

**INMUNIDAD EN PLANTAS: PROTEINAS DE RESISTENCIA, EFECTORES Y
RUTAS DE SEÑALIZACION**

**MARTHA ESPERANZA AREVALO GONZALEZ
ESTUDIANTE DE MAESTRIA
BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA**

**IBONNE AYDEE GARCIA ROMERO
TUTORA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRIA EN BIOLOGIA MOLECULAR
Y BIOTECNOLOGIA
PAMPLONA
2015**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción	10
1. Tipos de resistencia	11
2. Proteínas de resistencia	15
2.1 Clasificación	15
2.2 Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos.	25
2.3 Reconocimiento de patógenos basado en las interacciones proteína-proteína	26
2.4 Reconocimiento de patógenos basado en interacciones proteínas-carbohidratos. los hidratos de carbono	28
2.5 Percepción de peptidoglicano mediada por proteínas LYSM durante interacciones planta-bacteria patógena.	30
2.6 Supresión de defensa del huésped mediada por proteínas LYSM durante las interacciones planta-microbio.	30
2.7 Supresión de la defensa del huésped mediada por proteínas LYSM durante las interacciones planta-microbio del lado planta.	31
2.8 Doble papel desempeñado por LYSM RLKS durante las interacciones planta-microbio.	32
2.9 Lectina dominios implicados en la inmunidad de la planta	32
2.10 Proteínas de membrana con dominio lectina	33
3. Los dominios estructurales proteínas NBS-LRR	35
3.1 El dominio LRR	35
3.2 El dominio NBS	35

3.3 El dominio TIR	37
3.4 El dominio COILED COILS	38
4. Mecanismo molecular de las proteínas de resistencia	39
5. Efectores	42
5.1 Efectores en bacterias	42
5.2 Sistemas de secreción tipo III	43
5.3 Sistema de secreción tipo IV	44
5.4 Sistemas de secreción tipo VI	45
5.5 Efectores en hongos y oomicetos	45
5.6 Mecanismos bioquímicos de los efectores	46
6. Rutas de señalización	50
6.1 Factores de transcripción	50
6.2 Ácido Salicílico SA	51
6.3 Ácido Jasmónico (JA) y Etileno (ET)	53
7. Hormonas asociadas a defensa	56
8. Técnicas de biología molecular en proteínas	57
8.1. Aislamiento, purificación y fraccionamiento de proteínas	59
8.2 Precipitación selectiva	59
8.3 Cromatografía líquida en columna	60
8.4 Determinación de las interacciones proteína - proteína	60
9. Electroforesis en gel de poliacrilamida	60
10. Medición y análisis de proteína	61
11. Conclusiones	62

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Resistencia gen por gen	14
Figura 2. Proteínas de Resistencia	16
Figura 3. Fuentes de diversidad genética en genes de resistencia	19
Figura 4. Dimerización y fosforilación de la proteína quinasa FLS2 en Arabidopsis	28
Figura 5. Motivos del dominio NBS	36
Figura 6. Hipótesis de guardia	41
Figura 7. Sistema Ubiquitina-Proteasoma	47
Figura 8. Silenciamiento de ARN del huésped como mecanismo de defensa	49
Figura 9. Señalización por S.A.	52
Figura 10. Regulación de respuestas de defensa en la planta por Etileno	55
Figura 11. Esquema del procedimiento para estudiar genes de expresión diferencial.	59
Figura 12. Técnicas bioquímicas y procedimiento para el estudio de proteína	61

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Genes de resistencia R caracterizados y clonados en plantas	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AVR	Proteínas de avirulencia (Avirulence)
Br	Brasinolesteroides
Ca	Calcio
[Ca]cit	Calcio libre en citosol
CC	Dominio Coiled – coil (Coiled-coil Domain)
CDPKs	Proteínas de calcineurina tipo B (Calcineurin B-like proteins)
CERK1	Receptor tipo quinasa de quitina (Chitin Elicitor Receptor Kinase)
CK	Citoquininas
COI1	Coronatine-intensive
CTR1	Respuesta triple constitutiva (Constitutive Triple Response)
DAMPs	Patrones Moleculares asociados a daños (Damage-associated molecular patter molecules)
EFR	Factor de elongación bacteriano (Elongation Factor-TU RECEPTOR)
EIN3	Proteína Ethylene Insensitive 3
ERF	Factor de respuesta al Etileno (Ethylene-Response-Factor)
EIN	Ethylene Insensitive
ET	Etileno
ERS	Sensor de etileno (Ethylene Sensor)
et al	et allí (y otros)

ETI	Inmunidad desencadenada por Efector (Effector-Triggered-Immunity)
ETR	Respuesta al etileno (Ethylene Response)
Flg22	Péptido de 22 aminoácidos de flagelo bacteriano
FLS2	Sensor de flagelina (Flagellin sensing)
GA	Giberelinas
HR	Respuesta hipersensible (Hypersensitivity Response)
Hrp	Mutante hipersensitiva response and pathogenicity
IAA	Auxinas
ICS	Isocorismato sintetasa (Isochorismate Synthase)
JA	Ácido Jasmonico
JAZ	Dominio Zin de jasmonatos (Jasmonate Zim-domain)
LPS	Lipopolisacaridos
LRD	Dominio rico de leucina (Leucine Rich Domain)
LRR	Repeticiones ricas en leucina (Leucin Rich Repeat)
MAMPs	Patrones moleculares asociados a Microbios (Microbe-associated molecular patterns)
MAPKs	Proteína quinasas activadas por mitogenos (Mitogen-Activated Protein Kinases)
MPK	MAP quinasa (MAP Kinase)
MKK	MAP quinasa quinasa (MAPK Kinase)
NB	Sitio de unión a nucleótidos (Nucleotide-Binding site)
NINJA	Novel Interactor of JAZ
NPR1	Nonexpresser of pr genes

OGs	Oligogalacturónidos
PAD4	Phytoalexin deficient4
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns)
PCD	Muerte celular programada (Programmed Cell Death)
PDF1	Defensina de plantas (Plant Defensin)
PGN	Peptidoglicanos
PR1	Genes relacionados con patogénesis (Pathogenesis-Related)
PRRs	Receptores de patrones de reconocimiento de patógenos (Pattern Recognition Receptors)
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato
PIT	Inmunidad desencadenada por PAMPs (PAMP Triggered Immunity)
PTO	Genes desencadenados por <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato (<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato triggers)
RPM1	Proteína Resistance to P. Syringae Pv. maculicola1
RLK	Receptor quinasa (Receptor Like Kinase)
RLP	Receptor de Proteínas
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SA	Ácido salicílico
TIR	Receptor Toll and Interleukin-1 (Toll and Interleukin-1 Receptor)
TIR-NB-LRR	Proteínas NB-LRR con el dominio TIR interleukin 1 Receptor
TPL	Topless
WAK	Wall-associated Kinase

INMUNIDAD EN PLANTAS: PROTEÍNAS DE RESISTENCIA, EFECTORES Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

Martha Esperanza Arévalo González
Estudiante de Maestría Biología Molecular y Biotecnología
Universidad de Pamplona
Colombia

Ibonne Aydee García Romero
Tutora
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de

INTRODUCCIÓN

Las plantas modernas tienen un repertorio inmunológico altamente sofisticado que consiste en una diversa percepción de señales y vías de señalización intracelular. Esta red de señalización es compleja y está profundamente interconectada, lo que probablemente refleja la diversidad de estilos de vida y estrategias de infección utilizados por la multitud de invasores fitopatógenos. Los mecanismos moleculares por los cuales las plantas perciben, reconocen y transducen las señales asociadas a la interacción con patógenos están siendo estudiados actualmente. Un hallazgo importante ha sido que las respuestas celulares a patógenos implican la reprogramación masiva transcripcional dentro del huésped [1]. Observaciones adicionales derivadas de estos estudios muestran, que los factores de transcripción (TFS) son a menudo los sitios de convergencia de la señal y que regulan la señal al actuar en concierto con otros TFS específicos para lograr la inmunidad de la planta. En este informe se describen los componentes de la inmunidad en plantas y algunos mecanismos moleculares ya establecidos, teniendo en cuenta las investigaciones hechas al respecto en los últimos años. [1, 2].

Los microorganismos son reconocidos por las plantas que utilizan receptores de membrana sensibles a patrones específicos de microbios, conocidos como MAMPS. Esta primera línea de defensa produce múltiples respuestas, incluyendo la activación de la cascada central de MAP quinasas (*Mitogen – Activated Protein Kinases*) e induce una reprogramación transcripcional masiva. [1] Durante esta respuesta, dos vías antagónicas modulan la ARN polimerasa II (RNAPII), un componente fundamental de la transcripción eucariótica. Un estudio genético en *Arabidopsis* identificó la *fosfatasa* CPL3 como un regulador negativo de la red de señalización inmune [3]. La CPL3 desfosforila residuos en el dominio C-

terminal (CTD) de la subunidad grande de RNAPII, alterando el código post-transduccional CTD', que controla el reclutamiento de proteínas accesorias para orquestar la transcripción. Aunque RNAPII está involucrada en la transcripción global, las mutaciones en CPL3 afectan predominantemente la expresión de genes relacionados con la defensa [3].

El flg22 MAMP induce la fosforilación de CTD, lo que sugiere la presencia de una vía antagonista adicional. Se han encontrado dos quinasas dependientes de ciclina que también contrarrestan los efectos de CPL3. Estos son sustratos de MAP quinasas implicadas previamente en la inmunidad de las plantas. Por lo tanto se establece la fosforilación RNAPII como un regulador dinámico de la expresión génica en respuesta de la planta a los microorganismos. [3, 4].

En la segunda línea de defensa conocida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*), los patógenos secretan efectores dentro de la célula, hasta la fecha se ha encontrado que algunos efectores son capaces de degradar o inactivar componentes de la PTI esto lo logran mediante su actividad proteasa al igual que por la manipulación del proteasoma 26S y la maquinaria de ubiquitinación entre otras. La respuesta ETI esta mediada por el reconocimiento y la interacción entre las proteínas de resistencia R de la planta y las proteínas de avirulencia del patógeno, AVR o efector, esta interacción puede ser directa o indirecta. [3].

1. TIPOS DE RESISTENCIA

La resistencia es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y desarrollo del patógeno o parásito después que ha habido contacto entre el hospedante y el patógeno o después que este ha iniciado su desarrollo y se ha establecido [5, 6]. La resistencia es una característica heredable y es controlada principalmente por el sistema genético nuclear y en algunos casos por el citoplasmático. La resistencia citoplasmática es controlada por unidades hereditarias dentro del citoplasma, ubicadas en los cloroplastos y mitocondrias [5, 6, 7]. La resistencia citoplasmática es transmitida a través del progenitor femenino y puede ser incorporada por la retro-cruza con el progenitor recurrente deseado, como padre, con la fuente parental deseada, como madre.

Genéticamente, la resistencia a enfermedades de las plantas se clasifica en dos tipos, la resistencia cualitativa o completa y cuantitativa o parcial, basadas en la

velocidad y la fuerza de la respuesta de la planta a la invasión de patógenos [5, 6, 7, 8, 9]. La resistencia cualitativa se rige por los genes *R* que codifican la inmunidad a través de una reacción de hipersensibilidad y se cree que es monogénica, específica, y con frecuencia de corta duración debido a la rápida adaptabilidad de los patógenos (*Ver Figura 1*). Existen ciertas ventajas cuando se trabaja con tipos de resistencia monogénica o específica. Las clases susceptibles y resistentes están basadas en la aparición o no de síntomas de la enfermedad y la selección de plantas resistentes en una progenie segregante es relativamente simple; también es simple la transferencia de esa resistencia específica de un germoplasma a otro. La resistencia cualitativa ha sido ampliamente utilizada en el mejoramiento de cultivos por su alto nivel de resistencia y de fácil manipulación. [5, 6, 7, 8, 10].

Sin embargo, esas formas de resistencia se pueden romper fácil y rápidamente con la mutación de un solo gen o, a veces, de pocos genes por parte del patógeno. La resistencia específica pone gran presión sobre el patógeno que para su supervivencia debe cambiar su especificidad mediante mutación [5, 6, 7, 8, 9].

La acumulación de datos genéticos y bioquímicos ha revelado que los mecanismos moleculares de resistencia cualitativa en arroz a la enfermedad del tizón tardío producido por la bacteria *Xanthomonas oryzae pv.oryzae* (*Xoo*) son en gran medida diferentes de los de la resistencia cualitativa en otros patosistemas planta-patógeno. Esta diferencia parece ser debida a genes de resistencia poco comunes [5, 6, 7, 8, 9, 10].

La singularidad del patosistema arroz- *Xoo* surge de los siguientes aspectos. En primer lugar, la resistencia cualitativa para *Xoo* es un tipo importante de respuesta de defensa en el arroz. Al menos 37 genes *R* para la resistencia a *Xoo* se han identificado [5, 6, 8, 10]. Sin embargo el repertorio de genes frente a otras especies del género *Xanthomonas* es menor, como *BS1 - BS4, BS5 y BS6*, que confieren resistencia a *Xanthomonas campestris. pv vesicatoria* causante de la mancha bacteriana en pimiento y tomate, se han reportado. No se han identificado genes *R* contra *X. oryzae pv.oryzicola* (*Xoc*), que causa la enfermedad de la raya bacteriana, en arroz, aunque *Rxo1*, una proteína de tipo LRR NB que confiere resistencia a *Burkholderia andropogonis*, causante de la raya bacteriana en el maíz, puede mediar una respuesta hipersensible a *Xoc* del arroz [5, 6, 8, 10].

Genes *R* contra las siguientes especies de *Xanthomonas* están aún por ser reportados: *X. axonopodis* pv. *citri* y *X. fuscans* pv. *aurantifolii*, que causan la llaga en los cítricos; *X. campestris* pv. *campestris* y *X. campestris* pv. *armoraciae*, que ocasionan pudrición y manchas negras foliares, respectivamente, en *brassicaceae*; *X. translucens* pv. *graminis* y *X. campestris* pv. *vasculorum*, que producen la marchitez bacteriana y enfermedades de engomado, respectivamente, en los pastos; *X. axonopodis* pv. *glycines*, que produce pústula bacteriana en soja; *X. axonopodis* pv. *manihotis*, tizón bacteriano de la yuca; y *X. vasicola*, que causa marchitez del banano. Aunque los efectores de especies de *Xanthomonas* fitopatógenas han sido ampliamente estudiados, no está claro si la resistencia mediada por genes *R* es simplemente un sistema de defensa importante o si son necesarios para mecanismos de resistencia más amplios. [8].

En segundo lugar, es común que los genes *R* que median la resistencia a la *Xoo* son regulados recesivamente. Catorce de los 37 genes *R* reportados contra *Xoo* son recesivos en la naturaleza [5, 6]. Sin embargo, la mayoría de los genes *R* caracterizados que confieren resistencia a bacterias, hongos, oomicetos, y nematodos actúan de manera dominante en diferentes especies de plantas [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Aproximadamente 100 genes *R* de arroz que confieren resistencia a *Magnaporthe oryzae*, que causa el tizón del arroz en todo el mundo, se han nombrado y la mayoría de ellos funcionan predominantemente [11]. La excepción es la resistencia de las plantas a los virus; aproximadamente la mitad de los ~ 200 loci de resistencia del virus conocidos son recesivos [10].

Por último, la resistencia cualitativa al arroz para *Xoo* parece estar regulada por diversos mecanismos. Aunque sólo siete *R* genes (*Xa1*, *Xa3* / *Xa26*, *Xa5*, *Xa13*, *Xa21*, *Xa25* y *Xa27*) contra *Xoo* han sido clonados, estos genes codifican diferentes tipos de proteínas, lo que indica la diversidad funcional en las interacciones arroz- *Xoo*. Al menos 19 genes contra *M. oryzae* se han clonado; 18 de ellos codifican proteínas de tipo LRR-NB y el gen *Pi-d2* codifica un receptor de lectina de tipo proteína quinasa localizado en la membrana plasmática [5,6, 8, 10]. Sin embargo, sólo uno (*Xa1*) de los siete genes *R* aislados contra *Xoo* codifica una proteína de tipo LRR NB, aunque el genoma del arroz contiene 623-725 genes NB-LRR [8, 11], lo que sugiere que las proteínas de arroz de tipo juegan papeles

importantes en la resistencia a *M. oryzae* pero no en *Xoo*. Los genes *R* regulan la resistencia del arroz a *Xoo* por diferentes mecanismos. [8, 10].

		PATÓGENO	
		Avr1, avr2	avr1, Avr2
PLANTA	R1r2	I	C
	r1R2	C	I

Figura 1. Resistencia gen por gen. *R1* y *R2* genes dominantes de la planta, mientras *r1* y *r2* son sus respectivos alelos recesivos. *R1* y *R2* confieren reconocimiento a patógenos que llevan el correspondiente gen de avirulencia *Avr1* y *Avr2* respectivamente, pero no el recesivo, *avr1* y *avr2*. La enfermedad ocurre únicamente cuando el gen de resistencia *R* está ausente, o al patógeno le falta el correspondiente gen de avirulencia *AVr*.

La resistencia cuantitativa horizontal se debe al efecto de múltiples genes de acción aditiva, se caracteriza por un desarrollo más lento de la enfermedad, considerada como raza no específica e influenciada por las condiciones ambientales. El mapeo de locus de resistencia cuantitativa (QRL) permite identificar múltiples loci con importantes efectos fenotípicos en todo el genoma y caracterizar las interacciones epistáticas entre estos loci contra un patógeno. Una característica importante de la resistencia horizontal es su mayor estabilidad y durabilidad debido al efecto amortiguador del sistema poligénico. Se ha observado que la resistencia horizontal y la resistencia vertical pueden coexistir y que la resistencia de cualquier planta puede ser una mezcla de ambos tipos en proporción [6].

Surge una pregunta interesante sobre el límite o relación entre la resistencia cualitativa y cuantitativa, por lo menos a nivel molecular no se tiene muy claro esta relación. Sin embargo, en algunos trabajos como en arroz, especialmente se ha trabajado en este aspecto. Por mapeo genético intensivo se han encontrado varias regiones cromosómicas que albergan QTL (*Quantitative Trait Locus*) beneficiosos.

A partir de estos QTL, fue posible identificar *pi21* el primer gen recesivo de arroz que le confiere - resistencia a *Magnaphorte oryzae* [6, 10, 12]. Sin embargo, a causa de sus pequeños efectos fenotípicos, la identificación de los genes subyacentes sigue siendo un desafío. Por ejemplo, *qBR4-2*, un complejo de genes que comprende 3 loci que acumulativamente mejoran la resistencia a *M. oryzae*, presenta dificultades en la clonación de alelos individuales de resistencia [6, 12,13]. Este obstáculo se halla en el control genético complejo de la resistencia mediada por QTL en *M. oryzae*. Además, la baja resolución de los mapas genéticos hace que sea difícil para los fitomejoradores introducir alelos QTL de resistencia de un donante sin el deterioro de rasgos agrícolas deseables. Otro gen de resistencia cuantitativa es *Pi35*, miembro de la clase NBS-LRR, una clase importante de genes *R*. Un alelo débil de un gen de resistencia *R* se considera que es un componente de defensa de la planta, sin embargo la evidencia directa que une NBS-LRR y QTL es limitada. Se identificó *Pi35* en el locus Os01g0782100 mediante mapeo genético a escala fina, pruebas de complementación y de progenie permitieron demostrar que *Pi35* es alélica a *Pish*, que es responsable de la resistencia raza específica contra *M. oryzae*. [6, 12].

2. PROTEÍNAS DE RESISTENCIA

2.1 CLASIFICACIÓN

Las proteínas de resistencia en plantas se localizan tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma y son codificadas por genes *R*. Estas se clasifican de acuerdo a cinco clases de dominios conservados que presentan [14, 15, 16, 17]. La primera corresponde a proteínas que presentan en la región central un dominio de unión a nucleótidos NBS (*Nucleotide-Binding Site*), en el extremo C-terminal un dominio de repeticiones ricas en leucinas LRR (*Leucine Rich Repeat*) y en la región N-terminal ya sea un dominio de tipo CC -LZ (*coiled-coil*) como es el caso de RPS5 en *Arabidopsis*, o un dominio con similitud a las proteínas Toll de *Drosophila* e interleuquinas IL-1 de mamíferos, denominado dominio TIR, L6 en lino es un ejemplo de este tipo de proteína , también designadas como CNL y TNL respectivamente [16, 18]. La segunda clase son los receptores RLP un grupo importante de proteínas transmembrana que contienen con frecuencia un dominio extracelular LRR, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto. RLP desempeña un papel vital tanto en el desarrollo de la planta como en la resistencia a enfermedades; la

proteína Cf de tomate, *Solanum lycopersicum* que confieren resistencia al hongo *Cladosporium fulvum* es representante clásica de esta familia. La tercera clase la compone una gran familia de receptores de membrana conocida como RLK la cual se divide en subclases dependiendo el dominio extracelular, ya sea que tengan un motivo LysM o Lectina entre otros. Los RLK constan de un dominio extracelular LRR conectado por una secuencia transmembrana de paso único y un dominio quinasa serina/treonina citosólica, FLS2, EFR y XA21 pertenecen a esta familia [16, 18]. La quinasa serina/treonina Pto de tomate es el modelo por excelencia del cuarto grupo de proteínas de resistencia, se aisló en 1993 y fue el primer gen de resistencia clonado. Pto interactúa directamente con cualquiera de las proteínas efectoras del patógeno AvrPto o AvrPtoB en compañía con la proteína PRF del tipo NB-LRR. La quinta clase comprende al resto de proteínas que se caracterizan por una estructura diferente así como por el mecanismo de resistencia, entre estas están Hm1/Hm2, en maíz; Mla en cebada [15, 17, 19] (Ver Figura 2). RLP y RLK participan en la vía PTI, mientras NBS-LRR actúan comúnmente en el citoplasma contra los efectores en ETI.

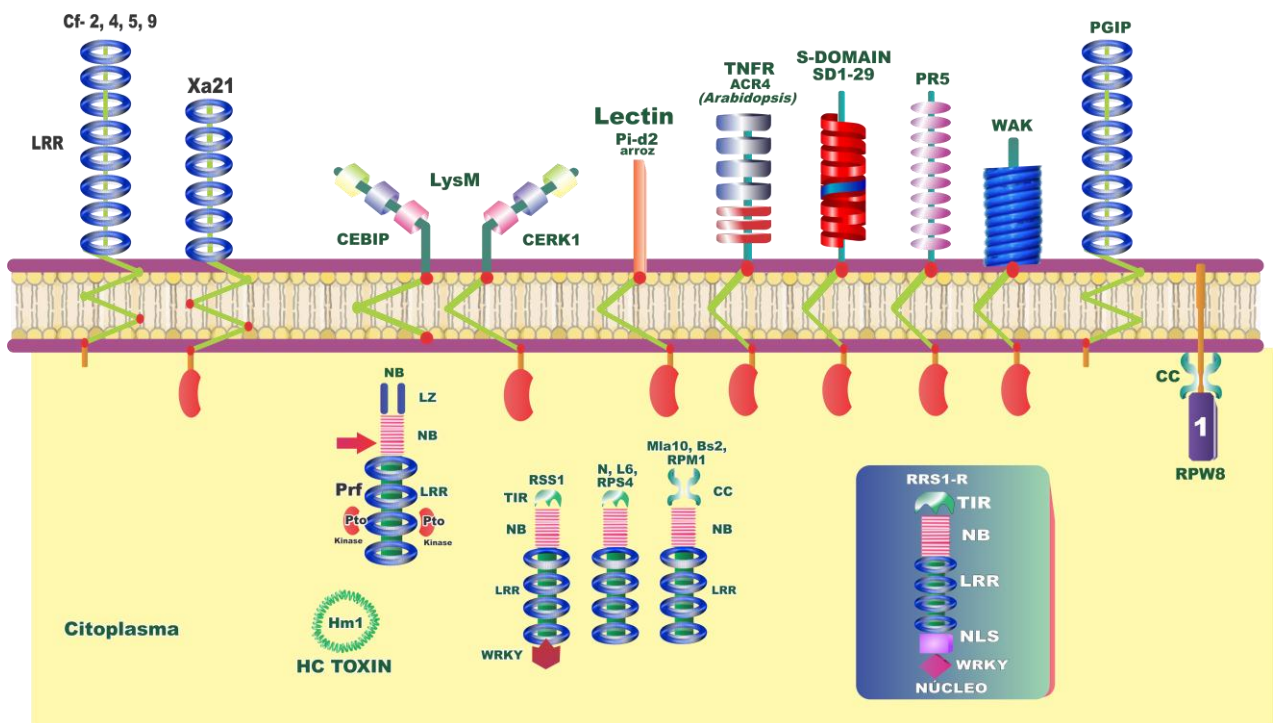


Figura 2. Proteínas de Resistencia. De izquierda a derecha. En la parte superior sobre la membrana plasmática se encuentran los receptores PRR: Cf-2, Cf-4, Cf-5, y Cf-9 que confieren resistencia a tomate contra

Cladosporium fulvum Avr2, Avr4, Avr5 y Avr9 respectivamente; XA21 confiere resistencia en arroz a *X. oryzae* pv *oryzae*; CEBiP y CERK1 reconocen quitina; Pi-d2 resistencia al tizón en arroz; ACR4 de *Arabidopsis*; SD1-29 reconocimiento de LPS en *Arabidopsis*, PR5 resistencia a hongos *Arabidopsis*. Dentro del citoplasma: Pto resistencia en tomate a cepas *Pseudomonas* AvrPto, RRS1 y RPS4 son proteínas de resistencia de *Arabidopsis* para cepas de *Pseudomonas syringae* que expresan AvrRps4, N proteína de resistencia al virus del mosaico del tabaco, L6 contra roya en lino, Mla10 resistencia a *Blumeria graminis* f. sp. efector Avra10, RPMI resistencia en *Arabidopsis* a *P. syringae* pv. *maculicola* que expresa AvrPpmI o AvrB; Bs2 resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* que expresa al efector AvrBs2; RPS5 para la resistencia contra cepas de *Pseudomonas* que expresan el efector AvrPphB; y RPW8 resistencia en *Arabidopsis* al mildew polvoso.

Hasta la fecha más de 112 genes *R* y 104.310 genes *R* hipotéticos se encuentran presentes en una amplia variedad de especies de plantas que confieren resistencia a 122 patógenos. Estudios recientes han demostrado que muchos genes *R* son agrupados en el genoma de las plantas, (Ver Tabla 1) [20].

La mayoría de los genes de resistencia a enfermedades codifican proteínas NBS-LRR. Durante el crecimiento y desarrollo normal muchos genes *R* son expresados constitutivamente en bajos niveles, como ocurre en la yuca donde el 72% son expresados en las hojas [15, 17, 18, 21, 22]. Abundantes genes de este tipo se han identificado en diversas plantas, por ejemplo en *Arabidopsis*, *Medicago truncata*, *Vitis* (vid), *Populus* (álamo), *Oryza sativa* (arroz), soya, *Lotus japonicus*, *Zea mays* (maíz), fresa, manzana, pera, melocotón y mei. En *Arabidopsis thaliana* se encontró en el genoma 159 genes que codifican proteínas NBS-LRR y 113 genes se distribuyen en 38 grupos, en este mismo estudio se encontró 185 genes para *A. lyrata* [23]. En *Oryza sativa* ssp. *japonica* se encontraron 142 genes NBS-LRR, mientras que la variedad Indica tiene 115, estos se encuentran organizados en grupos o solos [12]. También en la familia rosácea se han reportado varios genes de este tipo 144, 748, 469, 354 y 352 en fresa, manzana, pera, melocotón y mei respectivamente [17]. En todas las plantas se supone que los genes *R* se originaron a partir de un ancestro común, el alto grado de polimorfismo en estos es consecuencia de duplicaciones en tándem, duplicaciones de segmentos y entrecruzamiento desigual en el genoma (Ver Figura 3) [17, 20]. Estudios recientes han demostrado que la familia de genes NBS-LRR posee una mayor proporción de genes duplicados que otras familias. La expansión rápida de genes o la contracción de esta familia pueden ser estrategias de supervivencia para combatir la rápida evolución de patógenos específicos [17].

La tasa de evolución y los efectos de la selección no son homogéneos a nivel de los diferentes dominios dentro de cada secuencia del gen, y de ninguno de los miembros de los diferentes subgrupos dentro de la familia de genes [14]. En cuanto a este primer aspecto, la tasa de conversión de genes parece haber sido mayor para los dominios LRR que para regiones NBS, que parecen estar sujetas a la depuración de selección. La alta variabilidad de los dominios LRR está relacionada con su papel en el reconocimiento de determinadas proteínas Avr, para promover la resistencia de las plantas a los patógenos [14]. De hecho, las proporciones elevadas de sustituciones no sinónimas a sustituciones de nucleótidos sinónimas se han encontrado en los dominios de LRR; esto indica que la diversificación de la selección actúa sobre los dominios LRR para mantener las variaciones en los residuos expuestos. Para tener una idea de las variaciones en el nivel de los dominios LRR, hay, en promedio, 14 LRRs por proteína y a menudo de 5 a 10 variantes de secuencia para cada repetición; por lo tanto, en una especie como *Arabidopsis*, existe el potencial para más de 9×10^{11} variantes [14].

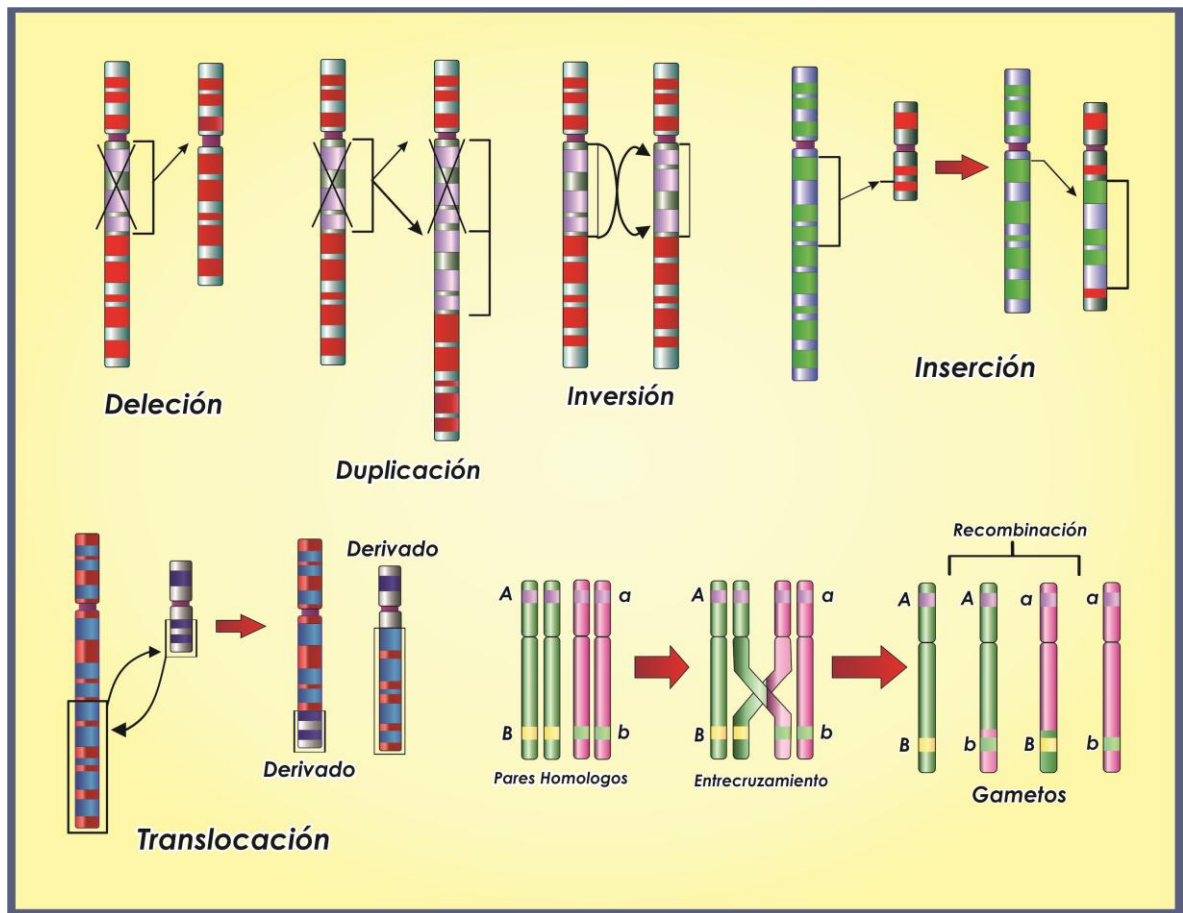


Figura 3. Fuentes de diversidad genética en genes de resistencia.

Los dominios NBS y LRR se han encontrado separados en los genomas de bacterias, arqueas, protistas y algas [24]. Sin embargo, en un estudio, se encontró genes NBS-LRR en dos especies de briofitas: el musgo *Physcomitrella patens* y la agrimonia *Marchantia polymorpha*. A la luz de estos resultados, los genes NBS-LRR parecen haberse originado y seleccionado para permitir los primeros linajes de plantas terrestres contra patógenos específicos. Se demostró que la clase CNL era divergente de TNL, PNL y HNL en briofitas, como en *M. polymorpha* y en algunos de los genes del musgo *P. patenas*; los genes CNL forman un grupo monofilético según muchas investigaciones [25]. Además, los CNL de monocotiledóneas y dicotiledóneas tienden a agruparse juntos, lo que sugiere que el grupo CNL se originó antes de la divergencia de las monocotiledóneas y dicotiledóneas; en contraste, los

dominios TIR están ausentes en los genomas de cereales y lamiiales, y lo más probable es que se han perdido de las especies de cereales, en lugar de haber surgido más tarde, después de la separación monocotiledóneas y dicotiledóneas [14].

El número de una sola copia, y la duplicación de genes NBS-LRR refleja los eventos de duplicación de pequeña o gran escala que se han producido durante la evolución del genoma. En *Arabidopsis*, se ha visto que las duplicaciones locales y distantes de genes TNL y CNL son responsables de la separación en dos grupos distintos, esto es compatible con la duplicación temprana de todo el genoma en la evolución de *Arabidopsis*. Del mismo modo, grandes bloques de duplicación también se han identificado en *M. truncata*. Una clara separación entre los dos grupos ha sido identificada también en *Brassica rapa* [14].

A menudo, la duplicación de las regiones genómicas que contienen genes NBS-LRR corresponde también a la redundancia funcional. La presencia de genes con funciones redundantes dentro de regiones duplicadas se ha demostrado en el genoma de la soja [26]. En este estudio se encontró que 91 genes NBS-LRR estaban dentro de 10 regiones genómicas duplicadas, y que estas regiones contienen resistencia duplicada a las enfermedades con loci de rasgos cuantitativos (QTL). Además, en algunos casos, hubo un número de copia similar de genes NBS-LRR en cada lado de la duplicación, mientras que no hubo números distintos de genes en otras regiones para ambos de los lados duplicados. Esto probablemente pudo ser debido a la duplicación en tándem que se produjo de forma independiente en un lado de una región duplicada [14].

A excepción de la papaya, en la que los genes NBS-LRR están bien distribuidos a través de los grupos de ligamiento, la distribución cromosómica de los genes NBS-LRR parece ser muy irregular en la mayoría de las especies estudiadas, algunos cromosomas contienen muchos más genes NBS-LRR que otros [14].

En la papa, por ejemplo, el mayor número de genes NBS-LRR se encuentran en los cromosomas 4 y 11 (aproximadamente 15% de los genes mapeados), con el número más pequeño en el cromosoma 3 (1%) [18, 27]. También, en *Brachypodium distachyon*, el cromosoma 4 contiene aproximadamente un tercio del total de los genes NBS-LRR que han sido identificados [28]. Por el contrario, el cromosoma 4 es menos representado en *Brassica rapa*, donde los cromosomas 3 y 9 contienen más de la mitad de los genes NBS-LRR

mapeados, y en *Lotus japonicus*, donde los cromosomas más representados para los genes NBS-LRR mapeados son cromosomas 2 y 3 [29], en el genoma de la soja, el cromosoma 16 tiene el mayor número de genes NBS-LRR [26].

En *Medicago truncatula*, más del 54% de los genes NBS-LRR están codificadas por cromosomas 3, 4 y 6 [14]. En yuca la mayor parte de genes NBS-LRR (70% de los genes mapeados) se encuentran dentro de un grupo; la concentración más grande de estos están en el cromosoma 16 con 10 miembros CNL [22].

Por otra parte hay diferencias entre las especies en cuanto al número y la organización de sus dos subgrupos TIR y CC. Aunque la mayoría de las agrupaciones NBS-LRR se componen de secuencias similares, muchos de estos grupos también contienen algunos genes NBS filogenéticamente distantes. De hecho, alrededor del 25% de *M. truncatula* incluyen genes tanto TNL y CNL. La presencia de grupos NBS-LRR heterogéneos es similar también en arroz y *Arabidopsis*, donde aproximadamente el 25% de los racimos NBS-LRR se mezclan filogenéticamente [15]. Una tasa similar de grupos mixtos NBS-LRR se ha encontrado en papa.

De los 228 genes NBS-LRR en yuca, 181 pertenecen a la clase CNL, y 47 a la clase TNL. Esto significa que hay 3,8 veces más genes CNL que TNL. Esta relación es, en efecto variable y sugiere que la sobre-representación de uno de estos grupos podría reflejar la adaptación de los genes R a los patógenos predominantes [22, 30]. Por ejemplo, en *Oriza sativa* y *Sorghum bicolor*, miembros de la familia TNL están presentes en una baja frecuencia de aproximadamente 1%. En general, la mayoría de las monocotiledóneas analizadas contienen pocos o ningún TNLS, lo que sugiere que esta clase es específica para dicotiledóneas [22]. También es interesante que la mayoría de los genes CNL de hierbas que se presentan en este estudio no tienen homólogos con los de las dicotiledóneas, lo que demuestra que la evolución de genes NBS-LRR divergió significativamente entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las especies de *Brassicaceae*, sin embargo, tienen un alto porcentaje de TNLS: *Arabidopsis thaliana* (64%) y *Brassica rapa* (64%) [22]. Hay algunos ejemplos de relaciones similares a los encontrados: en vid, por ejemplo, la proporción de CNL sobre las proteínas TNL es 3,8 veces más y en la papa la proporción aumenta a 4,7 veces. La sobre-representación de CNL en la papa puede ser porque los genes CNL suelen ser responsables de la resistencia a *Pythophthora infestans* [22].

La diversidad genética de CNL varía de una especie a otra: 188 se encontraron en soya, 55 en *Arabidopsis*, 177 en *Medicago*, 6 en papaya y 370 en la papa [31]. Investigaciones anteriores muestran que el grupo CNL forma dos clados filogenéticos, uno canónico y un grupo CNL-R, incluidos los miembros que codifican un dominio de RPW8 en su región N-terminal. Es interesante, sin embargo, que en el CNL de la yuca no se incluye el clado RPW8 [49]. Se encontró que los genes RPW8 se separaron con fuerza de todos los otros genes CNL, este clado RPW8 se describió anteriormente como genes CNL-A o CCR-NB-LRR; este grupo se cree que es uno de los más ancestrales de esta subfamilia CC-NB-LRR, y se ha sugerido como un grupo diferente a los genes CNL más comunes [15, 17, 22, 24, 25]. El gen ADR1, presente en este clado, es conocido por ser un gen CNL atípico de *Arabidopsis*, que codifica dominios LRR conservados anormalmente y dos motivos adicionales conservados alrededor de NBS [22, 24, 25].

Un hecho de gran importancia lo constituyen los pseudogenes NBS-LRR, a menudo se encuentran cerca de los genes funcionales NBS-LRR dentro de 100kb y también se agrupan en cromosomas específicos, como se ve en *M. truncata*, papa, arroz y yuca [12, 14, 15]. La función de estos no está bien definida, en general se cree que son eliminados del genoma o son fuente de diversidad genética que se puede utilizar a través de la recombinación. Sin embargo, puede haber un papel más importante para estos genes. Por ejemplo, en ratones un pseudogen expresado jugó un papel en el mantenimiento de la estabilidad de la longitud completa de su homólogo de mRNA por interferir con el sistema local de silenciamiento [14]. En las plantas, péptidos truncados NBS-LRR producidos por corte y empalme alternativo parecen tener un papel en la promoción de la resistencia a enfermedades. El descubrimiento de la función de estos pseudogenes expresados sería un paso importante para comprender plenamente las interacciones planta-patógeno [14].

Un número variable de pseudogenes *R* se han identificado en diferentes especies de plantas; estos son muy similares a los genes NBS-LRR a nivel de secuencia, aunque sus secuencias son parcial o conducen a la producción de proteínas parciales.

Bajos niveles de pseudogenes se han identificado en *A. thaliana* (8,05%) y *M. truncatula* (14,7%). Un nivel más alto se encontró en algodón poliploide (24,6%)

[14]. Sin embargo, un papel para el nivel de ploidía en la acumulación de los pseudogenes en el genoma no puede ser sugerido, ya que otros estudios han informado de niveles aún más altos de pseudogenes NBS-LRR en especies diploides. Un claro ejemplo es visto con el genoma del arroz, en el que 47,6% y 55,7% pseudogenes se han identificado. En la mayoría de los casos, los pseudogenes se caracterizan por grandes deleciones; estos pueden ser producidos por eventos de transposición y la omisión de exones, con mutaciones en el marco de lectura. Esto fue encontrado en el genoma de la papa, donde se informó de un nivel de 41,6% pseudogenes recientemente [14, 18, 22, 24, 25]. En algunos casos, los pseudogenes difieren de genes NBS-LRR funcionales en términos de la longitud del dominio NBS, que puede ser acortado en exceso, como se muestra en *L. japonicus* [29] y *B. distachyon* [28]; aquí, los motivos NBS son demasiado cortos o demasiado divergentes con respecto a la NBS funcional.

El número de pseudogenes también varía de acuerdo con el subgrupo NBS-LRR (CNL, TNL), y esta diferencia puede reflejar la relativa abundancia de genes CNL y TNL. Por ejemplo de los 179 pseudogenes identificados en la patata, 156 (87%) pertenecen al grupo CNL y 23 (13%) al grupo TNL, esto era de esperarse ya que el 85% del total de genes NBS-LRR son CNL y sólo el 15% son TNL [14, 15, 17].

La distribución en el genoma de pseudogenes, genes truncados NBS-LRR puede ser adyacente a genes NBS-LRR, dentro de 100 kb, y por lo tanto tener el mismo orden de los genes funcionales NBS-LRR; de hecho, estos pseudogenes también se agrupan en los cromosomas específicos, como en *M. truncatula* y la patata.

Tabla 1. Genes de resistencia *R* caracterizados y clonados en plantas.

Plant	R Gene	Protein ID	Structure	Plant	R Gene	Protein ID	Structure
<i>Aegilops tauschii</i>	Cre1	AAM94164	NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Xa1	BAA25068	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	EFR	NP_197548	LRR, PK	<i>Oryza sativa</i>	xa21	BAE93934	LRR, PK NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ER - Erecta	NP_180201	LRR, PK	<i>Oryza sativa</i>	Pi2	ABC94598	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FLS2	NP_199445	LRR, PK	<i>Oryza sativa</i>	Pi36	ABI64281	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	HRT	AAF36987	NBS, LRR, PK, others	<i>Oryza sativa</i>	Pi9	ABC18336	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PEPR1	NP_177451	LRR, PK	<i>Oryza sativa</i>	Pid2	ACR15163	PK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RAC1	AAS01763	TIR, NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Xa13	ABD78944	n.a.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RCY1	BAC67706	NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Xa27	AAY54163	n.a.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RFO1	NP_178085	PK	<i>Oryza sativa</i>	Xa5	AAV53715	n.a.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RLM3	NP_001031652	NBS, TIR, others	<i>Oryza sativa</i>	Pi5-1	ACJ54697	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPM1	NP_187360	NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Pi5-2	ACJ54698	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP1	NP_190034	NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Pid3	ACN79514	NBS, LRR, others

<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP13	NP_190237		<i>Oryza sativa</i>	Pikm1-TS	BAG72135	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP27	CAE51863	LRR	<i>Oryza sativa</i>	Pikm2-TS	BAG72136	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP4	NP_193420	TIR, NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Pikp-2	ADV58351	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP5	NP_193428	TIR, NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Pit	BAH20862	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPP8	NP_199160	NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Piz-t	ABC73398	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Rps2	NP_194339	NBS, LRR, others	<i>Oryza sativa</i>	Xa26	ABD84047	LRR, PK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Rps4	NP_199338	TIR, NBS, LRR, others	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PGIP	CAA46016	LRR, PK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPS5	NP_17268	NBS, LRR, others	<i>Solanum acaule</i>	Rx2	CAB56299	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPW8.1	AAK09266	RPW8, others	<i>Solanum bulbocastanum</i>	Rpi-blb1	AAP86601	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RPW8.2	AAK09267	RPW8, others	<i>Solanum bulbocastanum</i>	Rpi-blb2	AAZ95005	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RRS1	NP_001078715	NBS, LRR, others	<i>Solanum demissum</i>	R1	AAL39063	NBS, LRR, others
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RTM1	NP_172067	n.a.	<i>Solanum habrochaites</i>	Cf-4	CAA05270	LRR, PK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RTM2	NP_568144	n.a.	<i>Solanum habrochaites</i>	Cf4A	CAA05265	LRR, PK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SSI4	AAN86124	TIR, NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	I-2	AAD27815	NBS, LRR, others
<i>Beta vulgaris</i>	Hs1	AAB48305	n.a.	<i>Solanum lycopersicum</i>	Asc-1	AAF67518	n.a.
<i>Capsicum annuum</i>	Bs3	ABW82012	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bs4	AAR21295	TIR, NBS, LRR, others
<i>Capsicum annuum</i>	Bs3-E	ABW82011	NBS	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hero	CAD29729	NBS, LRR, others
<i>Capsicum chacoense</i>	Bs2	AAF09256	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	LeEIX1	AAR28377	LRR, PK
<i>Cucumis melo</i>	At1	AAL47679	PK	<i>Solanum lycopersicum</i>	LeEIX2	AAR28378	LRR, PK
<i>Cucumis melo</i>	At2	AAL62332	PK	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mi1.2	AAC67238	NBS, LRR, others
<i>Cucumis melo</i>	FOM-2	ABB91438	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sw-5	AAG31013	NBS, LRR, others
<i>Cucumis melo</i>	VAT		NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tm-2	AAQ10735	NBS, LRR, others
<i>Glycine max</i>	KR1	AAL56987	TIR, NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tm-2a	AAQ10736	NBS, LRR, others
<i>Glycine max</i>	Rps1-k-1	AAX89382	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ve1	AAK58682	LRR, PK
<i>Glycine max</i>	Rps1-k-2	AAX89383	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ve2	AAK58011	LRR, PK
<i>Helianthus annuus</i>	Pl8	AAT08955	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cf-5	AAC78591	LRR, PK
<i>Hordeum vulgare</i>	MLA1	ACZ65507	NBS, LRR, others	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cf-2	AAC15779	LRR, PK
<i>Hordeum vulgare</i>	MLA10	AAQ55541	NBS, LRR, others	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Prf	AAF7630	NBS, LRR, others
<i>Hordeum vulgare</i>	MLA13	AAO16014	NBS, LRR, others	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Pto	AAC48914	PK
<i>Hordeum vulgare</i>	Mlo	CAB06083	Mlo	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Cf-9	CAA05277	LRR, PK
<i>Hordeum vulgare</i>	RPG1	ABK51311	PK	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Cf9B	CAA05273	LRR, PK
<i>Hordeum vulgare</i>	Mla12	AAO43441	NBS, LRR, others	<i>Solanum tuberosum</i>	Gpa2	AAF04603	NBS, LRR, others
<i>Hordeum vulgare</i>	Mla6	CAC29242	NBS, LRR, others	<i>Solanum tuberosum</i>	Gro1.4	AAP44390	TIR, NBS, LRR, others
<i>Hordeum vulgare</i>	Rdg2a	ADK47521	NBS, LRR, others	<i>Solanum tuberosum</i>	R3a	AAW48299	NBS, LRR, others
<i>Lactuca sativa</i>	Dm3	AAD03156	NBS, LRR, others	<i>Solanum tuberosum</i>	Rx	CAB50786	NBS, LRR, others
<i>Linum usitatissimum</i>	L6	AAA91022	TIR, NBS, LRR, others	<i>Solanum tuberosum</i>	RY-1	CAC82811	TIR, NBS, LRR, others
<i>Linum usitatissimum</i>	M	AAB47618	TIR, NBS, LRR, others	<i>Triticum aestivum</i>	Lr1	ABS29034	NBS, LRR, others
<i>Linum usitatissimum</i>	P2	AAK28805	TIR, NBS, LRR, others	<i>Triticum aestivum</i>	Lr10	AAQ01784	NBS, LRR, others
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Serk3A	ADO86982	LRR, PK	<i>Triticum aestivum</i>	Lr21	ACO53397	NBS, LRR, others
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Serk3B	ADO86983	LRR, PK	<i>Triticum aestivum</i>	Lr34	ADK62371	NBS, LRR, others
<i>Nicotiana glutinosa</i>	N	AAA50763	TIR, NBS, LRR, others	<i>Triticum aestivum</i>	Pm3	AAQ96158	NBS, LRR, others
<i>Nicotiana tabacum</i>	IVR	CAA08776	n.a.	<i>Zea mays</i>	Hm1	NP_001105920	n.a.
<i>Oryza sativa</i>	PIB	BAA76282	NBS, LRR, others	<i>Zea mays</i>	Hm2	ABY68564	n.a.
<i>Oryza sativa</i>	Pi-ta	AAO45178	NBS, LRR, others	<i>Zea mays</i>	Rp1-D	AAD47197	NBS, LRR, others

2.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS.

La familia PRR abarca dos grupos de proteínas de membrana: las quinasas similares al receptor-like (RLKs) y las proteínas del receptor-like (RLP). RLKs son proteínas transmembrana de paso único con un dominio extracelular que es responsable de la percepción de los PAMPs/ DAMPs y un dominio de serina / treonina quinasa intracelular que activa las respuestas de señalización corriente abajo. RLPs poseen una estructura similar pero sólo tienen un dominio citosólico corto sin un dominio quinasa de señalización, que dependerá de la asociación con quinasas para la señalización. Sin embargo, hay pruebas de que tras la unión al ligando las RLKs también forman homodímeros o heterodímeros con otras quinasas y RLP y, como tal funcionan en complejos multiprotéicos para iniciar la inmunidad de las plantas [32]. RKS representan una de las más grandes familias de proteínas vegetales, con dominios (LRR) siendo el mayor grupo de RKS [32]. Por ejemplo, los genomas de *Arabidopsis* y arroz codifican >600 y > 900 RKS de los cuales > 220 y > 290 son LRR-RKS, respectivamente [5, 6, 32, 33, 34]. RKS vegetales han evolucionado principalmente a través de la duplicación acontecimiento que conduce a la expansión de la familia [35]. Esta familia también contiene numerosos miembros en otros genomas, como el álamo, *Populus trichocarpa* con > 40 miembros, el tomate, *Solanum lycopersicum* con > 50 miembros y la vid (*Vitis vinífera*) con > 34 miembros. Los receptores RPK mejor caracterizados hasta ahora son FLS2 y EFR en *Arabidopsis*, y XA21 en arroz; estas son quinasas no RD (RD residuos conservados Arg y Asp en el subdominio quinasa VIb), una característica correlacionada con la inmunidad innata a través de los reinos [35]. La presencia de dominios quinasa no RD en la mayoría de los miembros de la subfamilia LRR-XII en diversas especies de plantas sugiere que esta subfamilia codifica para todos los PRR o PRR asociados a RPKs [36].

Hasta el momento, sólo un número limitado de RLKs y RLP que pueden funcionar en la inmunidad de las plantas se ha caracterizado funcionalmente. La compatibilidad de estas proteínas para sus ligandos sigue siendo un estudio desafiante. La mayoría de los autodomínios de los PRR conocidos contienen LRRs para el reconocimiento directo / indirecto de proteínas efectoras del patógeno. Además, se ha encontrado una gran diversidad de PRRs unidas a la membrana y solubles que llevan otros tipos de dominio como los motivos LysM y de lectina los cuales están implicados en el reconocimiento de las estructuras de

hidratos de carbono de organismos microbianos o de daño de la pared celular vegetal [9, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43].

La transferencia de receptores de membrana involucrados en la inmunidad, entre especies de plantas es un enfoque prometedor para la resistencia a las enfermedades de amplio espectro que puede ser durable [35]. Dicha transferencia ya se ha utilizado en programas de mejoramiento convencionales para generar híbridos con resistencia mediada por PRR de parientes silvestres como único loci piramidal [5, 7]. Por ejemplo, XA21 de una especie silvestre de arroz *Oryza longistaminata*, se introdujo en arroz cultivado *Oryza sativa* [36]. Sin embargo, estos enfoques están restringidos por las incompatibilidades entre las especies. En los últimos años, varios informes han descrito la transferencia exitosa de PRRS en especies filogenéticamente diversas que conducen a una mejor resistencia a las enfermedades. Por ejemplo, la expresión transgénica de EFR de *Arabidopsis* en especies de dicotiledoneas lejanamente relacionadas como las solanáceas *Nicotiana benthamiana* y tomate proporciona una resistencia de amplio espectro a bacterias que pertenecen a diferentes géneros [5, 7]. Por el contrario, la transferencia del LRR-RLP Ve1 de tomate en *Arabidopsis* confiere resistencia a diferentes especies de *Verticillium* [35]. Además, XA21 se ha introducido en el plátano *Musa sp.* Una monocotiledonea y confiere resistencia a *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* que causa marchitamiento. La expresión transgénica de XA21 en el tomate y naranja dulce *Citrus x sinensis* se traduce en una mejor resistencia a la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* y cáncer de los cítricos por *X. axonopodis* pv. *citri*, respectivamente [35]. Es importante destacar que estos ejemplos sugieren que las vías de señalización mediadas por PRR se conservan a través de las especies de plantas, familias, e incluso los clados, y que los PRRs transferidos pueden reclutar bioquímicamente estos componentes inmunes potencialmente conservadas [43, 44, 45].

2.3 RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS BASADO EN LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

El estudio de las interacciones planta-patógeno se ha centrado en aquellos PRRs que utilizan interacciones proteína-proteína para reconocer patógenos invasores. Los fitopatógenos se reconocen por la percepción de los epítopes característicos presentes en su superficie y esenciales para la supervivencia del patógeno. Estos

epítopes son en su mayoría reconocidos por los receptores de la superficie celular de plantas que llevan dominios extracelulares LRR y un dominio quinasa intracelular, colectivamente denominados LRR-RLKs. Estas interacciones proteína-proteína han sido objeto de varios trabajos recientes, aquí se va a describir las más estudiadas y que son referentes de otros estudios para los LRR-RLKs y LRR-RLP [11, 33, 34, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50].

Entre los PRRs del tipo LRR-RLK, FLS2 (*flagellin Sensing 2*) en *Arabidopsis* es la proteína mejor estudiada, contiene un dominio extracelular de 28 repeticiones ricas en leucina LRRs. FLS2 reconoce la flagelina bacteriana a través de la percepción del epítope flg22 de 22 aminoácidos, luego FLS2 interactúa directamente con flg22 que resulta en la fosforilación de FLS2 y dimerización inmediata con su co-receptor BAK1 / SERK, otro LRR-RLK. La transfosforilación del dominio quinasa de BAK1 permite cambios de conformación y posterior liberación de BAK1 lo que conduce a la activación de la señalización de la defensa por MAPK aguas abajo [51]. En ausencia de reconocimiento PAMP, BAK1 interactúa con la proteína BIR2, tipo LRR-RLK también para evitar heterodimerización de FLS2-BAK1 [52]. Después de la percepción de flg22, FLS2 está sujeto a la endocitosis y degradación por el E3 ubiquitina ligasa PUB12 / 13 para evitar la señalización continua de defensa. (Ver Figura 4). A su vez, patovares virulentos de *Pseudomonas syringae* producen proteínas efectoras, como AvrPto, AvrPtoB y AvrPphB que desestabilizan la inmunidad activada por FLS2 [53].

La proteína transmembrana EFR representa otro receptor de *Arabidopsis* de tipo RLK LRR implicado en la señalización de PAMP bacteriana [32]. El ectodominio de EFR consta de 24 repeticiones de LRRs y está implicado en la percepción del péptido elf18, un fragmento N-terminal conservado del factor de elongación tú bacteriano. Muchos de los compuestos de señalización corriente abajo de EFR se comparten con FLS2, y EFR también requiere la dimerización con BAK1 para la señalización. Sin embargo, la acción de EFR es independiente de la percepción de flagelina y, a diferencia de FLS2, EFR requiere N-glicosilación para ser funcional. De hecho, un solo N-glicano es crucial para el reconocimiento del receptor y ligando del patógeno [47].

Como se mencionó anteriormente las plantas de arroz utilizan el receptor quinasa XA21 para conferir resistencia a *Xoo*. Aunque algunos investigadores manifiestan que el ligando para XA21 es desconocido [9], otros reportan que el receptor XA21 reconoce AX21, un péptido de 17 aminoácidos sulfatado derivado de la proteína

tipo I de Xoo secretada [36]. También en este caso, la acción de la XA21 es estrictamente regulada. Sin PAMP, XA21 se mantiene en un estado inactivo por autofosforilación y por la ATPasa XB24. Tras la unión de AX21 a XA21, se disocia el dímero XB24 / XA21 y el dominio quinasa XA21 es liberado y trasladado al núcleo de la célula para la señalización inmune subsiguiente [39, 48]. Recientemente se ha planteado que XA21 también se puede encontrar en un complejo heteromérico constitutivo con un ortólogo BAK1, llamado OsSERK2, y se somete a transfosforilación bidireccional para conferir resistencia a *Xanthomonas* [34, 35, 39, 51].

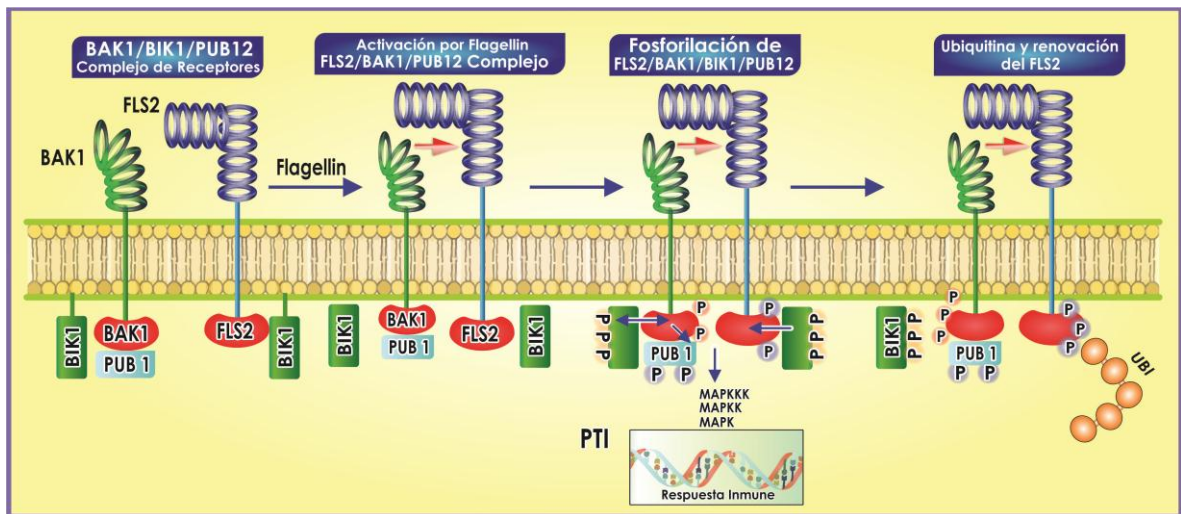


Figura 4. Dimerización y fosforilación de la proteína quinasa FLS2 en *Arabidopsis*. La fosforilación del complejo RLK/RLCK constituye un paso esencial para iniciar la señalización inmune. Después del reconocimiento de la flagelina BIK1 se autofosforila y transfosforila por BAK1 en varios residuos de tirosina, además de los residuos de serina/treonina. BAK1 interactúa físicamente con BIK1 y la fosforila en múltiples residuos de serina/treonina/tirosina. BIK1 también es capaz de fosforilar recíprocamente a BAK1. Finalmente FLS2 está sujeto a endocitosis y degradación por la ubiquitina PUB12/1.

2.4 RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS BASADO EN INTERACCIONES PROTEÍNAS-CARBOHIDRATOS. LOS HIDRATOS DE CARBONO

Muchos PAMPs/DAMPs que percibe la planta como moléculas "peligro" incluyen estructuras de carbohidratos que están presentes en la superficie celular del patógeno invasor o se originan en la propia planta, por la degradación de la pared celular causada por entrada de patógenos. Estas estructuras comprenden

lipopolisacáridos, LPS, bacterianos, peptidoglucanos PGN y moléculas de quitina fúngicas así como oligogalacturonides derivados de plantas y fragmentos de celulosa. También proteínas de arabinogalactano que residen en la pared celular de plantas y participan en la respuesta inmune de las plantas [11, 33, 42, 49, 54].

Los receptores con motivos de lisina son importantes en el reconocimiento de quitooligosacáridos de hongos. Durante mucho tiempo se ha especulado que cuando un hongo entra en contacto con la planta, las células vegetales pueden secretar quitinasas para degradar la quitina de la pared celular del hongo para inhibir directamente la infección, también los fragmentos servirían como inductores de quitina al ser percibidos por la planta [44]. De hecho, plantas donde se sobrepresan quitinasas son más resistentes a los hongos patógenos, especialmente en combinación con una glucanasa, proteína importante en la percepción de quitooligosacáridos que fue identificada por primera vez en el arroz y conocida como CEBiP (proteína de unión a elicitor de quitina). Posteriormente, proteínas similares implicadas en la percepción de quitooligosacáridos también fueron identificadas en otras plantas [44]. Aproximadamente un año después, otra proteína con motivo LysM y un dominio quinasa intracelular, denominada CERK1 / LysM RLK1, también fue reportada en la percepción de quitooligosacáridos en *Arabidopsis* [44]. Las mutaciones en este gen CERK1 / LysM RLK1 virtualmente bloqueaban todas las respuestas de defensa contra quitina, como la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de MAPKs, y la inducción de genes de defensa, y también dio lugar a una mayor susceptibilidad a patógenos fúngicos [44]. Esta proteína se une a quitooligosacáridos. Por lo tanto, este receptor CERK1 / LysM RLK es un componente crítico, de un complejo, para reconocimiento de quitooligosacáridos en *Arabidopsis*. Posteriormente, se encontraron otros RLKs con motivos LysM similares involucrados en la percepción de quitooligosacáridos en otras plantas, como el arroz y los tomates [44].

Estudios recientes sugieren que múltiples proteínas LysM están probablemente involucradas en la formación de un complejo de receptores para percibir quitooligosacáridos así como peptidoglucano [44].

Es importante señalar que la percepción de quitooligosacáridos cortos, como quitotetraosa, puede ser a través de diferentes proteínas LysM RLK, y puede conducir a la supresión de la inmunidad innata desencadenada en plantas por MAMPs en *Arabidopsis*, o la activación de la vía de señalización relacionada con AM en *M. truncatula* [44].

2.5 PERCEPCIÓN DE PEPTIDOGLICANO MEDIADA POR PROTEÍNAS LYSM DURANTE INTERACCIONES PLANTA-BACTERIA PATÓGENA.

La primera evidencia de que las proteínas LysM probablemente participan en la defensa contra patógenos bacterianos vino de la siguiente observación: la mutación en *Arabidopsis* de CERK1 / LysM RLK1 no sólo produjo mayor susceptibilidad a patógenos fúngicos, sino también a la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 de tomate [44]. Esta proteína fue atacada por el efector bacteriano AvrPtoB [53]. Un fenómeno similar se observó posteriormente en los tomates. Los estudios sugieren que las proteínas implicadas en la percepción quitooligosacáridos también pueden estar involucrados en detectar una señal bacteriana, tales como peptidoglicano, para activar defensa contra patógenos bacterianos. El reconocimiento de múltiples señales por un receptor o un complejo de receptor puede ser una forma económica para que las plantas regulen sus interacciones con diversos microbios, tales como bacterias y hongos patógenos [34, 51].

2.6 SUPRESIÓN DE DEFENSA DEL HUÉSPED MEDIADA POR PROTEÍNAS LYSM DURANTE LAS INTERACCIONES PLANTA-MICROBIO.

Aunque las plantas han desarrollado mecanismos para detectar y reconocer PAMPs y desencadenar la inmunidad innata contra potenciales patógenos, los microbios han evolucionado para contrarrestar tales mecanismos de defensa durante la co-evolución. [44]. Estos mecanismos de defensa han sido estudiados ampliamente en las interacciones entre *Arabidopsis* y *P. syringae* pv. DC3000 pv. tomate. En este pato sistema, varias proteínas efectoras de la bacteria modifican los mecanismos de defensa del huésped para suprimir activamente la defensa [53]. Hasta el momento no se sabe mucho sobre los mecanismos utilizados por hongos para suprimir la defensa del huésped. Sin embargo, algunos estudios recientes mostraron que los hongos pueden emplear proteínas LysM para secuestrar quitooligosacáridos de detección o reconocimiento por receptores del hospedero, para desencadenar defensa por quitooligosacáridos [44]. Esta es probablemente una estrategia común empleada por hongos patógenos para suprimir la defensa del huésped provocada por quitooligosacáridos, porque los efectores LysM son ampliamente distribuidos y conservados en los hongos [44]. Por supuesto, los hongos también pueden emplear otros mecanismos para contrarrestar la defensa del huésped provocada por quitooligosacáridos y otros inductores. Existen proteínas LysM no sólo en los hongos, sino también en bacterias. Se especula que ciertas proteínas bacterianas con motivos LysM

pueden estar implicadas en la supresión de defensa mediada por peptidoglicano, mediante la protección y / o el secuestro de la señal de detección de peptidoglicano por el receptor de la célula vegetal. Estos mecanismos también pueden ser empleados por patógenos bacterianos para contrarrestar la defensa desencadenada por peptidoglicano. De hecho, como se ha mencionado antes, la proteína efectora bacteriana AvrPtoB se dirige a un LysM RLK, que está involucrado en percepción de quitooligosacáridos y / o peptidoglicano, para la degradación, y así infectar las plantas [53].

Existen proteínas LysM no sólo en los hongos patógenos y bacterias, sino también en hongos beneficiosos y bacterias, que pueden formar una relación simbiótica con sus plantas hospederas. Por ejemplo, el genoma del hongo micorrícico *Laccaria bicolor*, que puede formar simbiosis con muchas plantas de la tierra, codifica aproximadamente 30 proteínas LysM [44], y el genoma de la bacteria *Bradyrhizobium rhizobial japonicum*, que puede formar simbiosis con soja, codifica aproximadamente 4 proteínas LysM. Como sus homólogos patógenos, estos microbios beneficiosos también contienen quitina y peptidoglicano, respectivamente. Para que se produzca la simbiosis, la defensa contra estos microbios beneficiosos tiene que ser minimizada. Los mecanismos detallados para prevenir o minimizar la defensa del huésped provocadas por quitooligosacáridos y / o peptidoglicano asociadas con microbios simbióticas no se conocen bien.

2.7 SUPRESIÓN DE LA DEFENSA DEL HUÉSPED MEDIADA POR PROTEÍNAS LYSM DURANTE LAS INTERACCIONES PLANTA-MICROBIO DEL LADO PLANTA.

Un estudio reciente demostró que la supresión de la defensa del huésped puede también provenir de las proteínas LysM del huésped [42]. Las respuestas de defensa desencadenadas por PAMPs, como flagelina, EFTU y quitina, pueden ser suprimidas por la aplicación de las NFS o quitotetraosa, y tal supresión requiere la proteína Lyk3 en Arabidopsis [44]. Curiosamente, esta proteína Lyk3 de Arabidopsis es también un miembro de la familia LysM RLK que contiene otros RLKs LysM implicados en la percepción de quitooligosacáridos, peptidoglicano, NFS y FMs. El hallazgo sugiere que una LysM RLK de una leguminosa similar a Lyk3 de Arabidopsis puede jugar un papel similar en la supresión mediada por NF de la inmunidad innata de la planta, que se activa por P / MAMPs presentes en bacterias rizobios, para contribuir a la establecimiento de simbiosis. Un mecanismo similar también puede ocurrir durante el establecimiento de simbiosis con micorrizas [44].

2.8 DOBLE PAPEL DESEMPEÑADO POR LYSM RLKS DURANTE LAS INTERACCIONES PLANTA-MICROBIO.

Como se mencionó antes, algunas proteínas LysM poseen múltiples funciones durante interacciones planta-microbio. Cabe destacar que LysM RLK en plantas que no son leguminosas como *P. andersoni* es muy probable que sea responsable de la percepción de ambas NFS y FMs derivado de sus hongos micorrízicos y bacterias rizobios, respectivamente [55]. Puesto que es la única LysM RLK en plantas, no será sorprendente si esta proteína también participa en la percepción de quitooligosacáridos y / o peptidoglicano. En *M. truncatula* la proteína LysM RLK, NFP, no sólo es importante para la percepción NF y MF, sino que también es capaz de percibir señales patógenas para conducir a la planta a la inmunidad contra un patógeno fúngico [17, 56]. La proteína de arroz CERK1 está involucrada en ambas interacciones patógenos y simbióticos [30, 43], y la Arabidopsis CERK1 / LysM RLK1 proteína parece estar implicada en la percepción tanto de quitooligosacáridos y peptidoglicano. Además, las proteínas LYP4 y LYP6 de arroz, que no tienen un dominio intracelular quinasa, también juegan un papel doble en la percepción de peptidoglicano y quitooligosacárido en la inmunidad [33]. Tales papeles duales y ambiguos en percibir señales de estructura similar (NFS, FMs, quitooligosacáridos y peptidoglucanos se cumplen en colaboración con otras proteínas LysM. [44].

2.9 LECTINA DOMINIOS IMPLICADOS EN LA INMUNIDAD DE LA PLANTA

Las lectinas son proteínas que contienen al menos un dominio no catalítico que les permite reconocer selectivamente y se unen de una manera reversible a glicanos específicos que están presentes ya sea en una forma libre o como parte de glicoproteínas y glicolípidos. Las plantas expresan un gran diverso número de lectinas, exhibiendo diferentes estructuras moleculares y especificidades desde glicanos endógenos, pertenecientes a la planta, así como glicanos de origen exógeno, no vegetal [36].

Una gran cantidad de lectinas de plantas se expresan constitutivamente en grandes cantidades en las semillas y tejidos vegetativos de almacenamiento en los cuales desempeñan un papel en la defensa de la planta [37, 38]. Además, las plantas también expresan cantidades pequeñas de lectinas específicas como respuestas particulares hacia las tensiones ambientales y ataque de patógenos. En ausencia de estrés en la planta, las lectinas no inducibles se expresan en niveles detectables. La mayoría de las lectinas constitutivamente expresadas son

sintetizadas con una péptido señal y están secuestradas en la vacuola o secretadas al espacio extracelular. En contraste, la mayoría de las lectinas de plantas inducibles residen en el núcleo y el citoplasma célula [37, 38, 41, 45].

La mayoría de las lectinas de plantas conocidas se constituyen de uno o más dominios de lectina, junto a los dominios relacionados como aerolisina, AIG1, quitinasa, “*dirigent domain*”, F-box, Kelch, quinasa, LRR, NB-ARC, PAG, o dominios TIR [36].

2.10 PROTEÍNAS DE MEMBRANA CON DOMINIO LECTINA

Las quinasas de los receptores de lectina (LecRKs) típicamente, LecRKs son proteínas compuestas de dos dominios, un dominio N-terminal extracelular y una lectina citosólica C-terminal de dominio quinasa Ser / Thr, separados por una región transmembrana. Sobre la base de sus dominios LecRKs las lectinas se clasifican en 4 tipos; G, C, L, y de tipo LysM [50]. Aunque estos LecRKs consisten en al menos un dominio que muestra sorprendente similitud de secuencias con un motivo de lectina, hay muy poca información disponible con respecto a la capacidad de este dominio para reconocer e interactuar con estructuras de carbohidratos específicos.

LecRKs de tipo G contienen un dominio lectina extracelular que se asemeja a la aglutinina de *Gnivalis alanthus* (GNA). Sin embargo, queda por demostrar si este dominio de unión de azúcar está de hecho implicado en la unión del ligando. En base a los análisis de todo el genoma, 32 LecRKs de tipo G se han identificado en *Arabidopsis thaliana* y 100 LecRKs de tipo G en el arroz [50]. LecRKs de tipo G actúan en las reacciones de auto-incompatibilidad en plantas con flores (los llamados SRKs) y en defensa de la planta al estrés biótico, así como al estrés abiótico [43].

De tipo C (LecRKs calcio-dependientes) se encuentran principalmente en las proteínas de mamíferos que median la respuesta inmune y juegan un papel en el reconocimiento de patógenos. En las plantas, RLKs del tipo C son bastante raros. En la actualidad único gen de tipo C que codifica para LecRK ha sido identificado en *A. thaliana* (At1g52310) y en arroz, aunque su función no se ha aclarado todavía [43].

Tipo L (*LecRKs tipo-Legume*) representan un grupo más abundante de LecRKs. Hasta el momento, 45 LecRKs de tipo L se han identificado en *A. thaliana*. Sobre la base de las relaciones filogenéticas de los genes que codifican *Arabidopsis* de tipo L LecRK se pueden clasificar en nueve grupos y nueve subtipos (designados con los números romanos I a IX). Estos genes mostraron patrones de expresión variables en diferentes tejidos y etapas del desarrollo en respuesta a estímulos [43]. Algunos LecRKs fueron efectivamente involucrados en resistencia de la planta a los patógenos, por ejemplo, Al-LecRK I.9 está involucrado en la detección de integridad de la pared celular y la respuesta de defensa a *Phytophthora infestans*. En LecRK-VI.2 es crítica para la resistencia contra *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora* [50], mientras que A LecRK-IV.3 induce resistencia contra *Botrytis cinerea*. Algunos LecRKs también actúan en la señalización hormonal (ABA) y la inmunidad de los estomas (por ejemplo, A - LecRK VI.2 y Al LecRK-V.5; [50]). LecRKs de tipo L también se han identificado en otras plantas. Por ejemplo, las plantas de tabaco expresan LecRKs tipo L con un papel en la inmunidad contra patógenos e insectos [40]. A su vez, plantas de *Medicago* contienen LecRKs tipo L que están involucrados en simbiosis.

En la actualidad, todavía no está claro si los LecRKs de tipo L poseen actividad de lectina desde los aminoácidos importantes para la interacción del dominio de lectina de leguminosa con su ligando de carbohidratos específicos ya que es poco conservado. En contraste se conserva el sitio hidrófobo presente en el dominio lectina de tipo leguminosa, lo que sugiere que LecRKs puede actuar en el reconocimiento de pequeños ligandos hidrofóbicos [50]. Recientemente, se obtuvo evidencia que en la membrana plasmática se localiza DORN1, codificada por el gen *AtLecRK-I.9*, que juega un papel importante como un receptor extracelular de ATP [50]. DORN1 carece de residuos conservados vinculantes de Ca^{2+} y Mn^{2+} que son críticos para la actividad de unión a carbohidratos de las lectinas de leguminosas. Los primeros estudios sugirieron también la capacidad del dominio de lectina de leguminosas para unirse a la adenina, un componente de ATP [36]. Sin embargo, la adenina era incapaz de competir con el ATP por la unión a DORN1, el sitio de unión a ATP exacto en DORN1 queda por determinar. Estos datos son concordantes en la medida de que el ATP extracelular es ahora percibido como una molécula central de señalización en las respuestas de estrés de la planta [36].

Por último otros receptores de membrana de tipo SD1-29 de *A. thaliana*. Detectan específicamente LPS de *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. La degradación química de LPS de especies de *Pseudomonas* sugirió que SD1-29 detecta principalmente la fracción de lípido A de LPS [43].

3. LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES PROTEÍNAS NBS-LRR

3.1 EL DOMINIO LRR

Muchos receptores de inmunidad en plantas y animales tienen un dominio LRR que consiste en múltiples repeticiones de aminoácidos seriados (alrededor de 24) que contienen leucinas u otros aminoácidos hidrofóbicos a intervalos regulares. La secuencia consenso que define un LRR es LxxLxxL, en donde L representa la leucina y x cualquier aminoácido. El dominio LRR se presenta en proteínas que tienen la capacidad de interactuar con otras proteínas. Este dominio está unido a otro referenciado como NB-ARC (región adaptador compartido por APAF-1 proteína de resistencia y CED-4) el cual funciona como interruptor [57]. La interacción entre el dominio sensor, LRR y NB-ARC es poco conocida. Un estudio donde se analizó la estructura de estos dominios mostró que las primeras repeticiones en el extremo N-terminal del dominio LRR de la proteína de resistencia GPA2 y Rx1 son suficientes para mantener a estos receptores NB-LRR en un estado inactivo mediante la cooperación con una pequeña región en el dominio ARC2. El extremo C-terminal del dominio LRR es el principal determinante del reconocimiento de los elicitores afines, lo que demuestra un doble papel del dominio LRR en el funcionamiento de la proteína. Sorprendentemente, se observó una división del dominio en dos subunidades al mapear el potencial electrostático en la superficie del dominio. Se considera que el N-terminal de LRR tiene una superficie cargada positivamente, en tanto que el medio C-terminal tiene una superficie predominantemente ácida. Será interesante ver cómo este patrón de distribución de carga se refiere a los roles funcionales de las distintas subunidades LRR en la regulación de la actividad de proteínas NB-LRR y reconocimiento de patógenos [57].

3.2 EL DOMINIO NBS

Este dominio es frecuentemente referenciado como NB-ARC (*ARC: APAF1, R gene products and CED4*). Se encuentra localizado en la parte central de una estructura de tipo tripartita, en proteínas de resistencia, CC-NB-LRR o TIR- NB-LRR y está acompañado por el subdominio ARC que en plantas se divide en dos unidades

estructurales separadas: CUR1 y ARC2. Este dominio presenta varios motivos conservados y ordenados en forma lineal: P-loop / kinase-1a / Walker A (*hence force called the P-loop*), RNBS (*Resistance Nucleotide Binding Site*)-A, quinasa-2 / Walker B, RNBS-B, RNBS-C, GLPL, RNBS-D, MHD (Ver Figura 5). Estos motivos son de gran importancia puesto que le dan plasticidad fenotípica a las proteínas un aspecto relevante en la función de estas. Entre los diferentes motivos, los motivos *P-loop* y *MHD* son conocidos por ser muy importantes para la función de las proteínas R. El dominio NB-ARC es un dominio de unión a nucleótidos que se encuentra en proteínas relacionadas con la inmunidad en animales y plantas.

Se encontró por primera vez en los reguladores de apoptosis en las proteínas CED4 del nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la proteína APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*). Evidencias sugieren que el dominio NB puede adherirse e hidrolizar nucleótidos [58, 59, 60].

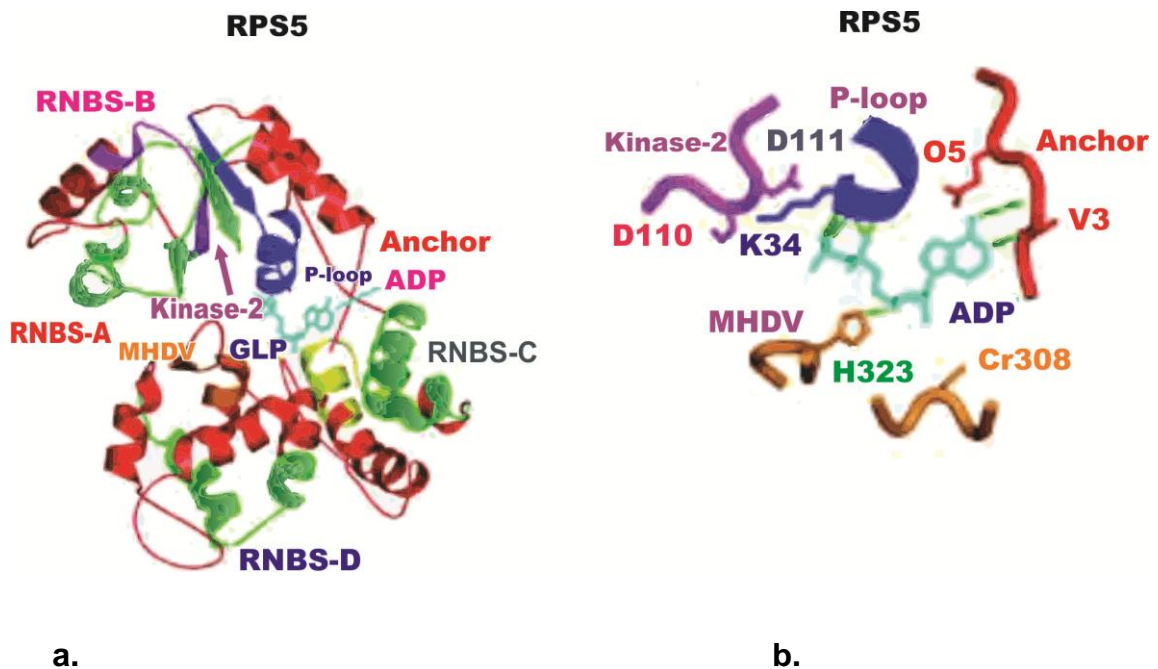


Figura 5. Estructura del dominio NBS en la proteína RPS5 de tipo CNL de *Arabidopsis* a). Motivos conservados del dominio NBS en orden: P-loop (or Walker A site); RNBS-A; Kinase-2 (or Walker B site); RNBS-B; RNBS-C; GLPL; RNBS-D y MHDV. La coordinación del ADP en la proteína involucra tres diferentes motivos conservados. b). Una pequeña región de anclaje en el extremo amino del dominio NBS coordina la adenina de ADP o ATP, el bucle P coordina el α y β -fosfatos, y el motivo MHDV (en el subdominio alas de hélice en *Apaf-1*) coordinan o bien el azúcar o el β -fosfato de ADP. Los dos ácidos aspártico terminales desde el motivo quinasa-2 se encuentran en el bolsillo en el que el γ -fosfato de ATP se establece.

3.3 EL DOMINIO TIR.

EL dominio TIR se encuentra en receptores de plantas y animales. En animales los dominios TIR son homodimerizados como requerimiento para la iniciación de la cascada de señales. En cambio el papel de los dominios TIR en plantas esta pobremente entendido [30, 58]. L6 es una proteína de resistencia de lino (*Linum usitatissimum*) que confiere resistencia para el hongo *Melampsora lini*. Mediante la determinación de la estructura cristalina del dominio TIR de L6 se logró mostrar que aunque no es indispensable para el reconocimiento de la proteína efectora, el dominio TIR por si solo es necesario y suficiente para la señal inmune [58]. Se demostró que el dominio TIR de L6 se auto asocia muy probablemente formando un homodímero. El análisis de la estructura combinada con sitios de mutagénesis dirigidos sugirieron que la auto asociación es un requerimiento para las señales inmunes y revelan distintas regiones involucradas en auto asociación, señalización y autorregulación [30, 58, 61].

En animales, la percepción de PAMPs por la región extracelular LRR induce homodimerización en el dominio citoplasmático TIR. Esto provee un nuevo soporte de la unión de proteínas adaptadoras para iniciar la señal aguas abajo. Sin embargo en las proteínas R de plantas, el mecanismo por el cual el reconocimiento del efector está ligado a la activación de la señalización de defensa es poco conocido. Algunas evidencias sugieren que el dominio TIR media la señalización de la proteína R. La sobreexpresión de la región TIR de proteínas en Arabidopsis, tabaco y lino, desencadenó una respuesta celular independiente del efector [62]. Sin embargo el papel específico del dominio TIR y la secuencia adicional de aminoácidos requerida para su función no es clara [58].

Análisis mutacionales muestran que el dominio TIR no se requiere para el reconocimiento de AvrL567 pero si para inducir las respuestas de defensa. La expresión de fragmentos truncados define la mínima región funcional necesaria para las señales de defensa, y la determinación de la estructura cristalina confirma que este corresponde por sí mismo al dominio TIR y redefine los límites de este dominio. Las mutaciones en el dominio TIR de L6 afectan las señales pero no el reconocimiento del efector involucrado en la auto asociación, señalización y regulación [58, 62]. El extremo C-terminal del dominio TIR en animales se ha encontrado en el primer intrón. Sin embargo un conjunto conservado de residuos hidrófobos en los primeros 16 aminoácidos traducidos desde el exón 2 alineado con un conjunto similar de residuos forman parte de la hélice α anfipática E (α E) de los dominios TIR en los animales. Esto es consistente con la reciente determinación de la estructura cristalográfica de NP 177436/At1g72930 (A+TIR) en la proteína de Arabidopsis. La estructura cristalina de los dominios TIR de L6 muestra que cada una de las moléculas se compone de una hoja β paralela de 5 hebras (β A- β E), rodeada por cinco regiones α -

helicoidal (α A- α E). El pliegue global es similar a las estructuras de AtTIR; los dominios TIR de TLR1, TLR2, TLR10, MyD88, y IL-1RAPL; y como el dominio TIR de la proteína de bacteria, *Paracoccus denitrificans* (PdTIR). L6TIR exhibe la más alta similitud estructural con AtTIR (40% de identidad de secuencia) con un valor rmsd de 1.3 Å. Sin embargo la estructura L6TIR incluye la región bucle $\beta\beta$ y la hélice $\alpha\beta$, las cuales estuvieron ausentes en la estructura modelo AtTIR, porque la densidad electrónica no fue observada para esta región [58].

El dominio TIR de L6 también tiene una protuberancia en la cadena $\beta\beta$ D debido a la presencia de dos residuos de prolina (P120 y P153) en la hoja β . Los dominios TIR en mamíferos y bacterias comparten menos del 20% de identidad con L6TIR. Similar para AtTIR una tercera hélice α D se observó en la estructura L6TIR cuando se compara con los dominios TIR en mamíferos y bacterias [58].

3.4 EL DOMINIO COILED COILS

El dominio CC, que consta de dos o más α -hélices en forma de bobina alrededor una de la otra, es un motivo ubicuo de interacción proteína-proteína frecuentemente observado en la naturaleza [63, 64]. La estructura *Coiled Coils* está formada por un motivo repetido de 7 aminoácidos (heptad) y se puede reconocer fácilmente en base a secuencias primarias de proteínas, exhibiendo una variedad de estados de oligómeros y topologías. Debido a la interacción estable formada entre sus α -hélices, el dominio *coiled-coils* ha estado bajo estrecha vigilancia para diseñar nuevas estructuras de proteínas para aplicaciones potenciales en los campos de la ciencia de los materiales, la biología sintética y la medicina [63, 64]. Sin embargo, su aplicación más amplia requiere un análisis profundo y sistemático de la relación secuencia, estructura de plegamiento en espiral de la bobina y la formación de oligómeros.

La composición de aminoácidos corresponde a (E ~ 16%, el aminoácido más frecuente), lisina con carga positiva (K ~ 11%) y arginina (R ~ 8%). La glutamina (Q), un aminoácido polar neutro con cadena lateral larga, es dos veces tan frecuente como en dominios globulares. Entre aminoácidos hidrófobos leucina (L) es el más común y más frecuente en comparación con el modelo LG. Aminoácidos aromáticos, es decir, triptófano (W), tirosina (Y), y fenilalanina (F) están insuficientemente representados, debido probablemente a la naturaleza expuesta de la espiral de la bobina con el disolvente, mientras que los dominios globulares forman un núcleo hidrófobo. Del mismo modo, la glicina (G), un pequeño, aminoácido de cadena corta (un átomo de hidrógeno) y la prolina, son menos comunes [64].

4. MECANISMO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS DE RESISTENCIA

En la ausencia de patógenos, proteínas NLR se mantienen en un estado inactivo, después del reconocimiento de AVR se activan e inducen la señalización de resistencia a las enfermedades. Los mecanismos moleculares que ocurren durante la transición de "inactivo" al estado "activo" y los socios de señalización corriente abajo aún no se conocen. Sin embargo, puesto que la primera caracterización molecular de un gen de resistencia fue hace más de 20 años, los análisis de la estructura-función han demostrado que los dominios individuales y motivos particulares de las NLR desempeñan papeles críticos en su auto-inhibición o mecanismos de activación [60, 65]. Los modelos actuales de la función de NLR predicen que, en el estado de reposo, las interacciones intermoleculares entre los diferentes dominios de las proteínas R se mantienen en una conformación auto-inhibida cerrada. Para un número de proteínas R, este estado "off" se ha demostrado que se asocia con la unión de ADP. Se ha propuesto que el reconocimiento del efector favorece una estructura de la proteína NLR más abierta que permite el intercambio de nucleótidos y la unión a ATP [60, 65, 66].

El reconocimiento y la interacción entre las proteínas de resistencia R de la planta y las proteínas de avirulencia del patógeno, AVR o efector puede ser directa o indirecta, llamada "gen por gen", en la cual por cada gen AVR hay un R que lo reconoce, este modelo presenta una variante denominada la hipótesis del gen guardián [65]. Las proteínas AVR actúan como factores de virulencia, pero al ser reconocidos por las proteínas R de la célula vegetal, se desencadena una respuesta inmune para detener el avance del patógeno. La activación de la respuesta defensiva mediada por efector puede ocurrir de tres formas diferentes: Interacción directa entre las proteínas R y AVR, como ocurre con las proteínas AVR-Pita de *Magnaphorte grisea*, que se une directamente a la región LRD (*Leucine Rich Domain*) del producto del gen R- Pi-ta de arroz. Interacción indirecta (modelo guardián) entre la proteína y el factor de avirulencia, en este caso el efector modifica una proteína diana en la célula vegetal, siendo esta modificación detectada por la proteína R. La fosforilación de la proteína RIN4 de *Arabidopsis* por los efectores AvrB o AvrRpm1 de *Pseudomonas syringae*, permite la unión de la proteína R, RPM1 de *A. thaliana*. Por lo tanto la modificación de RIN4, explica como una sola proteína R puede reconocer más de un efector. (Ver Figura 6) [33, 65, 66]. Otro modelo es llamado cebo o señuelo donde el receptor R solo reconoce al efector cuando este interactúa con otra proteína. La proteína PRF de tomate, forma un complejo con la quinasa accesoria Pto, que interactúa de señuelo para los efectores AvrPto y AvrPtoB que tiende a unirse a los dominios quinasa de FLS2 y CERK para bloquear la activación de la PTI. La Pto confiere resistencia en tomate a cepas de *Pseudomonas*. Cuando AvrPto interactúa con Pto, ambas proteínas son dirigidas a la membrana plasmática por miristoilación del efector. La directa interacción de Pto y AvrPto es reconocida por

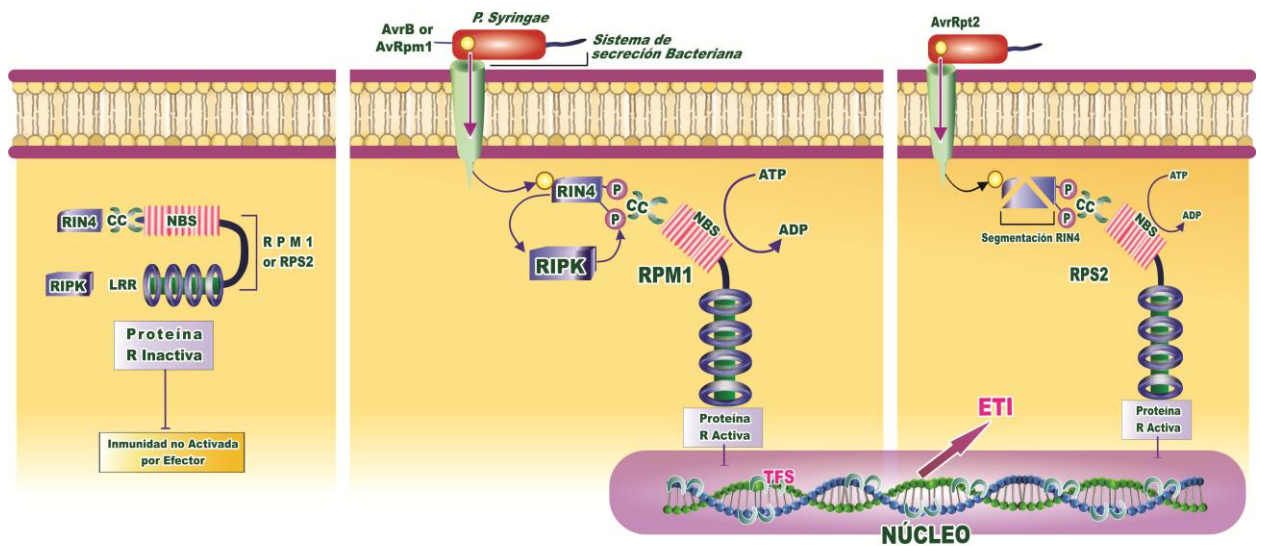
PRF la cual activa varias respuestas aguas abajo. El descubrimiento de esta interacción directa Pto-AvrPto fue importante porque se localizaron quinasas previamente desconocidas para funciones como receptores en algunos organismos y el mismo dominio en la Pto quinasa confiere reconocimiento y señales.

Los mecanismos de la activación de las proteínas de defensa son dependientes del ATP, y conlleva a la inducción de genes de defensa que frecuentemente termina en la respuesta de muerte celular [33, 60, 62, 65, 66].

En muchos casos, una sola proteína es suficiente tanto para el reconocimiento del efector y la activación de señalización [4]. Sin embargo, recientemente se han identificado muchas proteínas de tipo NBS-LRR o NRLs donde se requieren dos proteínas para conferir resistencia a los patógenos. Estudios en las proteínas de *A. thaliana*, *RRS1* y *RPS4* y en el arroz *RGA4* y *RGA5* han revelado por primera vez cómo estos pares de proteínas funcionan juntos [65, 66].

En ambos casos, los socios pareados interactúan físicamente para formar un receptor hetero complejo en el que cada miembro desempeña papeles distintos en el reconocimiento del efector o activación de la señalización, destacando la conservación en la forma de acción de los pares NLR a través de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Sobre la base de nuevos datos de varios patosistemas, parece que algunos NLRs reconocen efectores de patógenos a través de dominios extraños de proteínas accesorias de efectores seguido por la fusión con los NLR. Este NLR integrada imita dominio de la propiedad de unión / sustrato efector del ET original, para permitir la detección de patógenos. Además, estos "receptor" o "sensor" NLRs típicamente asociadas con las proteínas de NLR con una arquitectura clásica que funcionan como socios necesarios para la respuesta de resistencia [65].

También se ha propuesto un modelo de "señuelo integrado" para la función de estos pares de receptores. En este modelo, una proteína vegetal diana por un efector se ha duplicado y fusionado a un miembro del par de NLR, donde actúa como un cebo para activar la señalización de defensa por el segundo NLR tras la unión al efector. Este mecanismo puede ser común a muchos pares de NLR de otras plantas [65, 66].



a.

b.

c.

Figura 6. Hipótesis de Guardia. .a) Estado inactivo de las proteínas de resistencias RPM1 o RPS2 en *Arabidopsis*, no son activadas por el efector .b) La bacteria *P. syringae* inyecta en la célula hospedera el efector AvrB o AvrRpm1 quienes fosforilan la proteína de guardia RIN4, esta fosforilación es reconocida por la proteína RPM1 quien activa las vías de señalización para la defensa. c) Un mecanismo similar se presenta en *Arabidopsis* que lleva el gen de resistencia R, RPS2 para AvrRpt2. En este caso RIN4 es degradada por la proteasa AvrPt2, de este modo RPS2 es capaz de activar respuesta.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de las proteínas R reconocen un efector específico, pero hay parejas que reconocen múltiples efectores. Las proteínas tipo TIR-NB-LRR, RRS1-R y RPS4 de *A. thaliana*, ambas reconocen dos efectores bacterianos, AvrRps4 de *P. syringae* y PopP2 de *R. solanacearum*. Sin embargo AvrRps4, pero no PopP2, es reconocido en mutantes RRS1/RPS4. El par de genes R RRS1/RPS4 se unen para funcionar en conjunto, este designado como RRS1B/RPS4B, confiere reconocimiento de AvrRps4 pero no de PopP2. Los complejos RRS1/RPS4, RRS1B/RPS4B de proteínas asociadas reconocen AvrRps4 y activan los genes de defensa [62, 65, 66].

Análisis estructurales y funcionales de proteínas RP1 en maíz y *N. benthamiana*, cuyo objetivo fue el de caracterizar el mecanismo molecular activación/auto-inhibición de NLR mostró que las proteínas RP1 parecen auto asociarse para ser competentes en actividad. El dominio CC es suficiente para inducir HR. Esta puede ser suprimida por el dominio NB-ARC a través de la interacción

directa. En las proteínas auto activas, la interacción del dominio LRR con el dominio NB-ARC causa represión y por lo tanto interrumpe la inhibición de la HR [60].

Los genes de resistencia de las plantas, NLR, comparten estructuras similares y llevan a cabo funciones muy parecidas, es evidente que los mecanismos moleculares que subyacen a su función y su activación apropiada, comparten ciertas similitudes, sin embargo se han encontrado variaciones sustanciales. Estas variaciones probablemente reflejan procesos co-evolutivos íntimos y únicos, cada NLR ha cambiado debido a las interacciones entre sus diferentes dominios y con sus proteínas [67].

En maíz se encontró auto inhibición de las proteínas de resistencia NRL, que reconocen efectores de la roya común. Similitudes y diferencias se encontraron en proteínas-RP1 D y su derivado auto activo *Rp1-D21* diferencias distintas de las que se conocen en otros NLRs. Por otra parte, se identificaron varias características observadas de la implicación del dominio ARC2 en la interacción del dominio NB-ARC con el dominio de CC; la observación de que N1184 y el C-terminal de 16 AAs están involucrados tanto en la interacción física LRR / NB-ARC y en la regulación de la actividad [60]. *Rp1-D21* es un mutante que confiere respuesta auto activa no específica a múltiples especies de roya del maíz, incluyendo *P. sorghi* y *P. triticina* [60]. Presumiblemente, la resistencia conferida por *Rp1-D21* podría extenderse más allá de las royas de otros patógenos *biotróficos* y *hemi-biotrophic*, sin embargo, las severas dificultades de crecimiento asociados con la expresión de este gen hacen su aplicación en la producción agrícola poco práctico. En combinación con promotores adecuados, puede ser posible diseñar individuos de maíz o incluso otras plantas con algunas de las construcciones quiméricas descritas aquí que confieren un fenotipo HR más débil para lograr una elevada resistencia a la enfermedad con menos consecuencias [60].

5. EFECTORES

5.1 EFECTORES EN BACTERIAS

Los principales patógenos bacterianos de plantas incluyen miembros de los géneros de *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Agrobacterium* y

Pectobacterium, entre otros. Estos agentes patógenos, se enfrentan primero a la respuesta inmune innata cuando entran en contacto con las células vegetales y son reconocidos por receptores RRP localizados en la superficie de la membrana. Estos perciben moléculas conservadas de las bacterias como la flagelina bacteriana, factor de elongación Tu (EF-Tu), peptidoglicano (PGN) o lipopolisacáridos, denominados PAMP/MAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) [59].

Se denominan efectores o genes *Avr* solamente cuando se ha establecido cual es la proteína R capaz de reconocer o interactuar con el efector correspondiente. En el caso de las interacciones incompatibles, la función de los efectores es encender las respuestas de defensa, mientras que en interacciones compatibles su función es suprimir las respuestas de defensa basales.

Los genes de patogenicidad se requieren para que el patógeno cause enfermedad en plantas. Las proteínas codificadas por los genes *Avr*, una vez reconocidas por las proteínas R, permiten la activación de la RH e inhiben el posterior desarrollo de la enfermedad, independientemente de si estos *Avr* son factores de patogenicidad. Un gen de patogenicidad puede convertirse en un gen *Avr*, si su producto es reconocido por el sistema de defensa de la planta [59].

5.2 SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO III

Las bacterias, secretan los efectores a través de diversos sistemas de secreción, como el tipo III (SST3), IV (T4SS), y VI (T6SS). De estos, el T3SS ha sido reconocido como un actor central en la interacción de bacterias patógenas y simbioses con diversos huéspedes. Ambos tipos de microbios explotan la T3SS para suprimir o evadir el sistema inmune de la planta y para finalmente establecer una infección exitosa. [59, 68, 69]. La mayoría de los grupos de genes T3SS de bacterias fitopatógenas se han dividido en dos grupos, designados como *hpr / hrc1* y *hpr / hrc2* basado en la composición génica, arreglo, y la regulación transcripcional. La disponibilidad de un número creciente de genomas bacterianos ha revelado la presencia de T3SSs con diferente organización genética. El grupo *hrp / hrc1* está presente en especies de *Pseudomonas* y *Erwinia*, mientras que el *hrp / hrc2* se encuentra en especies de *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Acidovorax* y *Burkholderia*. Todos los genes de T3SSs se agrupan dentro de las regiones de ca. 22-50 kb en islas de patogenicidad (PAIS), ubicados principalmente en el cromosoma y en algunos casos en plásmidos (por ejemplo, *Ralstonia solanacearum* y *Pantoea agglomerans* *pv gypsophilae* y *pv. betae*). Los genes de

ambos grupos están organizados en operones y el número de ORFs oscila entre 24 (*Xanthomonas patovares*) a 27 (de *Pseudomonas patovares*). Todos contienen genes que codifican los componentes estructurales del aparato de secreción y proteínas secretadas así como proteínas menos conservadas con funciones accesorias en la estructura y regulación de la maquinaria de secreción. Los T3SSs funcionales están formados por proteínas pertenecientes a nueve familias (SctC, SctJ, SctN, SctQ, SctR, SctS, SctT, SctU, SctV), donde el prefijo de la nomenclatura corresponde a la secreción y translocación celular (SCT), seguido de los sufijos utilizados en el sistema de *Yersinia* Ysc [69]. Las regiones de acompañamiento de grupos T3SS llevan generalmente genes efectores de tipo III (T3E), pero su contenido de genes y estructura difieren entre especies/patovare. Sin embargo, la mayoría de los genes efectores están dispersos por todo el genoma y no están vinculados físicamente a los grupos de genes T3SS. Una característica común compartida por la mayoría de *Pseudomonas syringae* patovares es la estructura del gen tripartita del grupo hrp / hrc. Este se compone de un locus efector intercambiable (EEL), un grupo de genes hrp / hrc, y un locus efector conservado (CEL). EEL es variable entre patovares, rico en genes codificantes de efectores y contiene muchas secuencias relacionadas con elementos genéticos móviles. CEL codifica tres T3Es presentes en todas las cepas caracterizadas [69]. Los efectores de este tipo son secretados por un sistema de secreción que se asemeja a una jeringa molecular e inyecta las proteínas de avirulencia dentro de la célula huésped. Estas proteínas se refieren generalmente como efectores tipo III (T3Es), y promueven la infección bacteriana mediante la manipulación de las funciones de la célula vegetal, incluyendo la inmunidad. La relevancia de este sistema de secreción en la virulencia total de bacterias patógenas de plantas está mejor demostrado por la pérdida casi completa de la infectividad de cepas incapaces de secretar T3Es. La translocación del efector se produce a través de un componente integral que forma un canal proteínico con componentes hidrófilos e hidrófobos. Los translocadores hidrofílicos hasta ahora identificados en patógenos de plantas son proteínas accesorias T3SS que contienen un dominio hidrofílico unitario o un dominio enzimático adicional. Se ha encontrado que lípidos, proteínas, un ácido fosfatídico y una acuaporina son capaces de interactuar con los translocadores [59, 68].

5.3 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV

Sistemas de secreción de tipo IV (T4SSs) son complejos multiprotéicos que transportan proteínas efectoras y complejos de ADN-proteína a través de las

membranas bacterianas al medio extracelular o directamente en el citoplasma de otras células. Muchas bacterias de la familia *Xanthomonadaceae*, que ocupan diversos nichos ambientales, llevan un T4SS con función desconocida, pero con varias características que lo distingue de otros T4SSs. Se ha observado que en *Xanthomonas citri*, el sistema T4SS tiene la capacidad de matar a otras especies de bacterias Gram-negativas. La proteína efectora de secreción tipo IV muestra un dominio C-terminal conservado y su actividad bacteriolítica se neutraliza por una proteína cuya estructura 3D es similar a inhibidores de la hidrolasa de peptidoglucano [70].

5.4 SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO VI

El grupo de genes T6SS está presente en más de 25% de todos los genomas bacterianos conocidos, siendo T6SS uno de los sistemas de secreción más extendidos. T6SS parece ser el único determinante de la patogenicidad de muchas cepas bacterianas. Las proteínas que forman el complejo se ensamblan para formar una estructura tubular grande que abarca la superficie celular y el citoplasma. Varias proteínas de T6SS están estructural y funcionalmente relacionadas con las encontradas en las colas contráctiles de bacteriófagos. La cola es un orgánulo complejo, responsable del reconocimiento por el hospedero a través de la penetración de sus capas, y la entrada del ADN y las proteínas de la cápside del fago en el citoplasma. Los datos acumulados sugieren que un complejo proteína similar se monta por las proteínas T6SS [71].

5.5 EFECTORES EN HONGOS Y OOMICETOS

Los hongos y oomicetos son microbios filamentosos eucariotas, algunos de los cuales son patógenos de plantas devastadores que afectan a los cultivos alimentarios importantes. Por ejemplo el oomiceto patógeno causante del tizón de la papa *P. infestans* desencadenó la hambruna de Irlanda durante el siglo 19 y sigue siendo la amenaza más importante para la producción de papa, mientras que los hongos ascomycetes como el patógeno *M. oryzae*, en arroz y, en el trigo *Puccinia graminis f. sp. tritici* continuamente amenazan la seguridad alimentaria mundial, [72]. Durante la infección, los parásitos se involucran en interacciones biotróficas completas o parciales, lo que significa un contacto directo con el tejido vegetal. Estos microbios desarrollan estructuras especializadas dentro de los tejidos infectados, como hifas, que exploran el espacio extracelular (apoplasto), o hifas invasivas y haustorios, que penetran en las cavidades de la célula huésped e

invaginante membrana plasmática del huésped. Históricamente, hifas y haustorios se han descrito como estructuras de alimentación que sirven a la nutrición de los parásitos. Pero, más recientemente, estas estructuras han surgido como sitios de secreción y translocación en células huésped de una clase de proteínas de virulencia de patógenos conocidos como efectores [72].

5.6 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE LOS EFECTORES

Los mecanismos moleculares de acción de los efectores en la célula hospedera, aún no están completamente claros, sin embargo varios estudios se han realizado al respecto y se ha encontrado que diversos efectores son capaces de degradar o inactivar componentes de PTI, esto lo logran mediante su actividad proteasa al igual que por la manipulación del proteasoma 26S y la maquinaria de ubiquitinación [73, 74, 75].

Durante los últimos años, han aparecido pruebas que las vías de ubiquitinación juegan un papel importante en la inmunidad y por lo tanto son subvertidas por bacterias patógenas en animales y plantas. Varios componentes del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) se identificaron como reguladores de la inmunidad de la planta durante PTI y ETI, como en la pimienta donde la ligasa E3 CaRING1 se induce por *Xanthomonas* y es necesaria para la activación de muerte celular.

Por otra parte, estudios recientes identificaron que los miembros de la familia T-box ligasa E3 son reguladores negativos de la PTI [73]. Las mejores proteínas efectoras caracterizadas o toxinas con respecto a la manipulación de la UPS se pueden encontrar en *P. syringae* pv., una bacteria que causa la enfermedad de la mancha bacteriana de tomate. Algunos de estos efectores imitan ligasas E3, por ejemplo, AvrPtoB, para suprimir ambos eventos PTI y ETI. [73], mientras que otros, tales como HOPm1 promueven la ubiquitinación de su proteína diana para inhibir ciertas respuestas inducidas de defensa. Una forma más directa de subvertir el UPS lo consigue, una toxina secretada desde *P. syringae* pv. *syringae*, que se dirige directamente a las subunidades catalíticas del proteasoma 26S para inhibir su actividad y suprimir las reacciones inmunes de plantas (Ver Figura 7) [75].

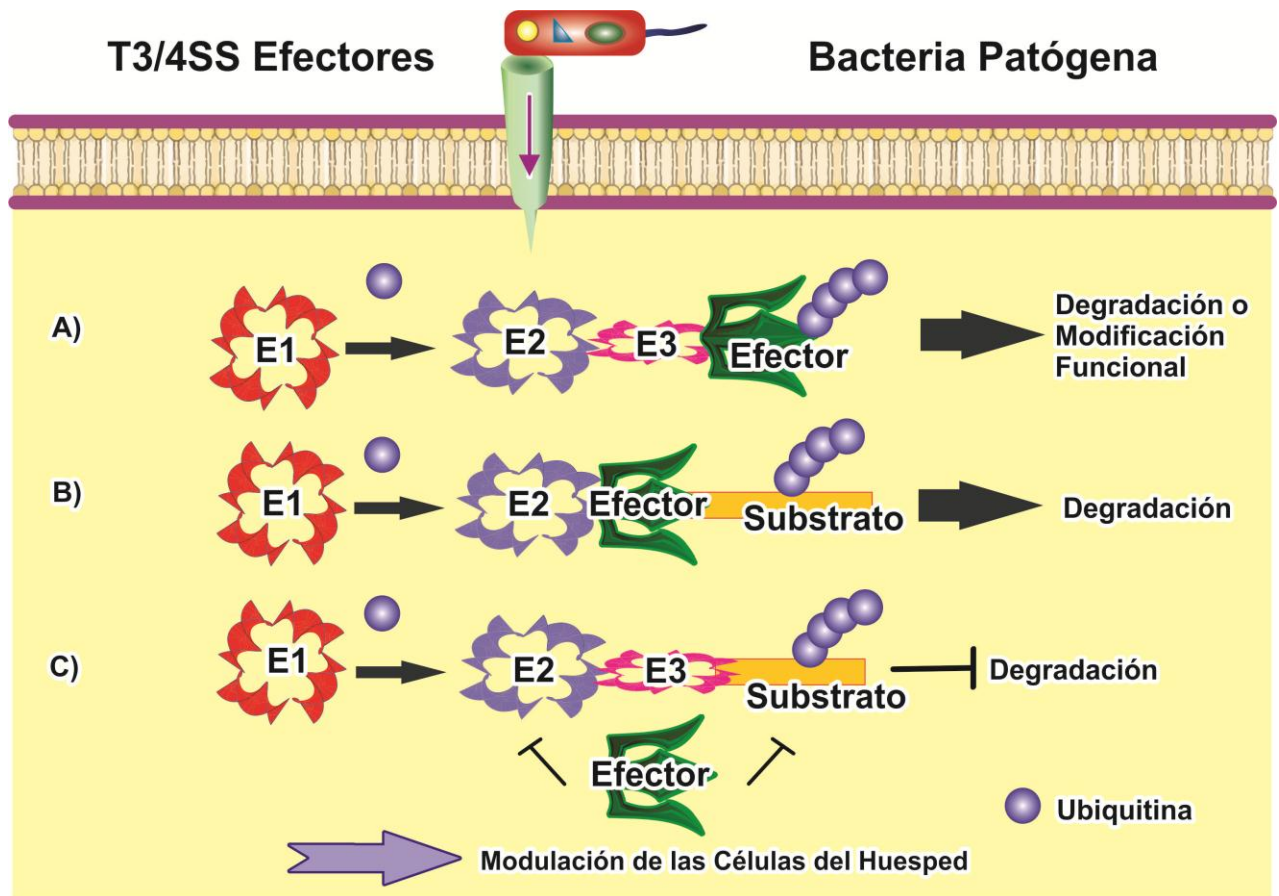


Figura 7 Los efectores bacterianos manipulan el sistema ubiquitina-proteasoma del hospedero. A) Después de la translocación dentro de la célula del hospedero, varios efectores son meta del UPS. Algunos efectores son ubiquitinizados y luego degradados o funcionalmente modificados por el proteasoma. B) Algunos efectores actúan como ligasas E3 y producen la degradación del sustrato. C). Otros efectores inhiben pasos específicos del UPS. Los efectores bacterianos pueden imitar o secuestrar UPS del huésped para modular las respuestas de células, tales como respuestas inmunitarias y muerte celular

XopJ es un efector tipo III de *X. campestris* pv. vesicatoria (cepa 85-10), aunque una secuencia muy similar también se encuentra en el genoma de *X. campestris* pv. malvacearum. Aparte de eso, homólogos cercanos también están presentes en *Pseudomonas* spp., incluyendo *P. avellanae*, *P. syringae* pv. actinida, *P. syringae* pv. lachrymans y parecen funcionar al menos en parte, de una manera similar a XopJ [75]. XopJ pertenece a la familia de efectores cisteína/acetiltransferasas YopJ ampliamente distribuidos entre bacterias patógenas de animales y plantas. Estudios recientes demostraron que YopJ y otros miembros de estas proteínas efectoras actúan como acetiltransferasas

en sus proteínas diana. El análisis funcional reveló que XopJ interactúa con la subunidad RPT6, RP19S (RP ATPasa6) del proteasoma 26S, XopJ es capaz de reclutar *RPT6* citoplasmática a la membrana plasmática de la planta que conduce a la inhibición de la actividad del proteasoma. Este efecto es dependiente tanto de, su miristoilación y de su triada catalítica [73, 76].

El efector tipo III XopAC inhibe por uridilización reguladores positivos de la inmunidad producida por PAMP como quinasas citoplasmáticas similares al receptor (RLCK) BIK1 y pBL1. En el ecotipo resistente Col-0, *xopAC* es un importante gen de la virulencia de Xcc. Tanto el dominio de interacción RLCK y el dominio uridil transferasa de XopAC son necesarios para la avirulencia [4, 77]. Además, *xopAC* también puede conferir avirulencia tanto al patógeno vascular *R. solanacearum* como a *P. syringae*, lo que indica que la inmunidad activada por el efector *xopAC* no es específica para el sistema vascular. En plantas con proteínas fusión XopAC-YFP se localizaron en la membrana plasmática lo que sugiere que XopAC podría interactuar con las proteínas de membrana. Ocho RLCK de la subfamilia VII se propone que están localizados en la membrana plasmática [77].

El efector AvrM secretado por el hongo *M. lini* que se puede internalizar en las células vegetales en ausencia del agente patógeno, se une a fosfoinosítidos (PIP), y es reconocido directamente por la proteína de resistencia M en el lino [44]. Las estructuras cristalinas de dos variantes de origen natural de AVR/M, AVR/M-A y AVR/M, ambos revelan un pliegue en forma de L que consiste en un motivo duplicado en tándem de cuatro hélices, que muestra similitud con el dominio de núcleo WY en efectores de oomycetes. Las variantes AVR/M forman un dímero con una forma no globular inusual. El análisis funcional de AVR/M revela que se requiere un parche de superficie hidrofóbica conservada entre ambas variantes para la internalización en células de plantas, mientras que el dominio CC, C-terminal media la interacción con M [26]. La unión de AVR/M a PIPs depende de cargas superficiales positivas, y mediante mutaciones en los sitios de unión a PIP se encontró que esta no tiene ningún efecto significativo sobre la internalización, lo que sugiere que la unión a AVR/M PIPs no es esencial para el transporte de AVR/M a través de la membrana de la planta. La estructura de AVR/M y la identificación de regiones de la superficie funcionalmente importantes y permite avanzar nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a esta, cómo efectores entran en las células de plantas y la forma en que son detectados por el sistema inmunológico de las plantas [78].

El silenciamiento de ARN es un regulador central de la expresión génica en la mayoría de los eucariotas y actúa tanto a nivel transcripcional a través de la metilación del ADN y a nivel post-transcripcional a través de la interferencia

directa de ARNm mediada por ARN pequeños. En las plantas y los invertebrados, las mismas vías también funcionan directamente en la defensa del huésped contra los virus atacando ARN viral para la degradación. Virus exitosos han desarrollado diversos mecanismos para evitar el silenciamiento, sobre todo a través de la expresión de los supresores virales de silenciamiento de ARN. Supresores de silenciamiento de ARN también se han identificado recientemente en las bacterias y los omicetos patógenos de plantas, lo que sugiere que la interrupción de silenciamiento del huésped es una estrategia de virulencia general de varias clases de patógenos de las plantas. También hay una creciente evidencia que las plantas han desarrollado defensas específicas contra la supresión del silenciamiento de ARN por patógenos, proporcionando un ejemplo más de la carrera armamentista molecular (Ver Figura 8) [3, 2].

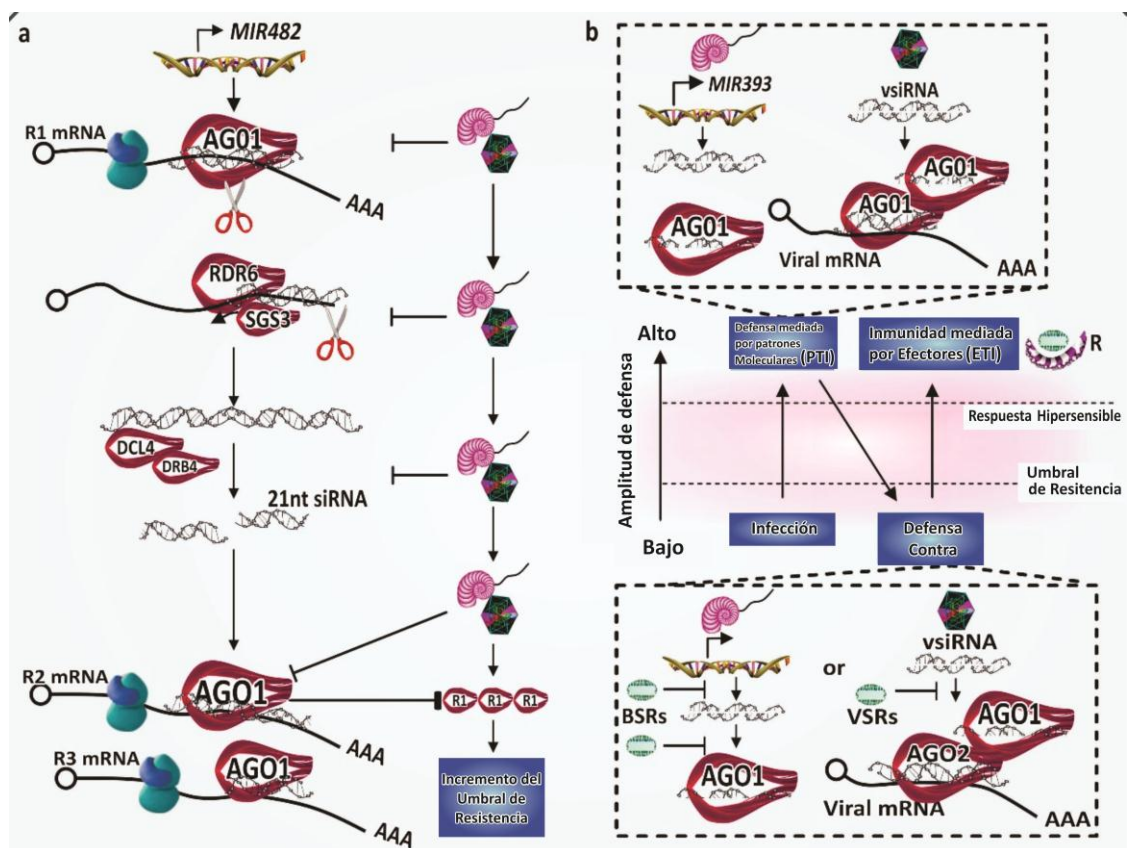


Figura. 8 Silenciamiento de ARN del huésped como mecanismo de defensa.

6. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

Tras la activación de las respuestas PTI o ETI, tiene lugar una serie de eventos de respuesta temprana como variaciones en la concentración de calcio citosólico, cambios en el pH extracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), y la activación de cascadas MAPKs y CDPKs. Igualmente, ocurren cambios en los niveles de ciertas hormonas vegetales, que van a jugar un papel central en la coordinación de la expresión de genes implicados en la respuesta defensiva [1].

Las fitohormonas son moléculas esenciales para la regulación del crecimiento, desarrollo, reproducción y supervivencia. Muchas de ellas poseen un papel relevante en la regulación de la respuesta inmune, donde condiciones de estrés biótico y abiótico generan cambios en las concentraciones de hormonas desencadenando toda una gama de respuestas. Las principales hormonas implicadas en la inmunidad vegetal son el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y sus derivados, y el etileno (ET). Posteriormente, se han identificado como nuevos mediadores de las respuestas defensivas, el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GA), las auxinas IAA, las citoquininas (CK) y los brasinoesteroides (BRs) [79]. Todas estas hormonas están desempeñando un papel fundamental en la regulación de las redes de inmunidad innata. Dependiendo de la interacción patógeno / huésped se activan una o varias rutas defensivas mediadas por estas hormonas [79]. En inmunidad existe una elevada interconexión entre las diversas cascadas de señalización interactuando de manera sinérgica o antagónica, proporcionando así a la célula una poderosa capacidad de regular la respuesta defensiva [79]. Por otra parte, algunos patógenos tienen la capacidad de alterar la homeostasis hormonal de la célula hospedadora, manipulando las rutas de defensa para asegurar su establecimiento. El resultado de esta interacción depende del equilibrio entre la capacidad del patógeno de suprimir las defensas de la planta y la habilidad de esta de reconocer al patógeno y activar defensas [55].

6.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción WRKY están implicados comúnmente en las respuestas de defensa de las plantas. El gen, *P trWRKY73*, de *P. trichocarpa* que es inducido por SA, perteneciente a la familia del grupo I, contiene dos dominios WRKY, un dominio D y un clúster de SP. *PtrWRKY73* se expresó principalmente en las raíces, hojas viejas, brotes y tallos, especialmente en el floema y su expresión fue inducida en respuesta al tratamiento con SA exógeno. *PtrWRKY73* se localizó en el núcleo de las células vegetales y exhibió la activación transcripcional. La sobreexpresión de *PtrWRKY73* en *A. thaliana* resultó en una mayor resistencia a una cepa virulenta de la bacteria patógena

P. syringae (Pst DC3000), pero más sensibilidad al hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*. Las proteínas de defensa, como PR1, PR2 y PAD4 cuya expresión se encuentra asociada con SA, fueron notablemente reguladas en plantas transgénicas que sobre expresan *PtrWRKY73*. NPR1 (*no eXpressor de PR1*) de *Arabidopsis* no se vio afectada, mientras que la expresión de un gen relacionado con la defensa PAL4 fue reducida. En conjunto, estos resultados indican que *PtrWRKY73* juega un papel positivo en la resistencia de la planta a los patógenos biotróficos pero un efecto negativo sobre la resistencia contra patógenos necrotróficos [80, 81].

6.2 ACIDO SALICÍLICO SA

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona esencial para la respuesta inmune contra patógenos biotróficos. La biosíntesis de SA se activa tanto en PTI como en ETI [82]. La señalización de SA es controlada en gran medida por la proteína reguladora NPR1, que tras la activación por SA actúa como coactivador transcripcional de un gran conjunto de genes relacionados con la defensa, como PR1. El ácido salicílico es un fenilpropanoide simple (C6-C1) que puede ser sintetizado por dos vías enzimáticas diferentes a partir del corismato (metabolito secundario). En una de las vías interviene la fenilalanina amonio liasa o PAL, mientras que en la otra el enzima implicada en su síntesis es la isocorismato. Las proteínas EDS participan en la iniciación de la biosíntesis del SA durante la respuesta PTI y ETI, si el reconocimiento es desencadenado por las proteínas R del tipo TIR-NBS-LRR. Si el reconocimiento se produce mediante proteínas R del tipo CC-NBS-LRR, la proteína NDR1 es quien desencadena la biosíntesis [55, 82, 83]. Dentro de la ruta señalizadora mediada por el SA cabe destacar el gen *NPR1* por su papel en la regulación positiva de la señalización, actuando como un co-activador transcripcional de los genes de defensa [82]. Muchos de los genes de defensa activados transcripcionalmente por la ruta del SA son genes PR, un grupo muy diverso de genes, de los cuales una amplia mayoría codifica proteínas con actividad antimicrobiana. PR1, PR2 y PR5 son los principales genes utilizados como marcadores de la respuesta de genes a SA, controlados principalmente por NPR1 [82].

En ausencia de SA, NPR1 está formando multímeros en el citoplasma. Tratamientos con SA inducen cambios redox en la célula, provocando la disociación del complejo NPR1, y permitiendo así la migración de los monómeros de NPR1 al interior del núcleo. En el núcleo NPR1 se une a factores de transcripción con motivos TGA (*TGACG motif binding*) que interactúan y activan promotores de los genes de respuesta a SA como *PR1*. Finalmente, NPR1 es fosforilada en dos residuos de serina (Ser11/15) y posteriormente ubiquitinado por la Ubiquitin E3 ligasa, *CULLIN3*. Esta ubiquitinación marca a NPR1 como diana del proteasoma para su posterior eliminación, previniendo la activación

continuada de la ruta defensiva dependiente de SA. Se ha visto que NPR1 interactúa también con factores de transcripción del tipo WRKY que regulan las respuestas mediadas por SA. (Ver Figura 9) [61, 81].

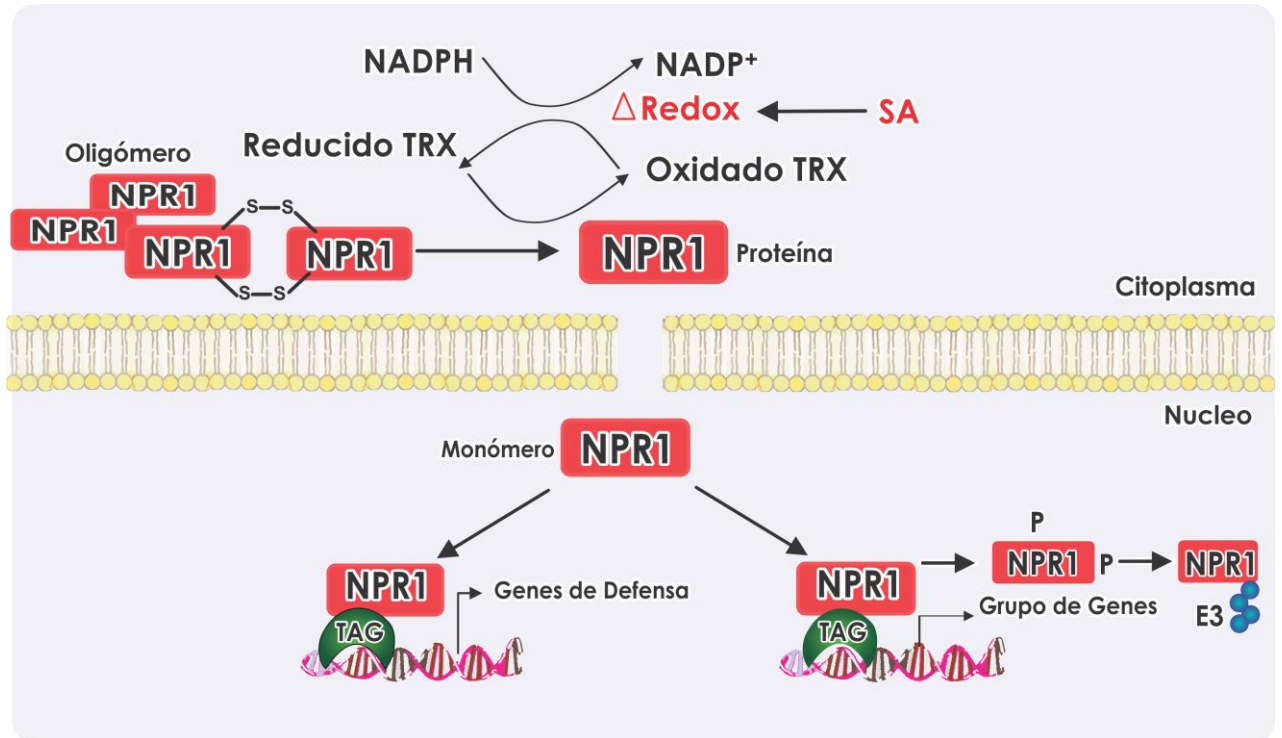


Figura.9 Señalización y activación de respuestas de defensa por el ácido salicílico SA.

Múltiples estudios han revelado una interacción antagónica entre SA y JA en señalización. Algunos agentes patógenos y herbívoros parecen inducir perturbación SA-JA. Por ejemplo, *P. syringae* produce coronatina, una toxina que imita el jasmonato bioactivo-JA isoleucina y promueve la reapertura de los estomas y propagación bacteriana en tejidos locales y sistémicos mediante la inhibición de acumulación y la señalización desencadenada por SA [61, 82]. Además del SA y JA, estudios recientes han revelado la implicación de otras fitohormonas, tales como etileno (*ET*), ácido ascítico (*ABA*), giberelina y auxina, en las interacciones bióticas. Cabe destacar que varios patógenos producen hormonas que imitan fitohormonas como la coronatina arriba mencionada [82].

A pesar de la diversidad funcional, casi todas las proteínas analizadas WRKY reconocen las secuencias de la caja W TTGACC / T y, por lo tanto, mecanismos distintos reconocimientos de los principales elementos de la caja W promotoras son necesarias para lograr la especificidad de regulación de los factores de

transcripción WRKY [80]. Las investigaciones realizadas durante los últimos años han puesto de manifiesto que los factores de transcripción WRKY interactúan físicamente con una amplia gama de proteínas con papeles en la señalización, la transcripción y remodelación de la cromatina [80]. Los estudios de las interacciones de proteínas WRKY han proporcionado importantes conocimientos sobre la regulación y el modo de acción de los miembros de la importante familia de factores de transcripción. También ha surgido que los dominios WRKY ligeramente variados y otros motivos de proteínas conservadas dentro de cada una de las siete subfamilias WRKY participan en las interacciones proteína-proteína y median las interacciones funcionales de complejos entre proteínas WRKY y entre WRKY y otras proteínas reguladoras en la modulación de procesos biológicos importantes [80].

Utilizando secuencias del genoma de *Hpa* (*Hyaloperonospora arabidopsis*) y *Arabidopsis* para medir los cambios de expresión génica tanto en *Hpa* y *Arabidopsis* simultáneamente durante la infección, se revelaron patrones de expresión de genes de *Hpa* y de *Arabidopsis* en interacciones compatibles e incompatibles, y elementos de promotores asociados con genes *Hpa* expresados durante la infección [82]. Por re secuenciación de *Hpa* se aisló *Waco9*, se encontró que evade la resistencia del gen *RPP1* de *Arabidopsis* a través del efector ATR. En *Arabidopsis* los genes de respuesta a SA incluyendo *PR1* se activaron no solo al comienzo en la interacción incompatible, sino también al final en la interacción compatible [82]. Por análisis histoquímico, se encontró que *Hpa* suprime expresión de *PR1* inducible por SA, específicamente en las células haustoriales donde se depositan los efectores, pero no en células no haustoriales adyacentes. Por último, se encontró con una alta expresión de un gen candidato a efector de *Hpa* que suprime la capacidad de respuesta a SA [82].

6.3 ÁCIDO JASMÓNICO (JA) Y ETILENO (ET)

Estas dos hormonas generalmente actúan de forma sinérgica y desarrollan una función fundamental en la defensa frente a patógenos necrótrofos e insectos herbívoros [83, 84].

Los jasmonatos son moléculas derivadas del ácido α -linoléico (α -LA) presente en los lípidos de la membrana plasmática [83, 84]. Cuando la planta está en condiciones normales es decir no estresada los niveles de JA son bajos y la actividad transcripcional del factor MYC2 está reprimida por las proteínas JAZ (*Jasmonate Zim-domain*).

Estas proteínas forman un complejo Transcripcional represor junto a las proteínas NINJA (*Novel interactor of JAZ*) y TOPLESS (*TPL*), reprimen la transcripción a

través de la histona deacetilasa 6(HDA6) y HDA19. Tras la estimulación los JAZs son reclutados por COI1 y sometidos a ubiquitinización y posterior degradación por el proteasoma 26S. Posteriormente, MYC2 puede activar la transcripción de genes tempranos JA sensibles tales como los que codifican JAZ y MYC2. La transcripción esta mediada por la subunidad 25 de complejo MED25 [83].

El etileno es una fitohormona gaseosa implicada principalmente en mecanismos de maduración y senescencia y además es importante modulador de la inmunidad innata [85]. En *Arabidopsis* se han identificado cinco receptores de Etileno, ETR1 y ETR2 (*Ethylene Responsive1*), ERS 1 y ERS2 (*Ethylene Sensor1*) y EIN4 (*Ethylene sensitive 4*) que se localizan en el retículo endoplásmico como homodímeros [46]. En ausencia de etileno, los receptores como ETR1 activan la proteína quinasa CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*), un dímero que fosforila el dominio C-terminal de EIN2, evitando su localización nuclear. Sin etileno, EIN2 sufre degradación proteosomal por proteínas F-boxETP1/2. Factores de transcripción EIN3/EIL1 también son objeto de la degradación por proteínas F-boxEBF1/2. En presencia de etileno, los receptores son inactivados y por lo tanto la quinasa CTR1 ya no está activa, por consiguiente EIN2 no es fosforilada lo que provoca su separación y el movimiento del C-terminal hacia el núcleo. Una vez en el núcleo, el C-terminal de EIN2 posiblemente regula los factores de transcripción EIN3/EIL1 aguas abajo, ya sea directamente o a través de otros componentes, (*Ver Figura 10*) [85].

En numerosos estudios se ha comprobado la acción antagónica entre el SA y el JA, siendo el ET un modulador; sin embargo dependiendo de la especie vegetal y el tipo de patógeno que produzca la infección, el JA puede actuar sinérgicamente con la ruta del SA [61].

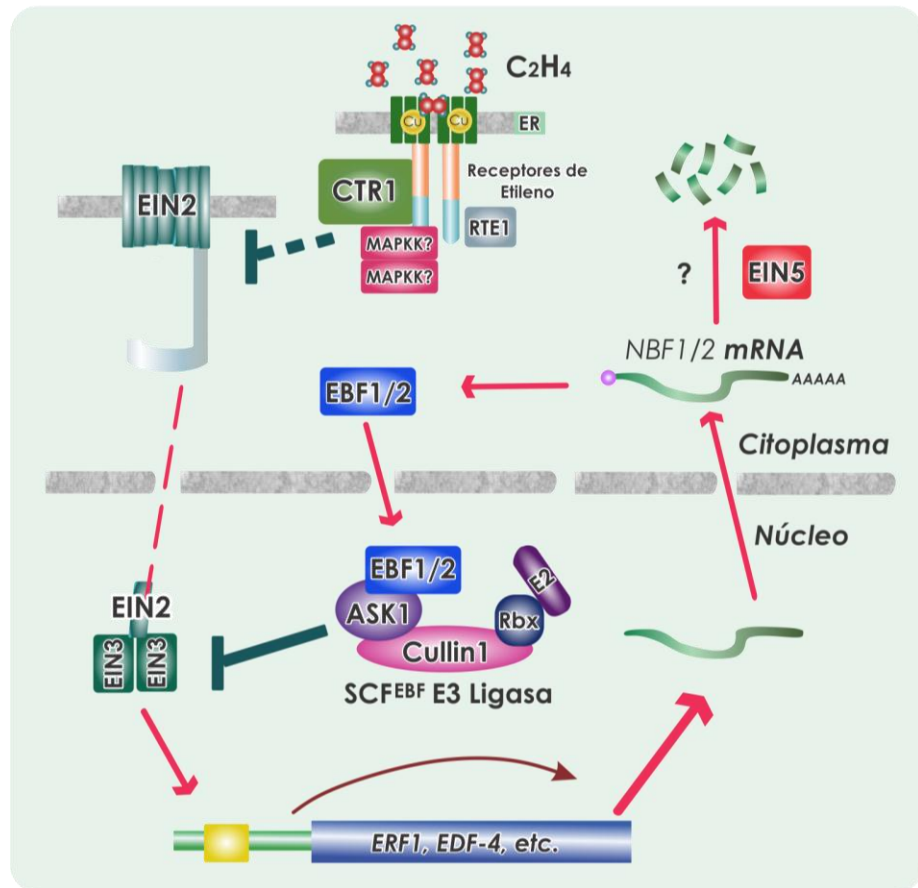


Figura. 10 Regulación de respuestas de defensa en la planta por Etileno.

Un modelo de la función de EIN5 en la vía de transducción de señal de etileno. El etileno (C_2H_4) es percibido por la represión de la acción de los complejos receptores incluyendo receptores ETR / ERS / EIN4, RTE1 y Raf-como la proteína quinasa CTR1, la cual regula negativamente el componente de señalización corriente abajo EIN2. Tras el tratamiento de etileno, EIN2 es activado y por lo tanto podría transmitir la señal en el núcleo a un número de factores de transcripción, incluyendo EIN3 y EIL1. EIN3 se une directamente a los elementos reguladores de los genes diana e induce la expresión de otros factores de transcripción (es decir, ERF y FED) que en última instancia regulan una serie de respuestas de etileno. En ausencia de señal de etileno, un Skp1-Cullin complejo 1-fbox que consiste en una de las dos proteínas F-box, la expresión EBF1 gen / EBF2 es inducida por etileno de una manera EIN3-dependiente, lo que produce retroalimentación negativa sobre la función EIN3. EIN5, un 3' → 5' exoribonucleasa, es involucrado en facilitar la facturación de EBF1 / EBF2 Mrna a través de un mecanismo aún desconocido. Por lo tanto, se propone EIN5 para antagonizar la regulación de retroalimentación negativa sobre EIN3 promoviendo EBF1 y EBF2 decadencia mRNA lo cual trae como consecuencia.

Por lo tanto, se propone EIN5 para antagonizar la regulación de retroalimentación negativa sobre EIN3 promueve la disminución de mRNA de EBF1 y EBF2, como consecuencia permite la acumulación de proteína EIN3 para desencadenar la respuesta de etileno.

7. HORMONAS ASOCIADAS A DEFENSA

En los últimos años se han descrito nuevos mediadores de las respuestas defensivas, como el ABA, ácido absísico, las giberelinas, las citoquininas, las auxinas y los brasinoesteroides [61, 81].

El ABA controla procesos del desarrollo y de la respuesta inmune. En desarrollo, interviene en la germinación, dormancia, apertura de estomas y respuestas a estreses abióticos como la sequía, mientras que en defensa actúa como un regulador positivo o negativo dependiendo del tipo de interacción planta-patógeno objeto de estudio [61, 81]. En la interacción *A. thaliana*-PcBMM, el bloqueo de la ruta mediada por el ABA activa las rutas de señalización reguladas por el SA, JA y ET, produciendo un aumento de la resistencia frente a hongos necrótrofos. Esto concuerda con que la aplicación exógena de ABA que suprime la activación de genes marcadores de las rutas de JA/ET como PDF1.2 y PR4. Sin embargo, en respuesta a heridas, el ABA actúa sinérgicamente con JA permitiendo la expresión de MYC, y antagonizando la acción de ERF1 [61, 81, 84].

Las giberelinas controlan el crecimiento mediante la degradación de las proteínas represoras del crecimiento, DELLA. Mutaciones en estas proteínas incrementan la resistencia a pst, asociado a un aumento de biosíntesis del SA, y generan una mayor susceptibilidad a patógenos necrótrofos como *A. brassicola* y *A. cinérea* [61, 81, 84]. Existen evidencias de la interacción de las proteínas DELLA con la ruta del JA ya que secuestran a las proteínas JAZ evitando la represión del factor transcripcional MYC2 y permitiendo la expresión de genes de la ruta del JA [79].

Las Citoquininas son conocidas por su importante función en la regulación del crecimiento del tallo y la radícula, y en la senescencia foliar. Su contribución a la respuesta inmune se evidencia porque niveles altos de CKs inducen un aumento de SA. La sinergia entre las Citoquininas y el SA, ocurre por la activación del factor de transcripción, ARR2 (*Type B phospho-accepting response regulator 2*). Capaz de unirse al factor de transcripción TGA3 que regula positivamente la expresión de ciertos genes PR [79, 81].

Las auxinas regulan positivamente procesos de crecimiento y desarrollo. En inmunidad interactúan antagónicamente con la ruta del SA, ya que la represión de la señalización mediada por auxinas por la ruta del SA confiere una elevada resistencia frente a bacterias [66, 81]. Sin embargo mutantes en la señalización de auxinas como, *axr*, *axr2*, y *axr6* (*Auxin-resistance-2-6*) presentan mayor susceptibilidad a hongos necrótrofos como *P. cucumerina* y a *B. cinérea*. Estos efectos opuestos de las auxinas en la progresión de las infecciones causadas por bacterias hemibiótrofas y hongos necrótrofos sugieren que la señalización mediada por auxinas es un componente integral de la compleja red hormonal que modula las respuestas inmunes a los distintos patógenos [79, 81].

Los brasinoesteroides, son hormonas vegetales que actúan a bajas concentraciones como reguladores del crecimiento actuando en procesos de expansión, división y diferenciación celular de tejidos. Su papel en defensa se comenzó a estudiar por la implicación de BAK1 (*Bril-Associated receptor Kinase 1*) en la respuesta. Tratamientos con BL (*24-epibrasinolide epiBL*) incrementan la resistencia a un amplio número de patógenos biotróficos, por acumulación de elevados niveles de SA y activación de la expresión de PR1 [61, 81].

8. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN PROTEÍNAS

La proteómica se define generalmente como el estudio simultáneo y de alto rendimiento de perfiles de expresión de proteínas en células, tejidos, órganos y organismos. Es una disciplina científica relativamente nueva que se ha desarrollado muy significativamente en la última década y ahora es reconocida como uno de los instrumentos más importantes utilizados en la identificación y caracterización de proteínas o genes de interés.

Los investigadores han recurrido a la proteómica para estudiar productos génicos y validar sus funciones debido a que la disponibilidad de las secuencias del genoma completo de una variedad de organismos en sí misma no es suficiente para determinar la función biológica. Datos proteómicos para un experimento incluye perfiles de expresión cuantitativas, perfiles de modificaciones postraduccionales (PTMs) y las redes de interacción de proteínas. [46, 67, 86, 87, 88]. El éxito en la investigación proteómica se atribuye a los avances en diversas plataformas tecnológicas asociadas a las técnicas basadas en espectrometría de masas MS. La cuantificación exacta de proteínas y péptidos en los sistemas biológicos complejos es una de las áreas más difíciles de la proteómica, los

descubrimientos apuntan a mejorar la sensibilidad y el rendimiento de dicha tecnología.

Es el método principal para el análisis a gran escala de proteomas complejos, junto con las mejoras recientes en las tecnologías de separación de líquidos y algoritmos para la identificación de proteínas / péptidos. La proteómica basada en espectrometría de masas MS y electroforesis bidimensional en gel (2-DE) se ha convertido en una poderosa herramienta de análisis y valiosa para estudiar sistemas biológicos muy complejos y dinámicos [46, 67, 86, 87, 88].

El éxito de cualquier estrategia proteómica radica en los diversos factores que incluyen el aislamiento del componente completo de las proteínas, la separación, la visualización y su identificación exacta. Con la realización de proyectos de genoma de *A. thaliana*, *O. sativa* y otras especies de plantas, un número cada vez mayor de secuencias de todo el genoma están ahora disponibles (*Ver Figura 11,12*), sin embargo el entendimiento de como funcionan estas secuencias requiere del estudio de su expresión a nivel transcripcional y protéico.

La proteómica en la patología de la planta se está volviendo más común con técnicas como las anteriormente mencionadas las cuales se utilizan para caracterizar los factores de virulencia y patogenicidad celulares y extracelulares producidas por patógenos, así como para identificar cambios en los niveles de proteínas en plantas hospederas tras la infección por organismos patógenos y contrapartes simbióticas [46, 67, 86, 87, 88].

A continuación se describen las técnicas más importantes y utilizadas en la actualidad para el estudio de proteínas.

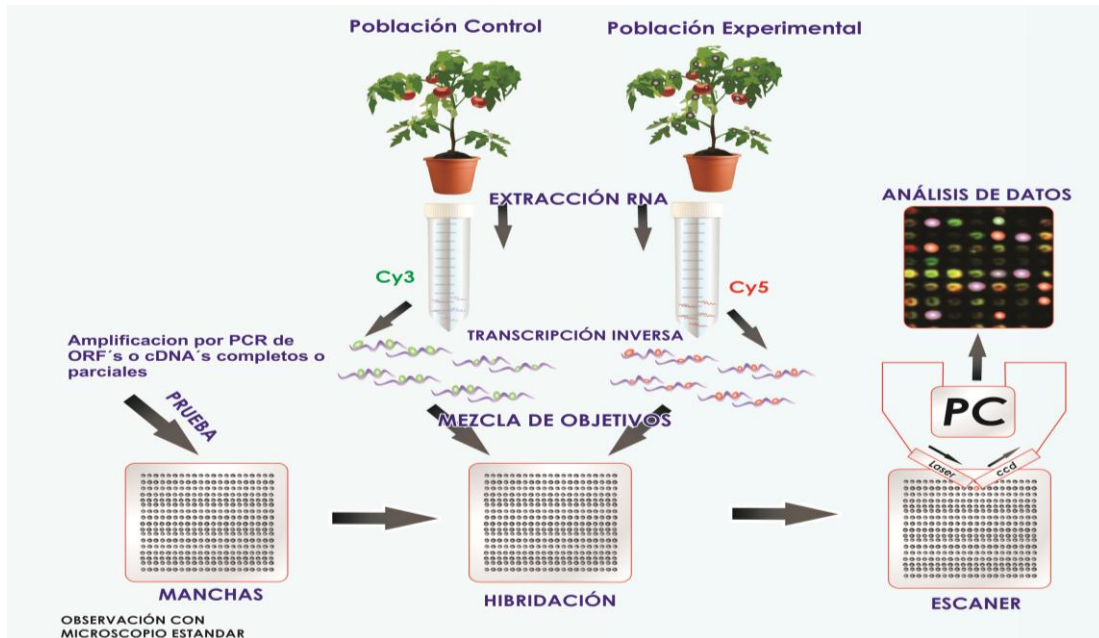


Figura.11 Esquema del procedimiento para estudiar genes de expresión diferencial.

8.1. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS

Debe emplearse algún rasgo identificable de la proteína específica como prueba para identificar la cantidad relativa de esta en la muestra. Si la proteína es una enzima, puede recurrirse a su actividad catalítica como prueba para vigilar la purificación. Otra alternativa es criterios inmunológicos.

8.2 PRECIPITACIÓN SELECTIVA

Diferencias en la solubilidad, entre las proteínas mediante la precipitación selectiva de la proteína deseada. La solubilidad depende mucho de la distribución de cadenas laterales hidrófilas e hidrófobas en su superficie. La sal que más se utiliza para la precipitación selectiva de proteínas es el sulfato de amonio, que es muy soluble en agua muy tiene una gran fuerza iónica.

8.3 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA EN COLUMNA

La solución de muchos procedimientos cromatograficos mejoro en los últimos años gracias al desarrollo de la cromatografía liquida de alto desempeño (HPLC, HIGH performance liquid chromatogographi) en la que se usa columnas largas y delgadas, y la fase móvil se obliga a pasar por una matriz apretada no comprensible compuesta por partículas muy pequeñas que está sometida a alta presión. Además de estas exsiten otras como: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía por afinidad.

8.4 DETERMINACIÓN DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA - PROTEÍNA

Una de las maneras de aprender respecto a la función de una proteína consiste en identificar las proteínas con la que interactúa. La técnica de uso más frecuente para buscar interacciones proteína-proteína es el sistema de dos híbridos de levaduras que Stanley Fields y Ok-kyu Song de la ciudad de Nueva York State Univerity en Stony Brook invetaron en 1989. Esta técnica donde de la expresión gen reportero, como la galactosidasa, cuya actividad es fácil de vigilar mediante una prueba que detecta el cambio de color en presencia de la enzima en una población de células de levaduras. Otra técnica utilizada para determinar la interacción de la proteína es la cromatografía por afinidad o anticuerpos.

9. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se utiliza para fraccionar proteínas; depende de la capacidad de moléculas cargadas para migrar cuando se colocan en un campo eléctrico. La separación electroforética de proteínas casi siempre se realizan por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). El movimiento relativo de las proteínas por un gel de poliacrilamida depende de la densidad de carga de las moléculas. Y también depende del tamaño y forma. Además existe la técnica Electroforesis Bidimensional en Gel, en la cual primero las proteínas se separan en un gel tubular según su punto isoeléctrico, mediante una técnica llamada enfoque isoeléctrico. Tras la separación, el gel se retira y se coloca arriba de una losa de poliacrilamida saturada con SDS para someterla a SDS-PAGE. Las proteínas se mueven hacia el gel de la losa se separan de acuerdo con su masa molecular. Una vez separadas, las proteínas individuales pueden retirarse del gel y dirigirse en fragmentos pépticos susceptibles de analizarse mediante espectrometría de masa.

10. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNA

ESPECTROMETRÍA DE MASA

Los espectrómetros de masa son instrumentos analíticos que se usan sobre todo para medir las masas de moléculas, determinar formulas químicas y estructura molecular.

Las proteínas de interés en un experimento de proteómica pueden ser analizadas directamente mediante espectrometría de masas. El punto de partida puede ser diferente. Si se parte de proteínas separadas mediante 1 D o 2D PAGE, el primer paso del análisis consistiría en recortarlas directamente del gel dónde han sido resueltas ("picado" de spots). Este proceso de recorte se lleva a cabo en una estación automática de picado de geles (ProPic, Genomics Solutions) disponible en nuestro Servicio/Unidad. Con el uso del robot evitamos la manipulación del gel y la posible contaminación con queratinas. También se puede "spots" recortados manualmente los laboratorios, pidiendo a los mismos que extremen la limpieza y que además envíen "spots" control (proteínas conocidas, por ejemplo marcadores de peso molecular).

Si se parte de muestras líquidas (fracciones de una cromatografía o un extracto proteico que contenga mezcla de proteínas) comenzaríamos llevando a cabo una limpieza de la muestra, seguida de la desnaturalización, reducción y alquilación de la misma. En ambos casos (proteínas separadas en gel o proteínas en solución), el siguiente paso en el procedimiento sería la digestión de las mismas mediante una proteasa específica (generalmente tripsina porcina), que genera un conjunto de péptidos que pasan a ser analizados por espectrometría de masas siguiendo diferentes metodologías: Identificación de proteínas mediante Huella Peptídica MS-MS.

(Ver Figura 12)

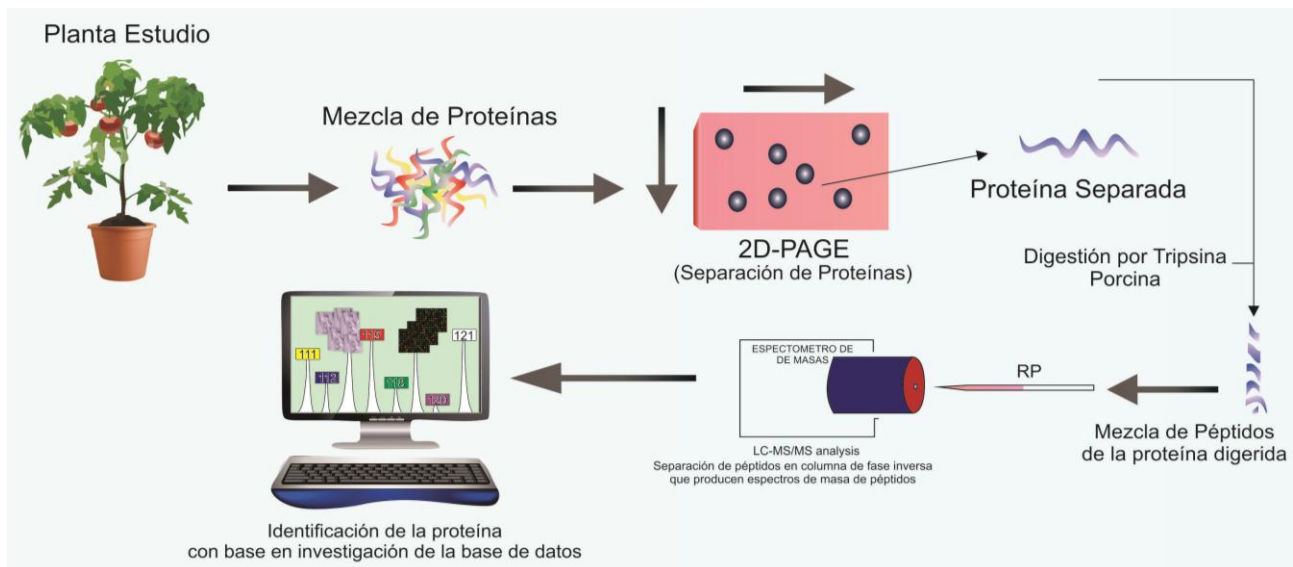


Figura 12. Técnicas bioquímicas y procedimiento para el estudio de proteína.

11. CONCLUSIONES

Los modelos genéticos y moleculares de la inmunidad en plantas, utilizando diversos patosistemas, muestran grandes avances en lo que se refiere a los componentes de este proceso biológico, es decir se conocen genes, proteínas y su modo de acción en la interacción planta-patógeno. Sin embargo surge una pregunta y es como se articulan cada uno de los componentes del sistema para proporcionar una respuesta de resistencia adecuada. Este interrogante no solo surge de quien escribe, sino de muchos investigadores expertos en el tema.

Para precisar esta angustia científica y que no quede como filosófica, se debe puntualizar varios aspectos:

En primer lugar el uso de pato sistemas para el estudio de la inmunidad en plantas ha sido valioso teniendo en cuenta, que si bien existen diferencias biológicas en cada uno de ellos, también es cierto que las moléculas presentes en todos organismos son esencialmente las mismas, es decir, proteínas, lípidos, azúcares, e incluso metabolitos secundarios y hormonas que median la transducción de señales también son compartidos por muchos seres vivos. Además la experimentación así lo demuestra, pues son más las coincidencias que las diferencias utilizando diversos pato sistemas.

Las plantas resisten la invasión de patógenos a través de un sistema inmune innato de dos niveles, por reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos PAMP y por efectores llamado ETI. En las interacciones planta-patógeno, los PAMP son estructuras relativamente conservadas a nivel de género y son directamente reconocidos por los receptores de inmunidad localizados en la membrana plasmática, conocidos como PRRs, que desencadenan la respuesta PTI. Este tipo de respuesta de defensa es frecuentemente débil, aunque no siempre, y se le relaciona con el tipo de resistencia no hospedero, cuantitativa u horizontal. Mientras que ETI es la respuesta al reconocimiento de efectores por parte de proteínas de resistencia R y se caracteriza por ser más contundente y presentar muerte celular localizada, HR. Se considera que ETI confiere resistencia cualitativa o raza específica. A pesar de lo anterior se ha encontrado respuestas de ETI débiles y PTI fuertes, por lo tanto la resistencia cualitativa puede ser mediada por cualquiera de los genes *R* que funcionan en la ETI o genes que codifican PRR que funcionan en PTI.

En las investigaciones de Fukuoka *et al*, y Jo en arroz y papa respectivamente, solo por nombrar algunas, se evidencia la relación entre resistencia cualitativa y cuantitativa. Fukuoka *et al* describe como el gen del arroz Pi35 está involucrado en la resistencia mediada por QTL y es miembro de la clase NBS-LRR, una clase importante de genes *R*. Un alelo débil de un gen *R* se considera que es un componente de defensa de la planta, sin embargo la evidencia directa que una NBS-LRR y QTL es limitado. Por lo tanto aunque ya se conocen muchas de las partes del rompecabezas llamado inmunidad en plantas, aún falta por dilucidar el límite entre resistencia cualitativa y cuantitativa, si es que lo hay. Esto es de gran importancia en programas de fitomejoramiento, pues la base para mejorar resistencia en plantas es la combinación de genes de resistencia; es decir la incorporación de múltiples genes *R* en cultivares individuales para lograr una mayor durabilidad, este proceso se conoce como piramidaje de genes.

En relación con el mecanismo de acción de los efectores, se puede decir que estos actúan de varias formas para romper la defensa de la planta. Durante los últimos años, han aparecido pruebas de que las vías de ubiquitina-proteasoma juegan un papel importante en la inmunidad y por lo tanto son subvertidos por bacterias patógenas, especialmente. Las mejores proteínas efectoras caracterizadas o toxinas con respecto a la explotación de la UPS se pueden encontrar en *Pseudomonas syringae pv.* de tomate. Algunos de estos efectores imitan ligasas E3, por ejemplo, AvrPtoB, para suprimir varios eventos PTI y ETI, mientras que otros, tales como HopM1 promueven la ubiquitinización de su proteína diana para inhibir ciertas respuestas de defensa inducidas. Una forma más directa de subvertir el UPS se consigue por una toxina de *P. syringae* que se dirige directamente a las subunidades catalíticas del proteasoma 26S para inhibir su actividad y suprimir las reacciones inmunes de la planta.

La reprogramación transcripcional es un proceso crucial en la inmunidad de las plantas. La inducción o represión de genes de defensa está regulada por las redes de señalización que están dirigidas por hormonas vegetales de las cuales el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) son los más importantes. Basados en los estudios con *Arabidopsis thaliana* se sabe que el SA puede influir en la actividad y / o localización de reguladores transcripcionales por modificaciones post-traduccionales de factores de transcripción y co-reguladores. El SA induce cambios redox, mediados por tiorredoxinas y glutaredoxinas, que lleva a modificar reguladores transcripcionales que están implicados en la supresión de genes

dependientes de JA, tales como NPR1 y factores de transcripción TGA, que afecta a su actividad o la localización de unión a ADN.

Finalmente las investigaciones actuales y futuras deben encaminarse hacia las rutas de señalización, que aunque hay puntos clave que se saben y las hormonas que actúan, aun falta mucho por esclarecer en este aspecto

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a la doctora Ibonne, por aceptar la tutoría de este trabajo y la forma tan acertada de orientarme, dándome libertades, pero al mismo tiempo corrigiéndome y guiándome para lograr un trabajo bueno. También a la doctora Dolly Montoya por permitir desarrollar este trabajo con su grupo de investigación Bioprocesos y Bioprospección. Y finalmente a la Universidad de Pamplona, en cabeza de su rector el doctor Elio Serrano.

REFERENCIAS

1. Buscaill P, Rivas S. Transcriptional control of plant defense responses. *Curr Opin Plant Biol* 2014; 20(1):35-46.
2. Tsuda K, Somssch I. Transcriptional networks in Plant Immunity. *New Phytologist* 2015; 206(3):932-947.
3. Li F, Cheng C, Cui F, de Oliveira M, Yu X, Meng X, et al. Modulation of RNA Polymerase II Phosphorylation Downstream of Pathogen Perception Orchestrates Plant Immunity. *Cell Host & Microbe* 2014; 16(6):748-758.
4. Gao X, He, P. (2013). Nuclear dynamics of *Arabidopsis* calcium –dependent Protein Kinases in effector – triggered Immunity. *Plant Signaling & Behavior* 2013; 8(4): e23868. doi: 10.4161/psb.23868.
5. Fukuoka S, Saka N, Mizukami Y, Koga H, Yamanouchi U, Yoshioka Y, et al. Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice. *Nature Scientific Reports* 2015; 5(7773): doi:10.1038/srep07773.
6. Fukuoka S, Yamamoto S, Mizobuchi R, Yamanouchi U, Ono K, Kitazawa N, et al. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Scientific Reports* 2014; 4(4550):doi:10.038/srp04550.
7. Jo K, Visser R, Jacobsen E, Vossen J. Characterisation of the late blight resistance in potato differential MaR9 reveals a qualitative resistance gene, R9a, residing in a cluster of Tm-2 (2) homologs on chromosome IX. *Theor Appl Genet* 2015; 128(5):93 41.
8. Haitao Z, Wang S. Rice versus *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*: a unique Pathosystem. *Curr Opin Plant Biol* 2013; 12885):188-195.
9. Haitao H, Jing W, Chan S, Can Y, Chunfang P, Junjie Y, et al. A receptor like kinase gene with expressional responsiveness on *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* is essential for Xa21-mediated disease resistance. *Rice a Springer Open Journal* 2014; 8(1):doi:10.1186/s12284-014-0034-1
10. Wu Y, Xiao N, Yu L, Pan C, Li Y, Zhang X, et, al. Combination patterns of major r genes determine the level of resistance to the *M. oryzae* in Rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS.One* 2015; 10(6):doi:10.1371/journal.pone.0126130.

11. Willmann R, Lajunen H, Erbs G, Newman M, Kolb D, Tsuda K, et al. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad.Sci U S A* 2011; 108(49):19824-19829.
12. Singh S, Chand S, Singh N, Raj T. Genome-Wide Distribution, Organisation and Functional Characterization of Disease Resistance and Defence Response Genes across Rice Species. *Plos One* 2015; 10(1):doi:10.1371/journal.pone.0125964
13. Brown J, Chartrain L, Lasserre P, Saintenac C. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet Biol* 2015; 79(1):33-31.
14. Marone D, Russo M, Laidò G, De Leonardis A, Mastrangelo A. Plant Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4):7302-7326.
15. Yuan Q, Zhanji L, Suping F, Manish P, Xiaoping C, Albert K, et al Identification of expressed Resistance Gene Analogs (RGA) and development of RGA-SSR Markers in Tobacco. *Arch Biol Belgrade* 2015; 67(2):467-481.
16. Zhang R, Murat F, Pont C, Langin T, Salse J, et al. Paleo-evolutionary plasticity of plant disease resistance genes. *BMC Genomics* 2014; 15(5):1471-1485.
17. Zhong Y, Huan Y, Sargent D, Malnoy M, Cheng Z. Species-specific duplications driving the recent expansion of NBS-LRR genes in five Rosaceae species. *BMC Genomics* 2015; 16(77):doi: 10.1186/s128664-015-1291-0.
18. Lozano R, Ponce O, Ramirez M, Mostajo N, Orjeda G. Genome-Wide Identification and Mapping of NBS-Encoding Resistance Genes in *Solanum tuberosum*, Group Phureja. *PLoS One* 2012; 7(4):e34775.
19. Dehury B, Chandra M, Maharana J, Sahu J, Sen P, Kumar M, et al. Structure-Based Computational Study of Two Disease Resistance Gene Homologues (Hm1 and Hm2) in Maize (*Zea mays L.*) with Implications in Plant-Pathogen Interactions. *PLoS One* 2014; PLodoi:10.1371/journal.pone.0097852.
20. Chen J, Huang J, Li N, Ma X, Wang J, Liu C, et al. Genome-wide analysis of the gene families of resistance gene analogues in cotton and their response to *Verticillium* wilt. *BMC Plant Biology* 2015; 15(1):148.

21. Kim J, Lim C, Lee B, Choi J, Oh S, Ahmad R, et al. A Genome-Wide Comparison of NB-LRR Type of Resistance Gene Analogs (RGA), in the Plant Kingdom. *Mol Cells* 2012; 33(4):385-392.
22. Lozano R, Hamblin M, Prochnik S, Jannink J, et al. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the *Cassava* genome. *BMC Genomics* 2015; 16(7):360.doi:10.1186/s12864-015-1554-9.
23. Guo Y, Fitz J, Schneeberger K, Ossowski S, Cao J, Weigel D. Genome-wide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich-repeat-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2011; 157(2):757–769.
24. Yue J, Meyers B, Chen J, Tian D, Yang S. Tracing the origin and evolutionary history of plant NBS-LRR genes. *New Phytol* 2012; 193(4):1049-1063.
25. Xue J, Wang Y, Wu P, Wang Q, Yang L, Pan X, et al. A primary survey on bryophyte species reveals two novel classes of nucleotide-binding site (NBS) genes. *PLoS One* 2012;. doi: 10.1371/journal.pone.0036700.
26. Kang Y, Kim K, Shim S, Young M, Sun S, Young M, et al. Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean. *BMC Plant Biol* 2012; 12(139): doi:10.1186/1471-2229-12-139.
27. Jupe F, Pritchard L, Etherington G, MacKenzie K, Cock P, Wright F, et al. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC Genomics* 2012; 13(75):doi:10.1186/147-2164-13-75.
28. Tan S, Wu S. Genome Wide Analysis of Nucleotide-Binding Site Disease Resistance Genes in *Brachypodium distachyon*. *Comparative and Functional Genomics* 2012; 2012(1):1-12.
29. Li X, Cheng Y, Ma W, Zhao Y, Jiang H, Zhang M. Identification and characterization of NBS-encoding disease resistance genes in *Lotus japonicus*. *Plant Syst* 2010; 289(1):101-110.
30. Román V, López C. Análisis Genómico-Funcional de Proteínas con dominios TIR en yuca. *Acta Biol Colomb* 2012; 17(3):1-14.
31. Nepal M, Benson B. CNL Disease Resistance Genes in Soybean and Their Evolutionary Divergence. *Evol Bioinform Online* 2015; 11(1):49-63.
32. Macho A, Zipfel, C. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol* 2015; **23(1)**:14-22.

33. Liu B, Li J, Ao Y, Qu J, Li Z, Su J, et al. Lysin Motif-Containing Proteins LYP4 and LYP6 Play Dual Roles in Peptidoglycan and Chitin Perception in Rice Innate Immunity. *The Plant Cell* 2012; 24(8):3406-3419.
34. Lin W, Lia B, Lub D, Chend S, Zhud N, Heb P, et al. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates *Arabidopsis* innate immunity. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111(9):3632-3637.
35. Holton N, Nekrasov V, Ronald P, Zipfel C. The Phylogenetically-Related Pattern Recognition Receptors EFR and XA21 Recruit Similar Immune Signaling Components in Monocots and Dicots. *PLoS Pathogen* 2015; 11(1):doi: 10.1371/journal.ppat.1004602.
36. Lannoo N, Van Dame E. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci* 2014; 5(397):doi:10.3389/fpls.2014.00397.
37. Atalah A, Vanderschaeghe D, Bloch Y, Proost P, Plas K, Callewaert N, et al. Characterization of a type D1A EUL-related lectin from rice expressed in *Pichia pastoris*. *Biol Chem* 2014; 395(4):413-24.
38. Atalah A, De Vleeschauwer D, Xu J, Fouquaert E, Höfte M, Van Damme E. Transcriptional behavior of EUL-related rice lectins toward important abiotic and biotic stresses. *Plant Physiol* 2014; 171(12):986-992. doi:10.1016/j.jplph.2014.04.004.
39. Chen X, Zuo S, Schwessinger B, Chern M, Canlas P, Ruan D, et al. An XA21-associated kinase (OsSERK2) regulates immunity mediated by the XA21 and XA3 immune receptors. *Mol Plant* 2014; 7(5):874-92.doi10.1093/mp/ssu003.
40. Gilardoni P, Hettenhausen C, Baldwin I, Bonaventure G. *Nicotiana attenuata* Lectin Receptor Kinase 1 suppresses the Insect-Mediated Inhibition of Induced Defense Responses during *Manduca sexta* Herbivory. *The Plant Cell* 2011; 23(9):3512-3532.
41. Hove J, Fouquaert E, Smith D, Proost P, Van Damme E. Lectin activity of the nucleocytoplasmic EUL protein from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414(1):101-105.
42. Lizasa E, Mitsutomi M, Nagano Y. Direct binding of a plant lysm receptor-like Kinase, LysM RLK1/CERK1, to Chitin in Vitro. *J Biol Chem* 2010; 285(5):2996-3004.

43. Ranf S, Gisch N, Schäffer M, Illig T, Westphal L, Knirel Y, et al. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology* 2015; 16(1):426–433.
44. Wan J. Diverse roles of Lysin-Motif (LysM) proteins in mediating plant-microbe interactions. *Walailak J. Sci. & Tech* 2015; 12(8):631-641.
45. Wang Y, Weide R, Govers F, Bouwmeester K. L-type lectin receptor kinases in *Nicotiana benthamiana* and tomato and their role in *Phytophthora* resistance. *J Exp Bot* 2015; 66(21):6731-6743.
46. Franck W, Gokce E, Randall S, Oh Y, Eyre A, Muddiman D, et al. Phosphoproteome Analysis Links Protein Phosphorylation to Cellular Remodeling and Metabolic Adaptation during Magnaporthe oryzae Appressorium Development. *J Proteome Res* 2014; 14(6):2408-2424.
47. Häweker H, Rips S, Koiwa H, Salomon S, Saijo Y, Chinchilla D, et al. Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity. *J Biol Chem* 2010; 285(7):4629-4636.
48. Park C, Roland P. (2012). Cleavage and nuclear localization of the rice XA21 immune receptor. *Nature Communications* 2012; 3(920):doi: 10.1038/ncomms 1932.
49. Sing P, Kuo Y, Mishra S, Tsai C, Chien C, Chen C, et al. The Lectin Receptor Kinase-VI.2 Is Required for Priming and Positively Regulates *Arabidopsis* Pattern-Triggered Immunity. *Plant Cell* 2012; 24(3):1256-1270.
50. Vaid N, Pandey P, Tuteja N. Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol* 2012; 80(4):365–388.
51. Schulze B, Mentzel T, Jehle A, Mueller K, Beeler S, Boller T, et al. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem* 2010; 285 (13):94444-51.
52. Halter T, Imkampe J, Mazzotta S, Wierzba M, Postel S, Bücherl C, et al. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity *Curr Biol* 2014; 24(2):134-143.
53. Block A, Alfano J. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effector: Virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol* 2011; 14(1):39-46.

54. Newman M, Sundelin T, Nielsen J, Erbs G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci* 2013; 4(139):doi:10.3389/fpls.2013.00139.
55. Poraty L, Zimmermann P, Haigis S, Bednarek P, Hazak O, Stelmakh O, et al. The *Arabidopsis* Rho of Plants GTPase AtROP6 Functions in Developmental and Pathogen Response Pathways. *Plant Physiology* 2013; 161(3):1172-1188.
56. Misas J, Kolodziejek I, Crabill E, Kaschani F, Niessen S, Shindo T, et al. *Pseudomonas syringae* Uses Proteasome Inhibitor Syringolin A to Colonize from Wound Infection Sites. *PLoS Pathog* 2013; doi: 10.1371/journal.ppat.1003281.
57. Sloomweg E, Spiridon L, Roosien J, Butterbach P, Pomp R, Westerhof L, et al. Structural Determinants at the Interface of the ARC2 and Leucine-Rich Repeat Domains Control the Activation of the Plant Immune Receptors Rx1 and Gpa2. *Plant Physiology* 2013; 162(3):31510-1528.
58. Bernoux M, Ve T, Williams S, Warren C, Hatters D, Valkov E, et al. Structural and functional analysis of a Plant Resistance Protein TIR, domain reveals interfaces for self- association, signaling, and autoregulation. *Cell Host & Microbe* 2011; 9(3):200-211.
59. Galan J, Lara M, Marlovits T, Wagner S. Bacterial type III Secretion Systems Specialized Nano machines for Protein Delivery into Target Cells. *Annu Rev Microbiol* 2014; 68(1):415-438.
60. Wang G, Jiabing F, Dangl J, Johal G, Balint P. Molecular and functional analyses of a maize autoactive NB-LRR Protein Identify Precise Structural Requirements for Activity. *PLoS Pathog* 2015; doi:10.1371/journal.ppat.1004674.
61. Derksen H, Badawi M. Differential Expression of Potato Defense Genes Associated with the Salicylic Acid Defence Signalling Pathway in Response to Weakly and Highly Aggressive Isolates of *Verticillium dahlia*. *J Phytopathol* 2013; 161(3):142-153.
62. Saucet S, Ma Y, Sarris P, Furzer O, Sohn K, Jones J. (2015). Two linked pairs of *Arabidopsis* TNL resistance Genes independently confer recognition of bacterial effector AvrRps4. *Nat Commun* 2015; 6(6):6338.
63. Li C, Wang X, Chen Z, Zhang Z, Song J. Computational characterization of parallel dimeric and trimeric, Coiled-Coils using effective amino acid indices. *Mol Biosyst* 2015; 11(2):354-360.

64. Surkunt J, Pereira J. Evolutionary patterns in coiled- colis. *Genome Biol E* 2015; 7(2):545-556.
65. Cesari S, Bernoux M, Moncuquet P, Kroj T, Dodds P. A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the “integrated decoy” hypothesis. *Front Plant Sci* 2014; 5(606): doi:10.3389/fpls.201400606.
66. Cesari S, Thillieza G, Ribota C, Chalvona V, Michela C, Jauneau A, et al. The Rice Resistance Protein Pair RGA4/RGA5. Recognizes the *Magnaporthe oryzae* Effectors AVR-Pia and AVR1- CO39 by Direct Binding. *The Plant Cell Preview* 2013; 27(11):1-19.
67. Karp G. *Biología celular y molecular*. 7 ed. Bogotá: Mc Graw Hill; 2014 p. 752-76.0.
68. Ji H, Dong H. Key Steps type III Secretion System (T355) Towards Translocon Assembly with Potential Sensor at Plant Plasma Membrana. *Mol Plant Pathol* 2015; 16(7):762-773.
69. Tampakaki, A. (2014). Commonalities and Differences of T355s in Rhizobia and Plant Pathogenic Bacteria. *Front Plant Sci* 2014; 5(114):doi:10.3389/fpls.2014.00114.
70. Souza D, Oka G, Alvarez C, Bisson A, Dunger G, Hobeika L, et al. (2015). Bacterial Killing via type IV Secretion System. *Nat Commun* 6(6):6453.
71. Ho B, Dong T, Mekalanos J. A view to a kill: the Bacterial type VI Secretion System. *Cell Host Microbe* 2014; 15(1):9-21.
72. Petre B, Kamoun B. How do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells?. *PLoS Biology* 2014; doi:10.1371/journal.pbio.1001801.
73. Üstün S, Börnke F. Interactions of *Xanthomonas* type-III effector proteins with the plant ubiquitin and ubiquitin-like pathways. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00736.
74. Üstün S, Börnke F. The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ proteolytically degrades proteasome subunit RPT6. *Plant Physiol* March 2015; 168(1):107-119.
75. Üstün S, König P, Guttman D, Börnke F. HopZ4 from *Pseudomonas syringae*, a member of the HopZ type III effector family from the YopJ superfamily, inhibits the proteasome in plants. *Mol. Plant Microbe Interact* 2014; 27(7):611-623.

76. Cheong M, Kirik A, Kim J, Frame K, Kirik V, Mudgett M. AvrBsT Acetylates *Arabidopsis* ACIPI, a Protein that Associates with Microtubules and Is Required for Immunity. *PLoS Pathog* 2014; 10(2): e1003952. doi:10.1371/journal.ppat.1003952.
77. Guy E, Lautier M, Chabannes M, Roux B, Lauber E, Arlat M, et al. XopAC-triggered Immunity against *Xanthomonas* Depends on *Arabidopsis* Receptor-Like Cytosolic Kinase Genes PBL2 and RIPK. *PLoS One* 2013; 8(8):e73469.
78. Ve, T. et al. Structures of the *flax-rust* effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(43):17594-17599.
79. Matschi S, Williams T, Catanzariti A, Rafiqi M, Rahman M, Ellis J, et al. The Calcium-Dependent Protein Kinase CPK28 Regulates Development by Inducing Growth Phase-Specific, Spatially Restricted Alterations in Jasmonic Acid Levels Independent of Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2015; 110(43):17594-17599.
80. Chi Y, Yang Y, Zhou Y, Zhou J, Fan B, Yu J, et al. Protein – protein interactions in the regulation of WRKY Transcription Factors. *Molecular Plant* 2013; 6(2):287-300.
81. Duan Y, Jiang Y, Ye S, Karim A, Ling Z, He Y, et al. PtrWRKY 73, a Salicylic acid-inducible poplar WRKY transcription factor is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 2015; 34(5):831-843.
82. Shuta A, Rallapalli G, Piquerez S, Caillaud M, Furzer O, Ishaque N, et al. Expression Profiling during *Arabidopsis*/Downy Mildew Interaction Reveals a Highly-Expressed Effector That Attenuates Responses to Salicylic Acid. *PLoS Pathogens* 2014; doi:10.1371/journal.ppat.1004443.
83. Wasternack C, House, B. Jasmonates Biosynthesis, Perception, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* 2013; 111(6):doi: 1093/aob/mct067.
84. Jiang S, Yao Y, Ma K, Zhou H, Song J, Yang S, et al. Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional Repressors. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003715. doi:10.1371/journal.ppat.1003715.
85. Ju C, Yoon G, Shemansky J, Lin D, Ying Z, Chang J, et al. CTR1 phosphorylates the Central Regulator EIN2 to Central Ethylene Harmonic Signaling from the ER Membrane to the Nucleus in *Arabidopsis*. *PNAS* 2012; 109(47):19486-19491.

86. Gupta D, Shekhar, S, Agrawal L. Plant proteomics: technologic and applications. The Omics of Plant Science. New Delhi: springer; 2015. p. 213-256.
87. Kumar D, Kirti P. Transcriptomic and Proteomic Analyses of Resistant Host Responses in *Arachis diogeni* Challenged with Late Leaf Spot Pathogen, *Phaeoisariopsis personata*. PLoS 2015; doi:10.1371/journal.pone.0117559
88. Lodha T, Hembram P, Jolly N. Proteomics: A Successful Approach to Understand the Molecular Mechanism of Plant-Pathogen Interaction. Am J Sci 2013; 4(1):1212-1226.