTGAGCAACAGAGCTCTGAGTGGCT - 180  
 - K G I Q P E Y V D E D L S W K S P E L L  
 181 - CAGTACAATCCTGTTCAAGAGGGTTCCTCTGCTGCAAGTGAAGCTGTTTC - 240  
 - K Y H P V H K H V P L L V H H G K P V S  
 241 - TGAGTCCCTCATCATCTTGAATAATGAGAGAGTGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGG - 300  
 - E S L I I L E Y I D E T H K T G P L I L  
 301 - GCTCAGATCCATATGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG - 360  
 - P Q D P Y E R A R V R F H A H P I D Q W  
 361 - TCTCATCTTACCAAGGAGAGTCTGGTCAAGCTGGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGG - 420  
 - L I P S T R K V W S T T G E E G E K A K  
 421 - AGAGGAAAATATGGAATAATGGAAATTCCTGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 480  
 - E E T H E K L H I L E E E L K T F H H E  
 481 - AATGATAATTTGGGACTCCTACAAATCTTGTGTTTGGCTTATGATGATGATGATGAT - 540  
 - H D N L G L I Q I L I L V T L P G S Y K V  
 541 - ATATGAGAGGTTCTGGTATGAGATTTGGTTCAGAAACAGCCCTCTTATTC - 600  
 - Y E E V L G M K I L V D E H T P L I Y S  
 601 - ATGTGACAGTTTAACAAGTTCCTGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 660  
 - C V T S L N K L P L V K E V C P P H D K  
 661 - GATGCTGCTTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG - 720  
 - N V A L V H V Y R Q K L L K S S T K \* A  
 721 - TGCTTGTCTTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG - 780  
 - A E A P M S L Q I C \* V H H S T L G V Y  
 781 - TTTAATAAATCTTGAATCTTGTATGATCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA - 840  
 - L I K S L H P V L Y Q \* H \* S L H Q L P  
 841 - CCCCGGCTTATTTTCTCAGATTTATATATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 900  
 - P G V P P P R P Y Y H L I L L V I R C H  
 901 - GACTGCTTGGATCTAATAATATGCTTGTGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 960  
 - T T E E I \* \* Y R L \* H I I \* I S V K K  
 961 - AAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA - 994  
 - K K K K K K K K K K X

Glutathion S-transferasa 1 o GST1 (AJ879121)

1 - CGCCCATGTTGGTACCAGGAAATCGCCCAATACGGCCGGAAATTCAMAAATTTTC - 60  
 - R A I V L V P G N S A I T A G N S T I F  
 61 - TCATCAAAAACCTTATATTTTCTTCAATAAAATAAATTTCTCATCAAAAATTTTATA - 120  
 - S S K T L Y F L N I E \* P S R Q K F F I  
 121 - ATTTTTATAGCAAAAATGGCAATCAAGTTCATGCCCAAATATGTCACCACTGTT - 180  
 - I F L I A R M A I K V H G S P I M S P A V  
 181 - ATGAGAGTTGTTGCTGCATTAAGAGAAAATACTTGAATTTGAACCTTGTCTCTATAT - 240  
 - M R V V A A L E E K N L E P E E L V D V W  
 241 - ATGCAAAATGGTATCACAAAAGGAACCTTTTATACCCCTCAATCAATTTGGTCAAGTT - 300  
 - M Q H G D H K E E P F I T L H F P G Q V  
 301 - CCAGCTTTTGAAGATGGAGATCTCAAACTTTTGAATCAAGAACCATTACACAATACATA - 360  
 - P A P E D G D L K L F E S R A I T Q Y I  
 361 - GCTCACCTATGCGACAAAAGGAGCCACTTACCCATGACCCAAAAGAAATGGCA - 420  
 - A H T I A D K G S G L L P H D P K K M A  
 421 - ATAAATGCTGATGAGTGGAGTTGAAAGCCAGAAATTCAGCCCTTGGCTCAAACTT - 480  
 - I M S V W H H E Y E A Q H F D D V S K E L  
 481 - GCCTATGAGTAGCTATCAAGCCATATGATGGCAGGTAAGCGACCCACCAATTTGTCGA - 540  
 - A Y E I A I K F M H G R V T D D A I V A  
 541 - GAGAACAGAGAAAATGGGAACTACTCGACATACAAAGCTTGAATCAAGGATCGG - 600  
 - E H E E K M G K L L D V Y E A R L K E S  
 601 - AACTACTGGTGGCCATAGCTTTACGCTGGCCAAATTCACCAATGCCCCGGTTCACAT - 660  
 - K Y L S G D S P T L A D L N H A P S L H  
 661 - TACTTGTTGGCAATAGGAGAGCTGTTGATGCTAGGCTCATGTAGTGGCTGG - 720  
 - Y L F S T K V H S L P D A R P H V S A W  
 721 - TGTACTGATGATGAGTGGCAGGAGCTGTTGCTCAAGACCTTGGTGGACAAACATGA - 780  
 - C A D V L A R P A W S K T L E L H K Q \*  
 781 - GTGGCGAGCGATGGTACGCTAAAGAAATGTGTCCTTGGTCTGCTTCCAGAGGG - 840  
 - V A D S \* V I R K R M C V L G E V E Q G  
 841 - AGCTAGGAGACACAGCTGAAAAGCACTGCTAAATGAGATATGTTGTTGTTAGTAC - 900  
 - S \* G S H S \* E R L L I \* D H Y L C \* Y  
 901 - TATAATGATGCTGATGCTGTTGTTGCTGCTTTTTCATAGCCAGCTTATGCTGCT - 960  
 - T V I E L C C T G F Y D H S Y V C  
 961 - TATTCAGATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG - 1020  
 - Y F E C L E Y R K E F S F I E K F S C E  
 1021 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 1080  
 - K K K K K K K K K K

Peroxidasa aniónica (AJ879066)

1 - ATGCCAAGCCITTTCTTCCATAGATCACTTTGATTTCTTCCATTAATTAAGTCA - 60  
 - F K A F V S S H R S H L V S P H H \* V I  
 61 - TCATGCTTTTCGTTTGAATGCTATTGAGCCITTTGCTTAGCCCTTGTGGCACTGCACTG - 120  
 - M A F R L S H L S L V I S L V A I A L A  
 121 - CAGGTGTTCTATTTATAGAAACCTTATGAGCCATGATGATATATGAGGACCTCTCC - 180  
 - G V A I Y R H T Y E A M M H S G S L L Q  
 181 - AAACCTGTTTCACAGATATGTTGTTGGAATCAGCCAGCAATATATACCTTAAATA - 240  
 - T V S P D I G L L E S A A S I L L W H  
 241 - ATAGAAATAAATATGGTGGCAGAAAGAAATGACCAAAATGATCAGCAATTAACACAGG - 300  
 - K N H I G A E R K S A K L H Q Q I T Q E  
 301 - AGTCATGCTTTTCTAGCTGTTAATGGAGTTGTTGAGCAGTGCATGATGCTGAACAC - 360  
 - S C V P S A V N G V V D S A I D A E T R  
 361 - GCATGGAGCTTCCCTCATTCGCTCACATTCATGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG - 420  
 - M G A S I I R L H F H D C F V D G C D G  
 421 - GAGGTATTTCTAGATGATAATTCCTGGATCATTCAGGGAGACAAAACCTCAACCA - 480  
 - G I L L D D I F G S P G G E Q T S P F H  
 481 - ACAGATGCTAGCCAGGCTTGCAGTCAATGCCAAGCTAAGCAAAATGTTGTAGATA - 540  
 - D H S A R G F E V I A Q A K Q S V V D T  
 541 - CATGCCCAACATATGTTATCTTGTGCTGACATCTTACATATGCTGCTGCTGCTGCTG - 600  
 - C P H I S V S C A D I L A I A A R D S V  
 601 - TTGCTAAATAGGAGGACAAAACCTTATAGGCTTACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 660  
 - A K L G G G Q T Y T V A I G R S D A R T A  
 661 - CCACCTTACTGCTTTTACTTCAACTTCCAGTCCATTCAGCAACTTACAGCAAAA - 720  
 - H F T G A L L Q L F G P S D H I T E Q I  
 721 - TACGAAAATCAGCAAAAATTCACATATCCAGAAATGGTGGCTTACCCGGGAC - 780  
 - R K F S D E H F T I R E M V A L A G A B  
 781 - ACAGGAGGTTTCCAGGCTGCTACCTGTCAGCAGCAACAGGTTAACCTGCTG - 840  
 - T V S F A R C V T V C H S H V H V S A A  
 841 - CAGGCTCAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG - 900  
 - B L Q C H C S A T Q T D S H I Q Q L D A  
 901 - CACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG - 956  
 - T P A V F D K F T T M K \* Y T T G E X

GST/peroxidase (AJ879067)

1 - ACTATT AACAAATCAGTACTAGCAA TTTCTACA AATTCTTCTTCATAGCAATTGC - 60  
 - LLTNQY \* QFLQHNSSFFIAPA  
 61 - CTGT TTTTTCATACAACAAAATGGCTAATGATGAGGTGATCTGTGGATTCTGGCC - 120  
 - LFFNHTTKMANWDEVI LLD FNF  
 121 - TAGTATGTTGGTATGAGGCTAGGATTCGCTTCTGAGAAAGGTA AATATGATC - 180  
 - SMFGMRRLRIALAEKEVETES  
 181 - CAAGAGAGGATTTGAGAACAAAATGTCGCTGCTTTTACAGATGAACTGCTCCAA - 240  
 - KEEDLRNKSFLLELQMNFPVHK  
 241 - GAAAATGCAATTTTATTCACATGGAABCAACATGATGATCTATTTGCAATGGA - 300  
 - EIDVLIHNGKFI CESSIAYE  
 301 - GATATGATGAAATGAGGATGAAAGGTAAGGCTCTTCTGCTTCTGCTGATCTTATGAA - 360  
 - YIDDEVWKRDAFLDFTER  
 361 - AGCACAGCTAGATCTGAGCTGACTCAATGACAGAGATTTTATGATCTAGCCGAA - 420  
 - AQARFPWADYIDK KFFDSSRN  
 421 - GATATGCAACAGAGGAG - 480  
 - IWTTEKGE EEAANKEDPIECL  
 481 - TAGGACTGAGGAG - 540  
 - KYLESA LGEK PFFGGDNFSP  
 541 - TGAGATGTTCTGATGAGGCTCTACAGCTGGTTTTTCTTACAGAGCTTGTGATA - 600  
 - VDVALIGFPYSWFFAYETCSN  
 601 - CTTCACACAGAGGCTGAGTGTCCAAAGTTGTCAGTGGCCAGAGGCTGATGAGAGAG - 660  
 - PSTEA AEC P K F V T W A K R C H Q R  
 661 - GGACATGAGGAGGCTTCTGCTGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 720  
 - DSVAKSLP D Q H K V L E F V Q T L  
 721 - AAGAGAGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAG - 780  
 - RKKYGI E \* T Y A Y T I W H H H V L  
 781 - ATAGAGAGAGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG - 840  
 - \* E R R P G L L E L \* V G I R T V C L V  
 841 - CATGATGAGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG - 900  
 - I V S S E F Y P Y N \* \* K T L R S V W X

Glutathion peroxidase (AJ973136)

1 - TAGGCCATCCATACAGTITACCCCATCTTATACCTCCCTCTGTTGCTGCTAAGS - 60  
 - KPIHTVLPNSLSPPVVA?K6  
 61 - TITGAGTITITGGGTTGAGATTGAATCCTAACATGCTTCCCAATCCACAGGCCCTCA - 120  
 - FEPFLGLRLNRNMA S Q S NR P Q  
 121 - ATCTGTTTATGCTTCACTGTCAAGGATGCTAAGGACAGGAGCTGATCTACGATTA - 180  
 - SVYDFTVKDAK G K D V D L S I Y  
 181 - CAAGGGAAGGTTCTATCATGTCAAGTTGCAACAGTGTGAGCTGACTAATCAA - 240  
 - KGEVLIIVNVA S Q C G L T H S H  
 241 - CTACAGGAGTACGAGGTTATACAGAGATACAGGAGAGAGGTTGAGGATTCCTCC - 300  
 - YTD M T E L Y R E Y K D K G L E I L A  
 301 - ATTCCTTCCAGGAGTGTGAGGAGGAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 360  
 - PFC H Q F G G Q E P G S I E D I Q Q H  
 361 - GGTTTCCACTCCCTTCAAGGCCAGTACCAGTATTTGATAGGATGATGATGAGGAGGAG - 420  
 - VCTRFKAEYFPVFDKVDVWGD  
 421 - TAATGCTGCTCCATGATAGGTTCTGAAATCAAGCAGAGGAGGAGGCTTCTGAGTATG - 480  
 - NAAFLYKFLKSSKGGFPFGDG  
 481 - TATCAGTGGATTTCTCCAAATCTCTATGACAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 540  
 - IKHNFSEKFLIDKEGNVVD R Y  
 541 - CTCTCAAGGAGTCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 600  
 - SP T T S P A S W E K D I K K L L G V A  
 601 - ATGAGCTGAGTACGCTGTTCTGATTTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAG - 660  
 - \* ALGYAVSAPGARWNERVIA  
 661 - GATATGAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 720  
 - N K L L C F N \* F S S C S A A T T P Y C  
 721 - CTGTACATCTCATATACACATTTCTATATACAGTAAAAA AAAAAA AAAAAA - 780  
 - LVNLIH N Q H I S Y Y K \* K K K K K K  
 781 - AAAAAA AAAAA - 792  
 - K K K X

Proteína inducida por ácido araquidónico DEA1 (AJ879120)

1 - AACCAAGCCAAATATAATCTACTTTAAAGCTTAACACCTAAGTTAAATATGG - 60  
 - D E P K I K I Y F N V \* T P K L L E H M A  
 61 - CTCCAAAGAACCGCTACTCTGCTCTAATATACCTTGTGAACCTCTCTTTTCTCTC - 120  
 - S K E T T T T I A L F I L V H L L P P S L  
 121 - TTGTGATGCAATGCGACTTGTCCAGTCCAAACCTAAAGCCAAAGCCAAAGCCAAAGC - 180  
 - V S A C G T C P S D K P K P K P K P K P  
 181 - CAATCCAACTCCAAAGCCAAAGCCAAAGCCAAAGCCAAAGCCAAAGCCAAAGCCAAAGC - 240  
 - T P T P K P T P S P G S K G K C P I D A  
 241 - CACCAAAATTAAGTATTTGTGCTATGTCTTGGAAATTTACTTGGAGTTGTACTGTGAA - 300  
 - L K L G I C A N V L G N L L G V V L G N  
 301 - ATCTCCAAAGAAACCTTGTGTCTCTCAATTCAGAGACTGTGTGACTTGTGGGCTGCTC - 360  
 - P P K E P C C S L I Q G L V D L E A A L  
 361 - TTGTCTTGTGCACTGACCTTAAGCAATATCTTGGGATTAACCTTAATGTCCCTATTT - 420  
 - C L C T A L K A N I L G I N L N V P I S  
 421 - CTTAAACCTCTCTCTATATGTTGTGCAAAALMTTCAATCTGCTCTCAATGTCTA - 480  
 - L S L L L N V C G K K V P S G P Q C P N  
 481 - ATGTAAACAAACAATAACTAGCCCTCAATCTTAAATTAAGTTGGAGTCACTATAATGA - 540  
 - \* T N H Y N Y A S V L N K L E S A I \* I  
 541 - TCTCAATTCGCTACTATACATAATTGCAATGTTGTGACTTGTGACTTGTGACTTGTGCT - 600  
 - F I S S L L H I S I \* L P G P L E W S \*  
 601 - AGGTATGACTTCTCTATTAAGCAATAGTCTGATGCTGCAATGTCTGCTGCTGCTGCT - 660  
 - V \* T S P I K D R P \* C A E L S C S L C  
 661 - GTGCTGAAATATGTTCTCTTGTATTTCTCAATGTACTTCTTACTTCAATAT - 720  
 - S L K I S S S L Y P L M Y F L Y F T I Y  
 721 - ACGAAGCTCTATTGTGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG - 780  
 - R S L P C E K K K K K K K K K K K

Proteína de pared celular 3 (AM040272)

1 - GATATCGGAGAGATATTGACAGATCCCGCCGGAAGGATTAAACCGTATATCT - 60  
 - D I G R G I L S R I P R G K D I T V L S  
 61 - CGTGGAAATTCATGCGGATTTTGGAGAAACGAGCCGCAAAAATGAAAGTACTT - 120  
 - R S H I H G G I L E E T R R E E \* K V L  
 121 - TACCAATGTGAGCGGACAAATTTCCAGAGAAACAGCTATGACCAATGATGACCCA - 180  
 - \* Q L \* A D N H Y T Q E T A N I M I T P  
 181 - AGCTCCAGTCTGAGCAGCTTTTCTTTTCTGCGGAGCGCCCATGTCTGATG - 240  
 - S S E I W T S P F P F L G R A I V L V  
 241 - CCGCGAATTCGCGCAATAGCGCCGAGGACCTCAATTTCAATATCAATAGTACTAA - 300  
 - P G H S A I T A G D P S I P H Y H E Y \*  
 301 - GCTTTGAAAGAAATATAGAAATGCGTCCAAACATTTCTGTTGCTGCGCTATTG - 360  
 - A L E K K Y R H G S K T F L L L G E P L  
 361 - GCTATTTTATATGATTAACCTCCGAGGTTGAGCTAGGAAATGCACTCCCAAC - 420  
 - A I F L M I T S E V V A R E I S E T P H  
 421 - TCAGGAGAGATGATGCTTGTGATGATGAGGTTGAGGCTTATATAGGTTGAGGAG - 480  
 - S A K E V V V D G V G S D P Y Y K G S S  
 481 - TATACCAATAGAGATGTACCTTAAATGCAATATCCCGCTGCTGCGCCATGAGGAA - 540  
 - Y H H G C Y H K C K Y P P C P Y E E  
 541 - TATATGCTCTTGGAAATAGCCCTGATCCCAAGAGAGATGAGATGATGAGGATAT - 600  
 - V M A L G I A D E S G Q E V E V D G G Y  
 601 - AAACCTAAAGAAATGTCAATCACTGCAATGAGACTTCTGCGCCATGAGAGATAT - 660  
 - K P K K K C H E Y C H G H C C P Y E E Y  
 661 - ATGCGCATGAGAAAGCCCTGGAATTAACCTCAAGACTAATTAATAGTCTTCAAT - 720  
 - M A M E X D P G P K P Q H \* L I S A S L  
 721 - TGTATATATAGTAAATGCTTGTGATGATGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 780  
 - C I Y H V H L C Y V S G K D H K H L A T  
 781 - TTAGAGCTTTACTTGTATGAAATAAGCCCTTCAATAGTGTCCAAAGGATGAGGAGG - 840  
 - L E L L E V \* I K P F H S V P H D G W S  
 841 - TGCTCAATATGTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 900  
 - S S C H V L Y D T E Y D I V L W H K C  
 901 - TTTATATAGTCAATTTCTCTTTTCTTAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG - 960  
 - P Y K V Q P S P F P K K K K K K K K K

Proteina de pared celular 1 (A.J879062)

1 - ATCCCTCAATTTTCAATTATCATAAGTACTAAGCTTTGAAAAAAAATATAGATGGCTT - 60  
 - P S I F H Y H K Y \* A L K K K Y R M G S  
 61 - CCAAAACATTTCTGTTGCTTGCCCTATTTTGGCTATTTTCTTAATGATACCTCCGAGG - 120  
 - K T F L L L L G L F L A I F L M I T S E V  
 121 - TTGTAAGTGGGAATGAGTGAAGCTCCCACTCGAAGGAGTAGACGTTGATGGTGTG - 180  
 - V A R E L S E T F N S K E V D V D G V G  
 181 - GAGGTGACCAATTAATAGGGGTGAGGAATATAACATAAAGGATGTTACCATAAAAGCA - 240  
 - G D H Y F H G G G Y H K G C Y H K C K  
 241 - AATATCACCATTGCTGCTCTATAGAGAAAATATATGGCTTGGGAAATGCACTGAATCAG - 300  
 - Y H C C T Y E Y W A L G I A T E S Q  
 301 - AGCAGAAATAGAAATATATGGTGGATATAAACCATAAATAAATAATGTATCATACTGCTC - 360  
 - Q E V E V D G G Y H K K K C H Y C H  
 361 - ATGGAATGCTGCACTATAGAAATATATGGCTTGGGAAAGGACACTGGACTAAAC - 420  
 - G H C C T Y E E Y M A M E K D T G S K P  
 421 - CTCGAACTAATTAATAGTCTTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT - 480  
 - Q H \* L I S A S L C I I H V M L C Y V S  
 481 - GTGCAAGGACCAATAAATCTGCTCTCTTAAAGCTTTTACTTGTATGATAAAGCAAT - 540  
 - S K D H K H L A T L E L L L V \* I K P P  
 541 - TCAATATGCTGCATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGAT - 600  
 - N S V P M D G G S S W S C H V L T D T E T  
 601 - CATATGATTTTGTGTAACAAAAATATGCTCAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA - 660  
 - Y D I V L H E K C F Q K K K K K K K K  
 661 - AA - 662

Proteina 14-3-3 (AM040266)

1 - CAGATCTCAAAAATATATAATAAATAATTTCCGAGAGAGATGGCGTGGACCCGACG - 60  
 - Q I S K I Y I \* K Y P P R K H A V A P T  
 61 - GCGCTGAGGAGAACGCTGACATGGCAAACTGGCGGAGCAAGCCGAAAGGTAAGAGAA - 120  
 - A R E S N V Y M A K L A E Q A E R Y E S  
 121 - ATGGTGGACTTATGGAAGAGGTTTCGAAATCTCTGAGGTTTCGAAAGATTAACAGTGGAA - 180  
 - M V D P M E K V S H S L G S E E L E V E  
 181 - GAGGAAATCTCTCTCCCTCCGCTATGAAAGCTGATGCGAGGCGCTGAGACATCTGCG - 240  
 - E R H L L S V A Y K E V V I G A R R A S W  
 241 - CATTAAATTTCAATGATGAGCAAGGAGAGTCAAGGAGGAGATGAGGAGCACTGATTAAT - 300  
 - R I I S S I E Q K E E S R S W E E E H N  
 301 - TCGATTAAGGAAACAGATCTAGATTAAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGAT - 360  
 - S I K E T R S K I E E E L S K I C D S I  
 361 - CTCBAATGCTTATCTAGCTTATTCCTCTGCTACTCTGCTGATTTTAAAGTATTT - 420  
 - L K L L D S K I I P S A T S G D F K V F  
 421 - TACTGAAATGAGAGGAGATTAATCACTGCTATTTGCTGAGTTTAAAGCTGCTGCTGAA - 480  
 - Y L K M S D Y E R Y L E S F E T S A E  
 481 - CATAAGGCTGCTGAGAGTACTCTGCTGCTTTCGAAAGCTGCTGAGGATTAATGATCT - 540  
 - R K E A A E S T I Y L Y K A A Q D I A S  
 541 - GCTCACTTGGCCCCCATCCATCCACTGCACTTGGCTGCTCTTACTCTCCCTGATTT - 600  
 - A E L A P P H P Y R L S L A L W P S V P  
 601 - TATTAAGATCTGATTTCTCCGCGCTGCTGCAATTTGCCAAAGCCCTTTGAT - 660  
 - Y Y E I L H S P P A R A C H L A K Q A F D  
 661 - GAAGCAATGCTGAAATGGACCAATGGAGAGAGTCTTACAGGAGCAGCTTTGATC - 720  
 - E A I A E L D P L S E E S Y K D S T L I  
 721 - ATGCACTTTTCTGCAATTCCTCAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA - 778  
 - M Q L P R D I P K K K K K K K K K K

**Metaloioneina (AJ579116)**

```
1 - TCCGCAATCAATCAAAATTCATTGCAATTCCTATGTTTGTGTGTGTGGTAAATTCAT - 60
- S P S I K I S P A P L S F V C V * I L I
61 - CAATCAATCTCATCAAAAGATGTCTTCTGTGAGCAAACTGCCTGTGTGTGTGTGATCTGCTG - 120
- H Q S E N T K M S C C G S G N C S C S S S C
121 - CAATGCGCAATGTGCTGTGGATGCAAGATGTAACCTGCACTGAGCTACACCGAGAG - 180
- K C G S E G C S G C K M Y P D M S Y T E S
181 - CATGCAACCCAGGAGCTTTGCTGCTGCGATGCGAAGCTGAGAGAGCAAGCTTTGCGGC - 240
- M T T T E T L W L G H G D E K T S F G A
241 - CATGGAGATGGGGAAATCCCTGCTGTGAGAAATGATGCAATGTGGAAATCTGACTGCAAGT - 300
- M E M S E T S F D E H G C N C G S D C K C
301 - CGACTCTGCACTGTGTAACTGAAATAAATTAAGCTATTATAACAGACCAAGATTCTATG - 360
- D S C T C H K * I H * A I I T E O S S H
361 - GTTTAATGTGTGTGTTTATATTTTGTGCTGTGTGCAACAGGAGAAAGATTTGTGTGTG - 420
- F H V C S F T V C A C C H R E K D C V
421 - TCCTTTTTTCCCTGTAAATAGAAATAATGAAATGGAGATAATGAAATATGTTATAGTAGTG - 480
- L F F F P V I R H S H S V L E H V C H * H
481 - GTAATGTGATGTTGTGTGTAACTGTGATCTCTGCACTGTGTAATTTTAACTACTAGT - 540
- * C S V C V T * V F S A S G H T H E V
541 - TTGGATATGTTGTGGTTTGCAGTAAATTAAGAGACTTCCCTTGGAAAACAAACAAACAA - 600
- W K Y V V V S A H L R T S L E K K K K K
601 - AAACAAACAAAC - 612
- K K K K
```

**Metaloioneina (AJ579063)**

```
1 - ATCAAAATACAACTACAGAGAAATAGATTGTCTATAAATCTTTTTCGTAAGGA - 60
- H N * Q L H R K L D L S Y N L F P V R K
61 - AAACAAATGTCCTGCTGTGGAGAACCTGTGGCTGAGATCTGCTGCCAGTGTGCCA - 120
- K H M S C C G S C G C S G C Q C G S
121 - GTGGCTGTGGAGATGTTGGATGTAACCTGCAATGAGAGCACTACTTTACTATCA - 180
- G C G C S M Y P D M E S T T T P T I I
181 - TTAGGGAGATGTGCACCAATGAAAGAACTACGGTAAAGTGTGGAGATGTGAGAGAGAACAA - 240
- E G V A E M K H Y G E V E G S A E K A T
241 - CAGAGAGAGAAATGGATGCAAGTGTGGACCAAACTGCAAAATGTGACCCCTGCACCTGTT - 300
- E G S H S C K C S A H C K C D F C H C *
301 - GAGCAATACCAAATGTCTCTGTTGTATTAATATTAAGAACTATGTTTITTAAMCC - 360
- D I T H M S L V V L I I K D Y V F * H L
361 - TGTGTATTAATAAGACTACAAGCAATGTAAATTAACAATCTCAAACTTTTAAATTA - 420
- C T * D Y K A I E F H I F H S F * I E
421 - GGTTTGTGAGTTTATTTCATGATTTTACTTTTATGTTTTGTTTTTCTAATCTGC - 480
- F V * C F Y F H V T T Y V H F S H L
481 - TTATGTTTGTAGAGAGACTGAAATGAGTGCACACTTAAACTTATCAAAATCA - 540
- H F V * R K L H W D A T L * T E S S C H
541 - ATCAAGTTGTCCTTATTATGATGTAAGAAATCTATGTTTTCAAAAACAAACAAACAA - 600
- T S C L L L L L C M K S I C F Q K K K K
601 - AAAAAACAAACAAAC - 616
- K K K K K
```

Proteína conjugada a ubiquitina (AJ879070)

1 - TCCTAGATACGGGATCTGATGGTCAGGTTATATCTGATCAGATCASCITACAATC - 60  
 - R R Y G D L M G Q V M Y L I \* S A Y I S  
 61 - ACCTGACTCAGAAATCTGATTTCCATAGCAAGCCGCCCCCTCAAGCCACCC - 120  
 - R \* L R N L N P P \* A D R P P S Y T H P  
 121 - ACCAAGCAGCCAGCCAGCTCTCAATCTCCATCTCTTAGGTTAGGAGCTGAAAC - 180  
 - P T H P P Q L S I S H L L \* C R D L K T  
 181 - TGTGAAATGTAATTTGTGATTAAGCGTGGAGATGTCAGCCGCTAGAAAGAT - 240  
 - V E L \* F Y D \* A V R H S T P A R K R L  
 241 - GATGAGGATTTAGCGGTTACAGAGATCCACTGCTGGTATCAGTGGTCTCTTA - 300  
 - M R D P K R L Q Q D P P A G I S G A P Y  
 301 - TGACAGCAATATTATGCTTGGAAAGCTGATTAATTTGGCTGATGCAAGCCCTG - 360  
 - D W W I M L W H A V I P G P D D T P W D  
 361 - TGAGGTAAGTTAGCTGAGCTCAATTTTGGAGATTAAGCCAGCAGCCCTCAGC - 420  
 - G G T P K I L T L Q P S E D Y P H K P P T  
 421 - GGTCGGTATTTCCAGGATGTCAGCAGATATTATGCGATGGGATTTTCTT - 480  
 - V R F I S R M P H P H I Y A D G S I C L  
 481 - GGACATCTGCAAAATCAGTGGAGTCTAATTTATGATGCGGATATCTCACTCAG - 540  
 - D I L Q H G W S P I Y D V A A I L T S I  
 541 - CCACTCTTCTCTGCGATCCAAACCCAGACTGCGCACTAATTCAGAGCAGCCGCA - 600  
 - Q S L L C D P H H S P A H S E A A R H  
 601 - GTTACGAGAACAGCCGCACTACAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 660  
 - P S E N K R E Y N R N V R E I V E Q S H  
 661 - GAGCAGTACTGATCTCTCTGCGCTTCCGAGATTTCCAGTACTGAGGAGGAG - 720  
 - T A D \* H I S G P P G R F S W Y G C P G  
 721 - TCAGCCTCAGATTTTCACTGTTGTTGCTACATCAGATTAATGAGCGAGAGTGT - 780  
 - Q A S H Y S L L P A T P I H V A G S V  
 781 - CTTTATGCTGCTTGAAGCTGATGCTTACTTCACTGATCTCTGATCTGAGCAG - 840  
 - L L C A L \* H S D C L I F H E C Y S T K  
 841 - GAGCAGTACTGATCTCTCTGCGCTTCCGAGATTTCCAGTACTGAGGAGGAG - 900  
 - R Q C T Y W S L V S K P T E A L P F W S  
 901 - ATCATGAGCCTCAGCGAAATGGAATAATCTGATATTTGTTGGCAATGA - 960  
 - S \* D E H G K H I N I \* Y C C L A M X

Poliubiquitina (AJ879118)

1 - CAGTGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 60  
 - G L E T V V L K L I T T S G H E S T L H  
 61 - TTGGTCTCCGTTTCGCGGTGGTATGCAATTTTGTAGAGCCCTCAGAGGAGGAG - 120  
 - I V L R P R G M Q I F V H T L T G H P  
 121 - ATACTTGGAGGTGAAAGGCTCAGATACCAATGAGCAAGCTGAGGAGGAGGAGGAG - 180  
 - I L W R H H Q I P L T T S H P R S R I  
 181 - AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 240  
 - R R I S P Q T S R G L S L P E S \* K H  
 241 - GCGGTACTCTCCGAGTACAGATCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 300  
 - I V P S R T T E R R R H V P P T L S S V  
 301 - TCCTGTTGATGCAATTTTGTAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 360  
 - S V V V C R S L S R P S L G R P L P H E  
 361 - TTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 420  
 - L R A P T P S T H \* R R E S R T R A P  
 421 - CCCAGACCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 480  
 - P Q T S R G L P L Q E H S W R H S A L I  
 481 - CTGACTATGAGTCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 540  
 - I T T I S R H H P P T L S V S V V V  
 541 - TGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 600  
 - C R S R P L S R D  
 601 - ACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 660  
 - T P S T H S H P R F R T R R E L F H Q T S  
 661 - AGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 720  
 - E G V L L V T S W R M G V L L T W E  
 721 - TCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 780  
 - S R R H P E C T L S S V S V V A F H M H  
 781 - CCTATTGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG - 840  
 - I I C W H I S C W P C P V A H C G S L C  
 841 - GTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 900  
 - V C W D G L E R I K I H V P L C P C S L V  
 901 - TCTCTGATTTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 960  
 - P F V Y \* I K I S L P I H R H R H R H W  
 961 - AAAA... - 999  
 - K K K H

Proteína tipo extensina (AJ879072)

1 - ATCCAAATTCAGTATATTTCTCTATTAACAGTTTAAAGACTCAGCAAGAGGCTAGGT - 60  
 - H K F Q Y I S L L L S L R L N K M A K S  
 61 - CACTTACCCTATTCTCTATTTCACATCTTAATTTCTCACAGTGGTGAATGCAATGCAACA - 120  
 - L A L F L L F N I L P F T V V S A C W T  
 121 - CTTGCCTGGCCCTTAAACCAAAACCAAAACCAAGCCCAAGCCCAAGCCCAAGCCCAAGCC - 180  
 - C S P F F F F F F F F F F F F F F F F  
 181 - CTCTCTCTCTTCAAAAG - 240  
 - P P P S S S S S S S S S S S S S S S S S S  
 241 - GTGCTAATGTCTTAAATGCTTTGTTGAAATGTAACTTGGAAAGCCACCTGTGGAGCCAT - 300  
 - A N V L N G L L N V T I G K F P V E F C  
 301 - GTTGCAGTCTATTGAAATCTTGTGGATTGGAGGCTGCTGTTTGTCTTTCACACTGCAC - 360  
 - C S L I E N L V D L E A A V C L C T A L  
 361 - TTAAAGCTAATATTTTGGGATTAATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACT - 420  
 - K A N I L G I K L N L P I S L E L L L L N  
 421 - ACCTTTGTAGCAAG - 480  
 - V C S K K A P K G P T C P \* M I L S P F  
 481 - TCTTTTAACTCTGAGGTTGGTTTGTAAATGCAATTTTAAAGCAGTTTCTGATGTCATAT - 540  
 - F L F \* S W F L I S I F L A V S D Y L F  
 541 - TTGCTATGCATTAACCTCTTGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 600  
 - V T A L W I L L G A S L \* F V I D C L I  
 601 - TGTGGAAGACACTGTGTAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAG - 632  
 - L E R Q I P A K K K K K K K K K K K

Proteína ribosomal L37a (AJ879068)

1 - CTAGATGATCTTTCCTCTAGCAGCCGCTCAAATCTCCATCAACATTCAGATGACT - 60  
 - I D E S L L \* A A A Q W P F S T P T M T  
 61 - AAGAGCAGCAG - 120  
 - K R T K K A G I V G K Y G T R Y G A S L  
 121 - CGTAGCAGATTAAGAAAAG - 180  
 - R K Q I K K M E V S Q N S E Y F C E P C  
 181 - GCAAGATGCTAG - 240  
 - S K Y A V K R K A V G I W G C K D C G K  
 241 - GTCAGAGCAG - 300  
 - V K A G G A Y T L N T A S A V T V R S T  
 301 - ATCCAGAGACTGAG - 360  
 - I R R L R E Q T E S \* S N L P S S C A A  
 361 - TATGATGCTACTTATTCAGCATGTTTTCATTTTGCATTTTGCATTTTGCATTTTGCATTT - 420  
 - Y D V P T Y F D M P F Q P \* V L Y N V S  
 421 - AGTTGATGCTAG - 480  
 - S C V E R S D I S V R V L Y N \* L Y L V  
 481 - AAATCTACTTATTCAGCATTTTTCAGCATTTTTCAGCATTTTTCAGCATTTTTCAGCATTT - 536  
 - K L S Y S D N F \* K K K K K K K K K K K

Alcohol deshidrogenasa (AM040269)

1 - CATGTGGATGTGTGGGAAAATAACCCCTTGTCTCTCTTGACAAAATATGTGTCTT - 60  
 - H V G C V A X I N P L A P L D H V C V L  
 61 - AGTTGTGGAATCTCGACAGCCCTTGGTCACCTTTGAAATGTTGCTAAAACACAAAAGC - 120  
 - S C G C I S T G L G A T L H V A K P T K S  
 121 - TCAAGTGTGGCTATATTGGACTAGGGCTGTAGGCCCTTCTGCTGCAAGAGACAAA - 180  
 - J S V A I P F G L G A V G L A A A E G A R  
 181 - ATTGTGTGTCTCGAAGATAATTGGTGTGAAITTAATGCTAGCMAATTTGACGAGCT - 240  
 - T A S A S R I I G V D L H A S R F E Q A  
 241 - AAGAAATTTGTGTGACAGGTTTGTGATCCAAAGGACATAGTAAAACCTGTCAAGAG - 300  
 - K P S V Y E P V E V K D H E P V Q E  
 301 - AATAATGCTGAGATGACTGATGGCGAGCTCGATGAGATGTGAAATGCTAGGCCAAT - 360  
 - I I A E M Y D S G V D R S V E C T S H I  
 361 - GATCTATGATTTGAGCAITTTGAAATGTGTCTCAAGGCTTGGGAGTGGCTGTCTTGT - 420  
 - D A M I S A F E C V H D S V G V A V L V  
 421 - GGAGTACCCCAAGAAAGCTGTGTTCAGACACACCCCTATGAACTGTGTAATGAAAGS - 480  
 - G V P H K E A Y F K T H P M E L L E R  
 481 - ACTCTCAAGGAACTTCTTTGGAACTCAAGGCTCTGCTGGAGCTTCTTCTGTGT - 540  
 - T L K G T P P G N Y K P R S D L J S V V  
 541 - GAGAAATCATGACAGAGGCTTGAATGGAGAGTTCATCACTCACACACTCCCATTT - 600  
 - E K Y M H R E L E L E K F I T H Y L P P  
 601 - GCTCAATCAACAGGCTTTGATTTAATGTTGAAAGGAGAGGCCCTTCTGCTCATC - 660  
 - A Q I H K A F D L M L K G E G L R C I I  
 661 - ACCATGAGGACTAGCAATCTCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG - 720  
 - M E D A A Y P A S R A D H I E K T H Y  
 721 - TCTCTCATGCTTATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG - 780  
 - P L I V L P S P V C L V I W P L S L L A  
 781 - CTTTCTAGCTAGAGATAGCTTGTGCTTGTGAAAGGCTTCAATGCTTCAATGCTTCTG - 840  
 - L C A I T D M E C P L Q C L I Y F C S C  
 841 - ATAAATGTAATTTCTGTGTTTGAATCTTTTGAAGTAAATGTAAATAAATAAATAA - 900  
 - I H C H E C V L N P P S K A C P K K K K  
 901 - AAAAAAAAAA - 913  
 - K K K K X

Malato deshidrogenasa (AM040268)

1 - GAGAGAACATTAACCTTCTCACAGGTTGGACCAACAGGCCCCCTTGGCCAACTCA - 60  
 - E K N I T C L T R L D N H R A L G Q V S  
 61 - GAAAGACTGATGTCTCAAGTGTGATGTAAAAATGTCAATTTGGGAAACACTCA - 120  
 - E R L S V Q V S D V E H V I I W G N H S  
 121 - TCACACAAATATCTGTATGTACACACAGCAGCAGCTTACTACACAACTGGAAAGACCA - 180  
 - S T Q Y P D V N H A T V T I P T G E K P  
 181 - GTCCGTAACTTGTGGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 240  
 - V R E L V A D D A W L H G E P I T I V Q  
 241 - CAGAGGGTGTGCTGCAATATCAGGCTAGAAAGCTTTCTAGGCTCTTCTGCTGCTGCTG - 300  
 - Q R G A A I X K A R E L S S A L S A A S  
 301 - TCTGCTGTATACATAATCCGATTGGCTCTTGGACTTCCAGAGGCTACTTTGTTCT - 360  
 - S A C D H I R D W V L G T P E G T P Y S  
 361 - ATGGGTGTATTACTGTATGGGTGATACAAATCCAGGCTGGCTCAATTAATGCTTCCCA - 420  
 - M G V Y S D G S Y N V P A G L I Y S P P  
 421 - GTTACATGCAAAATGAGAAATGTCATTTGCAAGGCTTCCAAATGACAGATTTCTCA - 480  
 - V T C K N G E W S I V Q G L P I D E P S  
 481 - AGAAAGATTTGGCTTGTACAGCTGAGGAGCTATCGAGGAAAGAAAGCAATGGCTTACTCC - 540  
 - R K K I D I T A E E L S E E K A L A Y S  
 541 - TGCTTACATAAATTTGCTTTTCACTTATGTGGTAAATGAGATGCTTCAAGGTTT - 600  
 - C L T A I L P P Q P M H A A K H W L Q V L  
 601 - AATAAGCCATTTGTTGATCTTGAAGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 660  
 - W K A I V D S A G K A W G Y C F V S C  
 661 - TTACTCTTAAATGTCGAGATGAACTGAACTGTCCTTTTTTGGAAATAGGAAATGACCA - 720  
 - L L P H V R D A T E S V P F A N K A V A  
 721 - TCTTTTGTGTTCTTGTGCTGACAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA - 773  
 - S P V V P L L T K K K K K K K K K K X

Oxidase unida a FAD (AM040276)

1 - AAGCAITTCAAAATTTAAGCATCCATCTGATCTCTGGGTATGCAACGCGAATGAT - 60  
 - A P Q T P K H P S V S L G M H Q R N R C  
 61 - GCNAGCCAGTATAGATGTTTITGCTCTCAGGCCACATTAITCAAAGAATGAGAT - 120  
 - R S Q Y R C F A S Q A T I I Q R R S D F  
 121 - TTTCACAAATAGCTCAGAGACTTACATTTCAAGAAATATTAGGGGAAAGAGAGAG - 180  
 - S T I S S E D L S Y F R W I L G E R G V  
 181 - TGCTTCAAGATGAGAGCTCTGATGCTGTGAAACAGAAATGGATGAGGAAATCAAGG - 240  
 - V Q D E E T L D A V N T D W M R K Y K G  
 241 - GCACCACTAAACTTATGCTCCACCTCGGACAGAGAGAGGATATCTGATCTTAAAT - 300  
 - T S K L M L Q P R T A E E V S Q I L E Y  
 301 - ATTCAGTTCAGAGAGCTTGTCTTGTCTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG - 360  
 - C H S R L A V V F Q G C H T G L V G S  
 361 - GAGCTGTTCCAGCTTTGATGAGGATTTGTCAGCTCAGCTAATGAGCAAAATCATTT - 420  
 - S V D A P D E V I V S L S N M S K I I S  
 421 - CTITTTGACAAAGTTCAGAGCTACTGTTTGTGAGAGAGATGCAITTTGAGAAACCTCA - 480  
 - F D K V S S V L V C E A G C I L E M L I  
 481 - TCACITTTCTTGAATCAGAGGTTTATATGAGACTGATTTAGGTCTAAGAGAGCT - 540  
 - T P L D N Q G P I M P L D L G A K G S C  
 541 - GCCAAATGGTGGAGAGCTCTCACTAATGCTGGTGGGTTGCGACTTCTCGCTATGTT - 600  
 - Q I G G E V S T N A G G L R L L R Y G S  
 601 - CATGCAATGGTGGAGAGCTCTCACTAATGCTGGTGGGTTGCGACTTCTCGCTATGTT - 660  
 - L H G S V L G L E V V L A N G A T V L D M  
 661 - TGCTCAGCAATTCAGAGAGATACCTGAGTATGACTTGAACATTTATTAAGGTA - 720  
 - L S T L E R K D N T G Y D L K H L F I G S  
 721 - GTAGAGGTCCTTGGGAGTTGTAAGAGGTTTTCATCTCACTCCCAAGTGTGCC - 780  
 - E S L E L V T E V S L L T P R K L S L I  
 781 - TCTGTAAITGATGCTTTCTGCTGTAAAGATATGAAAGCTGCTGAGACTTTGTA - 840  
 - C \* C M L S C L \* R L \* K L P E T P V R  
 841 - GAGCGAGGAGAGAGTGGAGAAATCTTCTGCMITGAAATCTTTCAGCAAGCA - 900  
 - G E E S W R N S F C I \* X P \* S R R N  
 901 - ATGAGTGGTCTGAGAAATCTCAAGAGCTGCTGAAATCCATTCCTGCTCAATGCA - 960  
 - G S G P E T S R S V R N P P P S S M H T  
 961 - CTITTTGATGCTGATGAGAGAGGAGGAGTAAATCTATGATGAGAGAGACTCGATG - 1020  
 - F M C \* L R H G E \* \* X Y D R E E L D A  
 1021 - CCTCTGCTTCA - 1024  
 - F L L P X

Factor de replicación A (AM040277)

1 - ATAGAGGAGAAATTTAAGGCGGAGAAACACACACACACACACACAGCCCGA - 60  
 - R R K N F I K G G K T H T Q T N T E R A M  
 61 - TGTCAGCGGAGAACCAACATTCAGAGCCAGCCAGCTTTCCGCGCGCTTTATAGC - 120  
 - Y G S N N Q P D G N A A P S G G G E M P  
 121 - CATCGAGGCTACTCAAAACGACAGCACTTCTTCTCTCGAGCCAGAAATCGTATT - 180  
 - S Q A T Q T A S D H S F S P T K H R D S  
 181 - CACAGACTTGATCCATTAACCTCAGCAATTTAGTGAAGCTTTCATCAAGGTATG - 240  
 - Q T L I P L T V F Q L S E A F G D S D D  
 241 - ATAGAGCAATTTTCTCATGATAGGCTTGAATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 300  
 - K T H F L I D G V D V H E V K L V G I L  
 301 - TATTCACAAAGCAGAAATGTTTACAGCTGATGCTTGTGTGAGAGATGAGACTGGGC - 360  
 - F N K A E M L T A V S F V V D D G T G R  
 361 - GCCTGACTGTTTCTGATGAGTAAATGAGCTGTGATACAGAGAAATGAGAGCTTCA - 420  
 - L D C F R W V H E A V D T K E M E A L T  
 421 - CAATGGCAGATATGTTCCGCTACTAGCACTTGAAGGCTTTCAGAGTAAAGAGCT - 480  
 - N G I Y V R V H G N L K G P G G K K Q L  
 481 - TGATGCTTACTCMTCAAGCTGTTGATGACTCAATGAGATGCAAGCCACTTCAG - 540  
 - M A T V R P V D D T H E T A S E T A E  
 541 - AGTCAATTTATGCTACTAGCTCAAGAGCTTCAAGAGCTTCAAGAGCTTCAAGAGCTT - 600  
 - V I Y V H S Y H S R L R K Q Q D S S F M  
 601 - TGTCACTCAGTCCCTAGCTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACT - 660  
 - S A Q V F S S S F P T P L K G Y Q A S A  
 661 - CTCAAAATCAATTCCTGAGTCAACATGAGAGGATCGAGAGGATGATCAATGATGCT - 720  
 - S N Q P P G F N M D G I S G V H E M V L  
 721 - TGAGCTACTTGCACAGCCTATGCTGCTTCACTTGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 780  
 - D Y L Q Q P S C L A L E K G V H E R E L  
 781 - TTCTCAACAGCTAGAGTCCCTTCTGAGAGATCATGGAGCTAAGAGCTTCAAGCT - 840  
 - A G Q L R V P S E E I H S A H E R L E S  
 841 - CTGAGGCTTGTATCTCAAGATGAGAGGCTTCACTCAAGCTTCACTCAAGCTTCAAGCTT - 900  
 - E L I Y S T I D F H T E S T H A \*  
 901 - GATGTTGATGAGAGAGTGAATGATGAGAGATTTATGCTTGTCTTCAATGATGAT - 960  
 - W L M W S V K L I S N L \* L C L B C V Y  
 961 - ATGATGAGTTTGTGATGAGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 1020  
 - A \* S P L V G D I V E L T S H C L L \* T  
 1021 - CCAGTTGCTGATGAGAGTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTT - 1080  
 - M F A S F \* Q L Q L E P H P Y L E L F Q  
 1081 - AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA - 1122  
 - K K K K K K K K K K K

ATPase vacuolar (AJ879064)

1 - AMCTTTCGCAATCGATTCTCAACTCCGATTCACAGAGTGTGTTGAGTTTATAGACGA - 60  
 ~ L S A I D S Q L R F H A V V ~ V L ~ T R  
 61 - GAATGGAATCTAGCGGGGCTGCCMAATGGAAATTCAACTCCCTTTTACTCCCGGCGAG - 120  
 ~ M E S S R G C G Q N E T Q L L L A R E Q E  
 121 - AAGCCCAACACATCCTCAATATCTGCCAGGACTGCTAAACAAGCTAGATTGAGCAGGCCA - 180  
 ~ A Q H I V N T A R T A K Q A R L K Q A K  
 181 - AGGAGGAACCTGAGGAGGAGTAGCTGAAATCCGCTCTTACATGAGGCGGCTTTCAGA - 240  
 ~ E E A E N E T A E F R A Y M E A E F Q R  
 241 - GAAGCTTGAACAAGCTAGTGTGACTCAAGTCCATAATGTCACACGGCTTGGCTAGAAA - 300  
 ~ K L E Q T S G D S G A N V K R L E L E T  
 301 - CAGACGAAAAGATCCAGACCTGAAAGACTGAAAGCTCAGAGTCTCCTCTGATTTSTCA - 360  
 ~ D E K I E N L X T E A S R V S S D V V K  
 361 - AGATGCTTCTGAGCATGTGACGACGCTGAGAACTAGAGTATTTTGTGGTGTCTATTAA - 420  
 ~ M L L R H Y T T V K H ~ D I L W L S L R  
 421 - GGCTATTAAGCCAGTAAAGGCTTAATGTCAATTTGCGAATTTATGCTCCCGCCATTAA - 480  
 ~ H I E A R N S L N S P C F M L P F M  
 481 - TGCTTCTCTGCTTGAATCACTCCGATGGATGCTCAGAGTGTATATTTTGTGATCACTAA - 540  
 ~ V L L D G S D G C S Q P V I Y  
 541 - TTTATGCTTGGTGTGTTGAATAAGTAACTCACTGAGCTCTTTTCGAAAABAAAAAA - 600  
 ~ Y V L C ~ I K ~ L T R A L P K K K K K  
 601 - AAAAAAABAAAAAA - 617  
 ~ K K K K K K

ORF 1 (AM040275)

1 - TTTTITTTTCTCAGGAGCGCGCAATGTTGTTGTAACCGGGAATTCGGCAATTAC - 60  
 ~ P P F E S G S A P L C W Y P G I R P L R  
 61 - GGCGGGGCGCTTTCCAAATTAAGCCTAACATCCTAABAAATCAATTCATTTTCTCT - 120  
 ~ P G A L F Q L K P N I L M I N F I P L F  
 121 - TCTTCGATTCACATACTCTCAAAAAGTATGCTACTTCATGACATGCGCGCTCCTC - 180  
 ~ P D P S Y I S K P M A T S L T M A A A R  
 181 - GAGTCCAGCCTTCAATGATACCCACAACACCCTTCACCTCTTGTTCAGCGCCGCA - 240  
 ~ V A A F N R L P T S T T S T L V Q R R S  
 241 - GCTTTCCCGCCAGCTGATCATGAGCCTTAAAGGTCATTCCTGGAAAAGAACAA - 300  
 ~ F A G A A D H N G S P P K V N C W K E P M  
 301 - TGANTCCTGCTCAATGAGGAGGAAACATTTTGTGATGATCTTGTCCGGTGGGCTC - 360  
 ~ N P A Q N K E E R F V I V S L S G H L  
 361 - TGCTTTTATGGTGGATACAGTATTTCTACTCGAGGGAAGAGACAAAGACAGATTT - 420  
 ~ I P Y G S T E I P T G S K N N E E E N L  
 421 - TGGTGCAAGCACCCAAIAGGGTGGGAAITTCCTTGCATACATAGAGGTTCCGATAI - 480  
 ~ V Q A T Q ~ G W E F T L N H E T E V R I F  
 481 - TCCAGTCCGAAATGAGAGTTCCTCTAATATATACACTTATCATACACTTATATAGA - 540  
 ~ Q V R N ~ E V P S N N T T Y S T T Y ~ T  
 541 - CATTCAATCTCATTTTATGAAATCTCTTTATCATATATAAAAATTAACAAGAGCCTGTAA - 600  
 ~ P N L I L ~ I L P I I I K I T R E P V S  
 601 - GCTACTAATGGTGGACAAAATCGGTTGCATCAATAGTGCACACGCTTCTTTTCTTG - 660  
 ~ Y ~ M V D K E R L N Q ~ C H T L L P L V  
 661 - TATACCTGATAAATGAACTGTTTTTTCGAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAAA - 720  
 ~ Y R D K N H C F L Q K K K K K K K K K

Proteína con dedo de zinc (AM040274)

1 - ATCTGGACGACITTTTITTTTCDCGGGAMCGCCCATGDTTATACCCGGAATTC - 60  
 - I N T S P P P P S S S A P L C C T R E P  
 61 - GGCAGCCTAATAKAAAGCCCTGGTITTCCTGATCGGCTTGGCTTTGCGACTGG - 120  
 - G R A M I K S L V P C \* I G L G P C D H  
 121 - AAGTTCGATACAGATATATCTGATGAAATGCAAGACTCAACTACAGGGCAATTGCA - 180  
 - K F P I Q I Y L S E M Q D S T T R A F A  
 181 - AGCTTCTTCTTCTTCTCTGGGATGGAAAGATGCTGGTATTTGATGCAACATC - 240  
 - S S S S S S G D G N H D A G D F E C H I  
 241 - TGTTTGAATGGCCAGATCCATGATGACACTCTGTGTCTATCTATCTGCGCCA - 300  
 - C F E L A Q D P I V T L C G H L Y C N F  
 301 - TGCTTTATAGATGGTACTCTTCAACCAGTCCAGAAATGCGCTGTCTGCAAGCA - 360  
 - C L Y R W W L R L H P Q C H E C F Y C R A  
 361 - CTATTCAGAGGGGAATTAATTCCTTATGCGAGGGAGGACTTTACTGATGCC - 420  
 - L I G E H L V P L V G R S R T F T D P  
 421 - AGATCAGAACCAATCCCGGCTTGAATTCCTAGAGGCTCTCTGACACAGACTGAA - 480  
 - R S K P I P S L E I P S R P A G Q R E E  
 481 - ACTGCTCTCAGCCTGAGCAATTAATTTCTTACTGATGATTTGGTCAATGGAGGA - 540  
 - T A P Q D E P N H P P H L G P G H M G G  
 541 - TTTTTCAGCAGCACTGCAAGATTTGGTAATTTTGGATTTCTGGTGGTGGTGG - 600  
 - F P P T A T A R P F G N P S M P A G F G G  
 601 - TTGCTCCCTCATTAAGCTTCAAGITTCATGATTTCTGGTCCAGACAGCTATCT - 660  
 - L L P S L L S P Q F H G P P G P T A Y P  
 661 - ACCAGTCAAGCCCTTTGGATACCCCTTGCATATCATGGTGCACATGTCGTAAT - 720  
 - T T S H N P P F G Y T P A Y H S A H V R H  
 721 - GCTCAGACAGCCCAAGTCAAGCGGATGCACTCAAGTTATGTTTACTTGT - 780  
 - A H D T A Q V Q A D S H L K F M P L L V  
 781 - GGTTTCTGTCGATTTATTTGTTGGGCTAATGATGGATTCAGCTATTCCTGATCC - 840  
 - G P L V L I Y L L G \* \* M D S V Y S \* S  
 841 - TAAGTTGCTGTGAGATTTGTCGATGATTTGATGATGCTGGACTTTGTAATTTA - 900  
 - \* C W L S D P V H V I C R C H N H P V H L  
 901 - ATGTACCGATTTAATTTCTGTAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAA - 958  
 - M \* P V Y I S V E K K K K K K K K K K

Proteína asociada a receptor (AJ879936)

1 - CGCCCTGTTGTTGTAACCCGGAAATCGCCATTCAGCCCGGAGGACGCAAAAATA - 60  
 - R A I V L V P G E S A I T A S D T Q H V  
 61 - AACCTCCGATTCAGAAATTTGTTGAGAAATACGAAAAGATGAAACCAAGCTTAT - 120  
 - N L P H S E V C \* R I S E K M W N Q P Y  
 121 - CGAAATATACGTTGAAAGCCGCACTGCACTTTGATGCGGAGATGTTGGAAAGCCCT - 180  
 - R K Y D V E A G T A P L Y P E N L E S P  
 181 - GAAGTCCGCTGGCTTACTCGAAAGTCTACTCGAATAATACTATACAGTTCCTCTA - 240  
 - E L R W S P T R K V Y S I I T I Q L L L  
 241 - ACCATGCTGTTGCTCCCTGCTGCTCACCTTCATCGAATTTCTCACTTCTTGCAGC - 300  
 - T I A V A S V V V T V H P I S H F P A T  
 301 - ACAGTGCAGGATGAGATTTATTTGTTCTCGTAATCACTCCCTTATCAGCTGTGC - 360  
 - T S A G I S V Y T V L V I T P P I T L C  
 361 - CGGTGTATTAATACAGCAAGCACTCTGTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT - 420  
 - P L Y T V H Q K H P V H Y L L L G L P T  
 421 - GTTCTCTTCTTACTGTTGATTTGATGCTGCGCATCAACAGCCCAAGTAAATCTG - 480  
 - V S L A F T V G L T C A P T S G K V I L  
 481 - GAGGAGTCACTACAGCAAGAGGCTGGATGATGCTGACAGCAGATACCTTCTGGCA - 540  
 - E A V I L T T A V V I S L T A Y T P W A  
 541 - GCTAAGAGAGCCAGATTTCACTTCTGGGACTTCTGTTGCGGCTCTGTGTGTT - 600  
 - A K R G Q D P H P L G S F L P G A L V V  
 601 - CTCTATTGTCTTCTTAATCGATCTTCTCTGCTGAGATGAGATTCAGTGTATGATC - 660  
 - L L L P S L I Q I F P P L S K I S V H I  
 661 - TATGCGSCTTGGCAGCAGTCAATTTCTGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 720  
 - Y G S L A S I T P C G Y K V Y D P D H L  
 721 - ATCAAGCCCTCACTTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 780  
 - I K R Y T Y D E Y I W A A I S L Y L D V  
 781 - ATCAATTTGCTTTCCTATGACCTTCTTGGGCTGCTGCAATTAAGAGAGAA - 840  
 - I H L P L S L L T I P R A A D H \* R B E  
 841 - GCGAGACTAATTTCTGCTCATGCTGCAATGCTTATCATTTTATAATACAGAAAT - 900  
 - S G Y \* P L S H V H G L S Y P I \* Y R H  
 901 - TTAATTTCTTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 960  
 - L V S F V M D G L L I D H C I A R P L S  
 961 - TAGAGAGACTGATCTTATTTGCAAAATAATATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT - 1020  
 - \* E F C I Y F A H Y D I H \* E G W K K K  
 1021 - AAAAAAAAAAAAAA - 1047  
 - K K K K K K

Transportador ABC (AJ879065)

1 - CTCTTAAAAAACCTCGTCTCTCTCTCTCCACACAGCTGCACTACACAATTTACTC - 60  
 \* L \* K \* S \* R \* S \* I \* L \* N \* T \* A \* A \* L \* E \* K \* F \* T \* G \*  
 61 - AAATTCTCCATATCCCTAGATCTATCTATCTTTCTCAGAATGGTTCGAAATCCAGCAAGA - 120  
 \* I \* S \* P \* S \* V \* P \* L \* P \* S \* K \* M \* V \* S \* D \* A \* A \* K \* E \*  
 121 - AGAAGATGCACAG - 180  
 \* R \* D \* A \* Q \* K \* K \* A \* A \* A \* A \* A \* R \* R \* E \* G \* G \* F \* G \* A \* A \* T \*  
 181 - CCTCAGAGCAGCTCCAGCAG - 240  
 \* S \* K \* A \* A \* A \* A \* K \* G \* A \* A \* A \* E \* S \* N \* G \* V \* D \* S \* L \* R \*  
 241 - CTATAGGAATAGGAGATCTAAGATATCCGATCGAGCTTGACTGCTGTTTGTGTTGCGC - 300  
 \* N \* G \* I \* G \* D \* L \* K \* I \* S \* D \* R \* T \* C \* T \* G \* V \* L \* C \* S \* N \*  
 301 - ATCCGCTTTCAGAGGATATTCGATAGAAATCTTATCAGTCACTTCCACAGGATGATC - 360  
 \* P \* L \* S \* R \* D \* I \* R \* I \* E \* S \* L \* S \* V \* T \* F \* H \* G \* N \* D \* L \*  
 361 - TTATAATTGATTCGAACTGGAGCTCAACTATGCGAGAGTATAGGTTTGTGAGATTGA - 420  
 \* I \* V \* D \* S \* E \* L \* E \* L \* E \* Y \* G \* R \* R \* Y \* G \* L \* L \* G \* L \* N \*  
 421 - ATGGCTGTGGAGATCTACTCTCTACTGCTATAGGCTTGGGGAACTTCCATCCAG - 480  
 \* G \* C \* G \* E \* S \* T \* E \* L \* L \* T \* A \* I \* G \* L \* R \* E \* L \* P \* I \* P \* E \*  
 481 - AGCAGAGGATATTTTCACTCTTCAAGGGAGATCGAGGCTCTGAGATGACCTCCCTTG - 540  
 \* H \* M \* D \* I \* F \* H \* L \* S \* R \* E \* I \* E \* A \* S \* D \* N \* I \* S \* L \* E \*  
 541 - AGGCTGTCAATCAATGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 600  
 \* A \* V \* I \* N \* C \* D \* E \* E \* R \* L \* Q \* L \* E \* K \* E \* A \* E \* A \* L \* A \*  
 601 - CTGAGCGAG - 660  
 \* S \* R \* D \* D \* G \* S \* T \* Q \* L \* E \* R \* I \* V \* E \* L \* E \* A \* M \*  
 661 - TGGATGCAAGCAGCTCTGAG - 720  
 \* D \* A \* A \* T \* A \* E \* K \* R \* A \* A \* E \* I \* L \* P \* G \* L \* G \* F \* D \* K \*  
 721 - AGAAGATCAAGCAAG - 780  
 \* K \* M \* Q \* A \* K \* K \* T \* R \* D \* F \* S \* G \* G \* H \* R \* M \* R \* I \* A \* L \*  
 781 - TTGGCGAG - 840  
 \* A \* R \* A \* L \* P \* M \* N \* P \* T \* I \* L \* L \* L \* D \* E \* P \* T \* E \* N \* L \*  
 841 - TTGATCA - 848  
 \* D \* L \* X

Proteins inducida por fosfato phi-1 (AM040267)

1 - GTGCTCTGAAAATTTTCCCTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 60  
 \* V \* L \* E \* E \* N \* Y \* S \* L \* G \* K \* S \* L \* T \* Q \* N \* Q \* I \* V \* Q \* L \*  
 61 - GCATCAG - 120  
 \* A \* S \* K \* E \* G \* R \* H \* A \* T \* H \* I \* V \* L \* T \* A \* S \* D \* V \* A \*  
 121 - GTTATGAGGATCTGATCAATCGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG - 180  
 \* V \* D \* G \* F \* C \* V \* W \* R \* C \* G \* T \* H \* G \* S \* S \* K \* G \* R \* I \* Z \*  
 181 - AAGGATAG - 240  
 \* K \* G \* K \* T \* Y \* T \* F \* D \* Y \* I \* W \* V \* G \* S \* S \* E \* T \* L \* C \* P \*  
 241 - GGATCTGAG - 300  
 \* S \* Y \* C \* A \* W \* F \* P \* Q \* P \* I \* Y \* G \* D \* S \* P \* D \* G \*  
 301 - GCGGAG - 360  
 \* A \* P \* H \* W \* D \* V \* G \* V \* D \* G \* M \* V \* I \* H \* L \* S \* L \* A \*  
 361 - GGAG - 420  
 \* S \* T \* A \* T \* H \* P \* F \* G \* H \* G \* Y \* Y \* Q \* S \* E \* A \* D \* A \* P \* L \*  
 421 - GAGGAG - 480  
 \* E \* A \* A \* F \* A \* C \* P \* G \* V \* Y \* A \* K \* G \* A \* Y \* P \* G \* Y \* A \* G \*  
 481 - GATTTATGAG - 540  
 \* D \* L \* L \* V \* D \* K \* T \* T \* G \* A \* S \* Y \* N \* A \* N \* S \* T \* U \* G \* R \*  
 541 - AAGTACTGAG - 600  
 \* K \* Y \* L \* V \* B \* A \* L \* P \* D \* P \* F \* T \* S \* S \* C \* S \* T \* L \* V \* \*  
 601 - TCTGAG - 660  
 \* S \* R \* K \* \* \* M \* A \* V \* V \* K \* \* \* C \* V \* F \* C \* P \* T \* S \* C \* T \* R \*  
 661 - AG - 720  
 \* R \* R \* S \* \* \* C \* S \* I \* V \* V \* H \* T \* V \* I \* F \* D \* S \* F \* I \* C \* F \*  
 721 - GAGGAG - 780  
 \* E \* V \* E \* N \* \* \* R \* A \* N \* C \* P \* G \* L \* L \* S \* \* \* R \* K \* K \* K \* K \*  
 781 - AAAAAA - 795  
 \* K \* K \* K \* K \* K \* K \*

Proteína inducida por auxinas (AM040278)

1 - AGGACGCAAAATAGCTTTGGTACTGTCTGCCAAATGGAGGGTCTTAATTTCCTTC - 60  
 - D S K I S F W Y C L P W G G S L V F S L  
 61 - TTCCTTCTCTCTCTCTCAAAACCAAAAACCTTCACTACTCCACCATCACTCTT - 120  
 - P P S L S T T Q K E W F T T P P S P S S  
 121 - CTCA - 180  
 - S S S S S F V L L L L L L H L D L F E  
 181 - ATTTCACCTTGGGTTTCTCTTCAATCAAAATCAALATTGAGTTCACTAGCTGT - 240  
 - P Y L G F L L Q V Q I N N F E V H S A E  
 241 - AAGTATTAAATTAATTAATTTGTAATCTCCACCCTCTTGGTSTTGGCGAGAGGG - 300  
 - V F E \* P I I V M S P P L L G V G E E E  
 301 - AGGGCCAGATTAATTAATCTACTGAGGTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAAA - 360  
 - G Q S N V T L L L S S S P S L S I C Q K  
 361 - AAGGATTAGCACTTAAGAGCGAAACTATATGGGCTTTCGATTGTTCTCTCTCTCTCA - 420  
 - G L A L K E R N Y M G L S D C S S V D S  
 421 - GCTGCAATATTCCTCTCATCAGAGGATTAACCGTCTCGGATTAATCTCTCTCTCA - 480  
 - C N I S T S S E D S N G V G L H L K A T  
 481 - CGGAGCTCAGCTCGGCTCTCCAGGATCCAGCTCTCCGAGCGGSCACAGCCCTTCTC - 540  
 - E L R L G L P G S Q S P E R S T A P C P  
 541 - CTTTGGCTCTACAAAAGGTGATGAGAGCTGCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAAAA - 600  
 - L G S T K V D E K L L F P E P A K D T  
 601 - CTGCTTCAATG - 660  
 - A F S V E Q K T V V T S H R G F S D A  
 661 - CTATGGATGGATTCT - 720  
 - M D G F S E G K F L S N S G V K A G D A  
 721 - CAAGGAGACT - 780  
 - K E T S R V Q P P K L K D A N T Q G T V  
 781 - TTCTAGGAGGCTTCT - 840  
 - L E E P S A V N E A S N R A S S G A P A  
 841 - CTCAAGGCT - 900  
 - T K A Q L W V G H P P D L L E R T H \* P  
 901 - CTCTGCTCTCAAGAACAAAGAGGGTGGATGGAAGGCTGGATCCAGCTCTCTCTCTCTCT - 960  
 - L P Q R T T K R W M E R L D H Q L P S L  
 961 - TAGGTAAGCATGAGGTGCT - 1020  
 - R \* A W M V L P T L R E V D L R F I S A  
 1021 - CATCCAGGACT - 1080  
 - Y G E L S A L E E M P S C P T I G Q Y  
 1081 - ATGGTCT - 1140  
 - G S E R A P G K E M L S E S H L K D L L  
 1141 - TTCTAGGATCT - 1200  
 - H G S E Y V L T Y E D R D G D W M L V S  
 1201 - GTGATCT - 1260  
 - D V P H E M P I D T C K E R L R I M K S S  
 1261 - CAAGTGGCT - 1320  
 - D A I G L A P R A M E K C R S R W \* P I  
 1321 - TCTACACTGCTTGAAGCTATCCATCCAGCATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT - 1380  
 - Y T F L K L S I G H Y \* E R K T G D S  
 1381 - GATGAGGGGCT - 1440  
 - R G P T T \* T F E R L E V A C C H S  
 1441 - CTCTGACGCGCAAGCTGGGATGCTTTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT - 1500  
 - H T A Q A N V D A L S N Y H M V P L Y I  
 1501 - TTCCGCTGATATATCT - 1560  
 - R V I Y V L \* A L Y L V S Y L K E P F D  
 1561 - ATATTGGATCT - 1620  
 - I G V C K L M C V V Y C V L L D V I \*  
 1621 - AATGTTTTAATGATGCTTCT - 1680  
 - C F E C I A C \* S S P K L C I L D P S L  
 1681 - TGCTGTTGATTCATATGCT - 1740  
 - S F D S I C V E R T \* E I V I S V L R N V  
 1741 - TGCTCTCAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAA - 1774  
 - S S K K K K K K K K K K K K

Proteins NPR1 (Non expressor of PR genes) (AM00559)

1 - ACTTCTCCGGCTGAAAATCAGTTCCTCCGAAAGCTCTCCAGAAATACAGAACTATATTC - 60  
 1 - T S P A E I T S L K R L S E I L E S I F - 20  
 61 - GATTCTTCTTACCGGACTTCGACTTCTTCGCCGACGCCAAGCTTGTGGTTTCCATCGGT - 120  
 61 - G A T T C T T C T T A C C G G A C T T C G A C T T C T T C G C C G A C G C C A A G C T T G T G G T T C C A T C G G T - 120  
 21 - D S S S P D F D F P A D A K L V V S I G - 40  
 21 - D S S S P D F D F P A D A K L V V S I G - 40  
 121 - AAGGAAATTCGGGTGCACCGGTGTAATTTGTGGCCGAGGAGCTCTTTCITTAGAATGTA - 180  
 41 - K E I P V H R C I L S A R S P F F E N V - 60  
 41 - K E I P V H R C I L S A R S P F F E N V - 60  
 181 - TTCTCGGAAJAGAAAGGAGACGAACTGGAUACTGAGAGACTGATGAAGAGTATGAG - 240  
 61 - F C G K E R K T R L S L K E L M N E Y E - 80  
 61 - F C G K E R K T R L S L K E L M N E Y E - 80  
 241 - GTGAGTATGATGCTCTGGTGAATGTTGTGGCCATTTGTATAGTGGAAAGTTAGCCCT - 300  
 81 - V S Y D A L V N V L A Y L Y S G K V R P - 100  
 81 - V S Y D A L V N V L A Y L Y S G K V R P - 100  
 301 - TCACCTAAGATGTGTGTGTTTGTGTGACAAATGAGTCTTTCATGTAGCTGTAGGCCA - 360  
 101 - S P K D V C V C V D N E C F H V A C R F - 120  
 101 - S P K D V C V C V D N E C F H V A C R F - 120  
 361 - GCAGTGCCTTCTTGTGTTTTCAGGTTTGTAGCATCTTTCACCTTCAGATCTCTGAATTG - 420  
 121 - A V A P F L V Q V L Y A S F T P Q I S E L - 140  
 121 - A V A P F L V Q V L Y A S F T P Q I S E L - 140  
 421 - GTGGCAAGTTTCAGAGACCTGTGTGATATTTTACAAAGCTGACGACAGATGTA - 480  
 141 - V D K F Q R H S L D I L N K A A A D D V - 160  
 141 - V D K F Q R H S L D I L N K A A A D D V - 160  
 481 - AFRATGTTTATCTGTTGCAAACTTATGTTGTAAGCTGTGGAAGATTGCTTGAAGC - 540  
 161 - N H V L S V A H I C G K A C S H L L S S - 180  
 161 - N H V L S V A H I C G K A C S H L L S S - 180  
 541 - TGCATGAGTATATGTCAGACTATATGTAATATATAGCCCTTGAATAGCCCTTGCCT - 600  
 181 - C I E I V K S H V D I T L D K A E E - 200  
 181 - C I E I V K S H V D I T L D K A E E - 200  
 601 - AARGCATGCTAACAATAATACGATTCAGGCACTGACTTGAATCTCAAGGCCCTGTA - 660  
 201 - N D I V K Q I T D S R T E L D L Q G P V - 220  
 201 - N D I V K Q I T D S R T E L D L Q G P V - 220  
 661 - AACCATGGTTTCTGATTAACAATGTTAAGAGGATACATAGGCCATTAGACTCTGATGAT - 720  
 221 - N H S P P D K H V K R I H R A L D S D D - 240  
 221 - N H S P P D K H V K R I H R A L D S D D - 240  
 721 - GTGAAATGACTAAGGATGTTGCTTAAGAGGGGCACTACTACTTASATGATGCTATGCT - 780  
 241 - V E L L R M L L R E S G H S T L B D D A Y A - 260  
 241 - V E L L R M L L R E S G H S T L B D D A Y A - 260  
 781 - CTCACATGCTGTAGCATATGCGATGCAAGACTACATCAGAATTTAGATCTATGCA - 840  
 261 - L H Y A V A Y C D A K T T S E L L D L A - 280  
 261 - L H Y A V A Y C D A K T T S E L L D L A - 280  
 841 - CTGTCTGATGTTAATCACCAAAATCTAGAGGATACACGGTGTCTCATGTCTGCCATG - 900  
 281 - L A D V N H Q N P R G Y T V L M V A A M - 300  
 281 - L A D V N H Q N P R G Y T V L M V A A M - 300  
 901 - AGAAAAAGCCATAAAAATATAGTGTCCCTTTTAAACCAAGGAGCTAGACCTTCTGATCT - 960  
 301 - R K E S P K I I V S L L T R G A R P S D L - 320  
 301 - R K E S P K I I V S L L T R G A R P S D L - 320  
 961 - ACAATCCGATGGCAGAAAGCACTTCAAAATGCAAAAGAGGCGCACTAGGCTGTGATTTT - 1020  
 321 - T S D G R K A L Q I A K R R R E R L V D F - 340  
 321 - T S D G R K A L Q I A K R R R E R L V D F - 340  
 1021 - ATTAGTCTACAGAGGAGGAAATCTACTCAAAGGATCGGTTATGCAATGAAATCTA - 1080  
 341 - I K S T E S G K S T P K D R L C I B I L - 360  
 341 - I K S T E S G K S T P K D R L C I B I L - 360  
 1081 - GAGCAACGAGAAAGAGATCCACACTTGGAGAGCTTCAGTATCTCTTGTCTATGGCA - 1140  
 361 - E Q A E R R D P L L G E A S V S L A M A - 380  
 361 - E Q A E R R D P L L G E A S V S L A M A - 380  
 1141 - GGGGATGATTTGGGTA TGAAGCTGTATACCTTGA AAA TAGAGTTGGTCTGGCTAAACTC - 1200  
 381 - G D D L R M K L L Y L E N R V G L A K L - 400  
 381 - G D D L R M K L L Y L E N R V G L A K L - 400  
 1201 - CTTTTCCCTATGGAAACAAAAGTTGCAATGGACATGCTCAAGTTGATGGCCTATCTGAG - 1260  
 401 - L F P M E A K V A N D I A Q V D G T S E - 420  
 401 - L F P M E A K V A N D I A Q V D G T S E - 420  
 1261 - TTCCCTTGGCTAGCA TCAGGAAGAGATGGCTGATGCACAGAGGACACAGTGGATTG - 1320  
 421 - F P L A S I R E K M A D A Q R T E V D E - 440  
 421 - F P L A S I R E K M A D A Q R T E V D E - 440  
 1321 - AAGAACTCTTTCAGATGAAAGAGGAGCACTTGAATCGGCTTATGGCCCTCTCTGAA - 1380  
 441 - N E A S F F M K S E H L E R L M A L S E - 460  
 441 - N E A S F F M K S E H L E R L M A L S E - 460  
 1381 - ACTGTGACTTGGAAAGCCCTTCTTCCAGTTTGTGCAAGTTCTAATAGATCATG - 1440  
 461 - T V E L S K R P F F R C S E V L N K I N - 480  
 461 - T V E L S K R P F F R C S E V L N K I N - 480  
 1441 - GATGCTGACTTGTCTGAGATAGCTTACATGGGGAATGATACGCCAGAGGCCCTAA - 1500  
 481 - D A A D D L S E I A Y N G N D T P E E R Q - 500  
 481 - D A A D D L S E I A Y N G N D T P E E R Q - 500  
 1501 - CTGAGAGGAAAGGTACATGGACTTCAGAAATCTGACCAAGCGTTACTTGGAT - 1560  
 501 - L K K E R Y M E L Q E I L T K X P T E D - 520  
 501 - L K K E R Y M E L Q E I L T K X P T E D - 520  
 1561 - AAGAAGAT - 1569  
 521 - K E D X - 540

Faster de transcripci3n WRKY1 (AM00560)

1 - AACTATGCAATTCACCTTCCGATTTCAGACTTCCCCTTTAGTGCCTTCTTGTAT - 60  
 1 - NYAFSSSQPHETSPFSDLLLED - 20  
 61 - AATATGATGATATATACACACACAGACTGGGGATTTAGTTCAGAGATTTATGAT - 120  
 1 - NFDHSHHAEHSPFYGRINH - 40  
 121 - TCAATTAACAAGATGAGTTCCAGAGTCAAGTCTTTCCAGCTGCTCTTGCCTTAG - 180  
 41 - SINKKDEVPKFKSFPFESLPH - 60  
 161 - ATCTCTTCTGACACAGCTCTGCTCTCTTATCTGCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCT - 240  
 61 - ISSSSSPAPSPSSYLAEPNLS - 80  
 241 - CCGTCTCTCTTTTGGACTCACGGATTGTTGACAAATCCGATCACTCTCCAGACCA - 300  
 81 - FSVLLLDSPVLFHNSHTLSP - 100  
 301 - AGACAGGAGTTTGGTATTGAAATCCAGAGGATTAATCCAGAGCTGTATGATTTC - 360  
 101 - TFGSFLSHSKSDHSSVSDP - 120  
 361 - TCTTCCAGATGAGCTGCTACTCTGACTCAATMTTCAGCTCTCTGCTCCAGAGAC - 420  
 121 - SPSHAKPATSSSIXNSSAPRN - 140  
 421 - TCAATGAGACTTAATACACAGCACACAGACACTGAAATTCACAGCAAAATY - 480  
 141 - SLDLIDLITRQQQTTEFSTAKI - 160  
 481 - GGGTGAATCAGAGATGCTCCAAATCAAGTTTCCAGAGAGAGTGCAGATTAAT - 540  
 161 - GVKSEVAPIQSFSQSHMQSH - 180  
 541 - CCGCCAGTGCATTAATCTCTCACTCTCAATATTTAGAGACAGAGCAGAGAT - 600  
 181 - PAAHHXEQPQYVRESQKAED - 200  
 601 - GGTATTAATGGAGAAATATGGCAAGAGCAAGTAAAGGAGTGAATCCCGAGC - 660  
 201 - GYNHAKKYGGKQVKGSBNPRS - 220  
 661 - TATTAAGTGTAGGTTTCTGATTTCTTACAGAGAGAGGTGAAGGAACTTGGAT - 720  
 221 - YFKCTFFFCPTXKXVBRMLD - 240  
 721 - GAGACATTAAGTATGATGAGAGGGAGCAGATCAATCCAGAGCTCAATCCAGC - 780  
 241 - GHIITEIVYKGSNHNHPKXQSY - 260  
 781 - AGAATCACTCCACAACTGACTCAGAGCTGCTCTGCTCCAGCTGATTAACAAAT - 840  
 261 - RASSAQSEIQHLLAYSHLIDITN - 280  
 841 - CAGCAATGCTTTCTGAAAATSCAAAGGATTCCTTGGCGATCAGAGACTCT - 900  
 281 - QFNAFLEBBAQRDSLAVYDHS - 300  
 901 - TCGCTCTTGTGAGTGGAGTGTGCTGAGAGGCTCTCGTCTGATTAATCGAGGAA - 960  
 301 - SASFGDDEVDQGSPTSKSSS - 320  
 961 - AATGATGAAATGAACTGAGCAAGAGATGAGAGAGACATTAAGAAAGAGTCKFA - 1020  
 321 - NDBNHSPBAKAKKGDHNSNVSX - 340  
 1021 - TCAATGCAATGAGAGTATGCTGAGCTGAAATGATGATGAAATGAGAGAGT - 1080  
 341 - SSSARSZYRESFRIVVQTESDI - 360  
 1081 - GATATCTTGAATGTTTATGATGAGAAATATGAGCAAAATTTGCAAGGCAT - 1140  
 361 - DILDGYSNRKYGQHWVRES - 380  
 1141 - CCAACCCAGAAATGACTCAAAATCACATTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG - 1200  
 381 - PNPFSYKCTFLQCPVRKHW - 400  
 1201 - GAGCAGCCTCCCTGATGAGACAGTATCACTTATGAGAGAAACATGACCAT - 1260  
 401 - BRASNDLRAVITTYSGKHNNH - 420  
 1261 - GATTTCTCCAGCAGCTGTGAGCTATGCTGCTGATTAAGCTTCACTTGGAGC - 1320  
 421 - DVFAARGSSYSNKKPSSS - 440  
 1321 - AACATACATCCAGATGATCCAGGCTTCACTTGTGCTGATCAATCTTATCAGGA - 1380  
 441 - NNNHMPVVP RPBLLANHNSQG - 460  
 1381 - ATGAATGATGACATTAATTAACAACAGCAGTGTGAACCAAGATCACTTCAO - 1440  
 461 - MNVSNWTLFNTAQVEPPI TLQ - 480  
 1441 - ATGCTCAGAGCTGGAATTCAGTATTCAGGATTTGAGACTCAGAGGATTCAT - 1500  
 481 - MLQSSGSSYSFSTBSGSY - 500  
 1501 - ATBAATCAATGAGCCCGAGCACTTCCAGCTGATGAGCAAGAGAC - 1562  
 501 - MHNQMQPPTNHSKLIBKKEE - 520

