



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
RESUMEN TRABAJO DE GRADO



AUTOR(ES):

NOMBRE(S): DIEGO JAVIER APELLIDOS: CUÉLLAR GARCÍA

FACULTAD: DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PROGRAMA ACADÉMICO: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR/CO-DIRECTOR:

NOMBRE(S): ROMINA APELLIDOS: GIACOMETTI

NOMBRE(S): MARÍA DANIELA APELLIDOS: TEJEDOR

TITULO DEL TRABAJO (TESIS): IMPORTANCIA DE LA VÍA DE LAS MAPKS EN LA AMPLIFICACIÓN DE SEÑALES QUE INDUCEN DEFENSAS ANTI-HERBÍVORO COMO RESPUESTA AL DAÑO CAUSADO POR *Anticarsia gemmatalis* Y *Nezara viridula* EN *Glycine max*: OBTENCIÓN DE ANTICUERPO ESPECÍFICO CONTRA MAPKK1

RESUMEN

La vía de las MAPKs, muy estudiada en su participación en las respuestas defensivas vegetales frente a diferentes estímulos, ha sido poco profundizada frente a herbivoría. Siendo la soja (*Glycine max*) el principal cultivo de Suramérica y viendo afectado su rendimiento por plagas, el objetivo de éste trabajo fue determinar la importancia de la vía de las MAPKs en la amplificación de señales en hojas y semillas de soja producidas por el ataque de la oruga *Anticarsia gemmatalis* y la chinche verde *Nezara viridula*. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos a campo en hojas frente al daño por *A. gemmatalis* demostraron la relevancia de las MAPKs en la respuesta a nivel *in situ* y sistémico, con inducción temprana de la transcripción de las MAPK3 y 6 y tardía de la MAPK4. En cuanto a las semillas atacadas por *N. viridula* se observó que el daño generado y la saliva del insecto afectan la bioquímica de la semilla y su capacidad germinativa. Se observó tempranamente la señal de alarma mediada por el incremento en la actividad total de MAPKs. El daño por ambos insectos indujo actividad de las enzimas PAL y LOX vinculadas a la síntesis de las hormonas ácido salicílico (SA) y jasmónico (JA), respectivamente. Finalmente se obtuvo un anticuerpo específico contra MAPKK1 de soja, componente vital en la señalización de las MAPKs. Este estudio muestra que estos dos insectos inducen MAPKs en soja de forma temprana, activando las vías metabólicas de defensa de la planta.

PALABRAS CLAVE: *Glycine max*, MAPKs, *Anticarsia gemmatalis*, *Nezara viridula*, interacción planta-insecto.

CARACTERÍSTICAS

No de páginas: 154 PLANOS: 0 ILUSTRACIONES: 28 CD-ROM: 1

IMPORTANCIA DE LA VÍA DE LAS MAPKS EN LA AMPLIFICACIÓN DE SEÑALES
QUE INDUCEN DEFENSAS ANTI-HERBÍVORO COMO RESPUESTA AL DAÑO
CAUSADO POR *Anticarsia gemmatalis* Y *Nezara viridula* EN *Glycine max*:
OBTENCIÓN DE ANTICUERPO ESPECÍFICO CONTRA MAPKK1

DIEGO JAVIER CUÉLLAR GARCÍA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

IMPORTANCIA DE LA VÍA DE LAS MAPKS EN LA AMPLIFICACIÓN DE SEÑALES
QUE INDUCEN DEFENSAS ANTI-HERBÍVORO COMO RESPUESTA AL DAÑO
CAUSADO POR *Anticarsia gemmatalis* Y *Nezara viridula* EN *Glycine max*:
OBTENCIÓN DE ANTICUERPO ESPECÍFICO CONTRA MAPKK1

DIEGO JAVIER CUÉLLAR GARCÍA

Proyecto de grado para optar por el título de
Ingeniero Biotecnológico

Director

Romina Giacometti

Ph.D. en Biología Molecular y Biotecnología

Co-director

María Daniela Tejedor

Lic. en Nutrición

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016



ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 10 DE FEBRERO DE 2016

HORA: 03:00 P.M.

LUGAR: SALA LE 101 EDIFICIO LABORATORIO EMPRESARIAL

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "IMPORTANCIA DE LA VIA DE LAS MAPKS EN LA AMPLIFICACION DE SEÑALES QUE INDUCEN DEFENSAS ANTI-HERBIVORO COMO RESPUESTA AL DAÑO CAUSADO POR *Anticarsia gemmatalis* Y *Nezara viridula* EN *Glycine max*: OBTENCION DE ANTICUERPO ESPECIFICO CONTRA MAPKK1"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

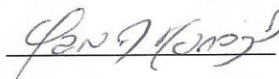
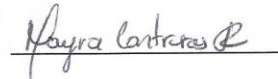

JURADO: YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA
MAYRA CONTRERAS ROJAS
ANTONIO NAVARRO DURAN

DIRECTOR: ROMINA GIACOMETTI INVESTIGADOR - FACULTAD DE AGRONOMÍA UBA- ARGENTINA

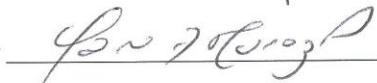
NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
DIEGO JAVIER CUELLAR GARCÍA	1610650	4.5

OBSERVACIONES:
MERITORIO

FIRMA DE LOS JURADOS:

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Elizabeth y Javier, por su incondicional apoyo, desde el momento en que decidí viajar a Argentina, durante todo el año de mi estadía, hasta el momento de culminación del trabajo, sobra decir que nunca en la vida me ha faltado. Siempre se los dije, si en alguien creo es en ustedes y por su esfuerzo llegué hasta aquí. Aunque no lo diga, los amo muchísimo.

A mis hermanas, Mafer y Lucía, por la motivación recibida durante mi estancia en Argentina, por recordarme constantemente que a la distancia se me extrañaba y por hacerme saber el motivo de orgullo que era para ustedes. Tuti y Lucy, las quiero un montón.

A los miembros de mi familia: tías, tíos, primos y abuelos, que de alguna u otra forma estuvieron pendientes de mí, de mi desenvolvimiento, mi bienestar y mis necesidades en el exterior durante el desarrollo del proyecto. Sepan que cada uno es parte de éste logro.

A la Dra. Romina Giacometti, mi directora, por su total disposición a ayudarme, a resolver todas mis dudas (por más simples y repetitivas que fueran), a estar atenta a mi desempeño, a comenzar de nuevo por cada uno de mis errores, a corregirme cuando mis necesidades lo ameritaban y a motivarme a seguir aprendiendo todos los días, pero ante todo por preocuparse por mi bienestar, porque no me sintiera extraño en otro país y por mi estado de salud. Romi, todos lo dicen y lo reafirmo: no pude haber caído en mejores manos, se te quiere.

A la Lic. Daniela Tejedor, mi codirectora, por su apoyo a la hora de resolver mis dudas y de colaborarme en todos los aspectos, dentro o fuera de su alcance, aun cuando se le presentasen problemas. Te admiro mucho Dani.

Al Dr. Jorge Zavala, por haberme aceptado y recibido como practicante y posteriormente como tesista en el laboratorio de la Cátedra de Bioquímica de la FAUBA.

A Nati, Vir, Vane, Pedro y Fran por su valiosa ayuda durante la ejecución de mi proyecto, en sus respectivas especialidades.

A Ivana y Fede por permitirme participar del desarrollo de sus tesis de doctorado, como adiestramiento para el desarrollo de éste trabajo.

A Jose, Mariana y Berenice, por las charlas que amenizaban el trabajo del laboratorio y los mates compartidos. Chicas, no paren de hablar.

A Jesi, Sil, Vero, Ali, Ara, Flor, Eliana, Andrea, Lucía, Vane, Alberto, Yuyo, Andrés, Agus, Eduardo y a todo el equipo de la Cátedra de Bioquímica en general nombrado anteriormente, por las charlas durante el almuerzo, por las reuniones semanales, por los cumpleaños cantados y por todos los momentos en los que me sentí parte de un grupo. Chicos, se les extrañará.

Al equipo del Área de Relaciones Internacionales de la FAUBA, especialmente a Anabella, Mariela, Lautaro y Gonzalo, por el acompañamiento realizado y la integración promovida con otros extranjeros en condiciones similares a las mías.

A mis amigos de la UFPS, especialmente a Erikha, Mary, Luz, Helen, Motta, Freddy, Jonathan y Ashknio, por todas las veces que me escucharon en los buenos y malos momentos que pasé así como por la motivación recibida para seguir adelante con todo el trabajo. Gente, les debo mucho.

A mis compañeros de hostel, especialmente a Heidi, Izta, Andrea, Liz, Isabel, Lili, Cristian, Juan Pablo, Lalo y Martín, porque de alguna forma u otra contribuyeron a hacer más

llevadero el tiempo y porque sé que a casi todos alguna vez les dije “¿me puede/puedes/podés prestar el computador?”, salvándome en mis múltiples problemas. Hacen falta muchachos.

A mis amigos de la UFPS y compañeros de hostel, Yeily e Ismael, por escuchar todo lo sucedido en mi día al final de cada jornada en el laboratorio y por compartir conmigo su experiencia de práctica. Amiwitos, los quiero mucho.

Por último, a mis amigos Lionel y Matías, por enseñarme lo necesario para desenvolverme en Buenos Aires y por las valiosas ayudas que recibí de su parte en momentos en que me sentía más perdido que nunca y sin las cuáles no habría podido salir de esos estancamientos. Los aprecio un montón.

RESUMEN

La vía de las MAPKs, muy estudiada en su participación en las respuestas defensivas vegetales frente a diferentes estímulos, ha sido poco profundizada frente a herbivoría. Siendo la soja (*Glycine max*) el principal cultivo de Suramérica y viendo afectado su rendimiento por plagas, el objetivo de éste trabajo fue determinar la importancia de la vía de las MAPKs en la amplificación de señales en hojas y semillas de soja producidas por el ataque de la oruga *Anticarsia gemmatalis* y la chinche verde *Nezara viridula*. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos a campo en hojas frente al daño por *A. gemmatalis* demostraron la relevancia de las MAPKs en la respuesta a nivel *in situ* y sistémico, con inducción temprana de la transcripción de las MAPK3 y 6 y tardía de la MAPK4. En cuanto a las semillas atacadas por *N. viridula* se observó que el daño generado y la saliva del insecto afectan la bioquímica de la semilla y su capacidad germinativa. Se observó tempranamente la señal de alarma mediada por el incremento en la actividad total de MAPKs. El daño por ambos insectos indujo actividad de las enzimas PAL y LOX vinculadas a la síntesis de las hormonas ácido salicílico (SA) y jasmónico (JA), respectivamente. Finalmente se obtuvo un anticuerpo específico contra MAPKK1 de soja, componente vital en la señalización de las MAPKs. Este estudio muestra que estos dos insectos inducen MAPKs en soja de forma temprana, activando las vías metabólicas de defensa de la planta.

Palabras clave: *Glycine max*, MAPKs, *Anticarsia gemmatalis*, *Nezara viridula*, interacción planta-insecto

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cebadores utilizados	77

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ordenamiento de las cascadas de MAP quinasas.....	49
Figura 2. Interconexión entre diferentes rutas de MAPKs	52
Figura 3. Síntesis del Ácido Jasmónico en plantas	54
Figura 4. Síntesis del Ácido Salicílico en plantas.....	56
Figura 5. Estructuras de la planta de soja	57
Figura 6. Orugas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	58
Figura 7. Adulto de <i>Nezara viridula</i>	58
Figura 8. Mapa de la Facultad de Agronomía.....	63
Figura 9. Análisis comparativo de las secuencias de MAPKs de soja utilizadas en este trabajo mediante el programa Clustal Omega	97
Figura 10. Filograma derivado de alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas completas de las MAPKs de <i>Glycine max</i> y sus homólogos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
Figura 11. Microscopia de Barrido electrónico del aparato bucal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ...	100
Figura 12. Tinción con plata de un gel desnaturalizante SDS-PAGE (12%) de la secreción oral de <i>A. gemmatalis</i> bajo alimentación diferencial	101
Figura 13. Amplificación y análisis de transcritos para MAPKs frente al ataque de <i>A.</i> <i>gemma</i> <i>talis</i>	103
Figura 14. Actividad de MAPKs frente a <i>A. gemmatalis</i>	105
Figura 15. Actividad de LOX frente a <i>A. gemmatalis</i>	107
Figura 16. Actividad de PAL frente a <i>A. gemmatalis</i>	110

Figura 17. Tinción con fucsina ácida del daño producido en vainas y semillas	112
Figura 18. Daño en semillas frescas observado por microscopio electrónico de barrido	114
Figura 19. Detalle de la estructura del aparato bucal de <i>Nezara viridula</i> observadas por microscopio electrónico de barrido.....	116
Figura 20. Tinción con plata de un gel desnaturalizante SDS-PAGE (12%) de la secreción oral de <i>N. viridula</i> bajo alimentación diferencial	118
Figura 21. Apariencia semillas de soja maduras.....	119
Figura 22. Análisis del poder germinativo de semillas control y picadas	120
Figura 23. Zimogramas de extractos proteicos de muestras de semillas control (C) y picadas (P).....	122
Figura 24. Actividad total de MAPK como respuesta temprana a la inducción por <i>N. viridula</i>	123
Figura 25. Actividad de LOX frente al daño provocado por <i>N. viridula</i>	124
Figura 26. Actividad de PAL frente al daño provocado por <i>N. viridula</i>	126
Figura 27. Esquema del vector reconstruido para la expresión de MAPKK1 en <i>E. coli</i>	128
Figura 28. Western Blot usando el anticuerpo anti-MAPKK1 sobre extractos de semillas como prueba de reactividad del anticuerpo primario obtenido.....	130

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. PROBLEMA	24
1.1. TITULO	24
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	25
1.4. JUSTIFICACIÓN	26
1.5. OBJETIVOS	27
1.5.1. Objetivo general.	27
1.5.2. Objetivos específicos.	27
1.6. ALCANCES Y LIMITACIONES	28
1.6.1. Alcances.....	28
1.6.2. Limitaciones.	28
1.7. DELIMITACIONES.....	29
1.7.1. Espacial.....	29
1.7.2. Temporal.....	29
1.7.3. Conceptual.....	29
2. MARCO REFERENCIAL	31
2.1. ANTECEDENTES	31
2.1.1. Expresión y activación de MAPKs por herbivoría.....	31
2.1.2. Secreciones orales.....	34

2.1.3.	Expresión y activación de MAPKs por patogenia.....	35
2.1.4.	Expresión y activación de MAPKs por factores abióticos.	36
2.1.5.	Generalidades de MAPKs.	38
2.1.6.	Producción de metabolitos secundarios en plantas.	39
2.1.7.	Regulación de funciones en plantas por parte de MAPKs.	40
2.2.	MARCO TEÓRICO	44
2.2.1.	Defensas en plantas.	44
2.2.2.	Distinción entre mordidas y heridas.	44
2.2.3.	Secreciones orales.....	45
2.2.4.	Respuestas locales y sistémicas.....	46
2.2.4.1.	Ca ²⁺ como mensajero.....	46
2.2.4.2.	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	47
2.2.4.3.	Cascada de MAPKs.	48
2.2.4.4.	Vías del AJ y AS.....	52
2.2.4.4.1.	Ácido Jasmónico (AJ).....	53
2.2.4.4.2.	Ácido Salicílico (AS).	55
2.2.4.4.3.	Relación entre MAPKs y las vías de AJ y AS.	56
2.2.5.	<i>Glycine max.</i>	57
2.2.6.	<i>Anticarsia gemmatalis.</i>	57
2.2.7.	<i>Nezara viridula.</i>	58
2.3.	MARCO CONCEPTUAL	59
2.4.	MARCO CONTEXTUAL.....	62
2.5.	MARCO LEGAL.....	64

3. METODOLOGÍA	66
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	66
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	66
3.2.1. Población.	66
3.2.2. Muestra.	67
3.3. HIPÓTESIS	68
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	68
3.4.1. Material vegetal.	68
3.4.2. Orugas.....	70
3.4.3. Chinchas.	71
3.5. FASES DE LA INVESTIGACIÓN.....	71
3.5.1. Fase 1: Análisis <i>in silico</i> de proteínas.	71
3.5.1.1. Identificación de secuencias y alineamientos múltiples.	71
3.5.1.2. Análisis filogenético.	72
3.5.2. Fase 2: Muestras.	72
3.5.2.1. Plantas de soja.....	72
3.5.2.2. Orugas.....	74
3.5.2.3. Chinchas.	74
3.5.3. Fase 3: Procesamiento de muestras vegetales.	75
3.5.4. Fase 4: Obtención y análisis de transcritos de MAPKs.....	75
3.5.4.1. Extracción de ARN.....	75
3.5.4.2. Síntesis de ADNc.....	76
3.5.4.3. Ensayos de RT-PCR semicuantitativa.	77

3.5.4.4.	Electroforesis de ADN.....	78
3.5.5.	Fase 5: Actividad de MAPKs.	79
3.5.5.1.	Extracción proteica.	79
3.5.5.2.	Reacción de fosforilación del sustrato MBP.	79
3.5.5.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).	80
3.5.5.4.	Western Blot para detección de fosforilación del sustrato MBP... ..	80
3.5.6.	Fase 6: Actividades enzimáticas relacionadas.....	81
3.5.6.1.	Actividad Lipoxigenasa.	81
3.5.6.2.	Actividad Fenilalanina Amonio Liasa.	82
3.5.7.	Fase 7: Análisis estadístico.....	82
3.5.8.	Fase 8: Análisis de secreciones orales de <i>Anticarsia gemmatalis</i> y <i>Nezara viridula</i>	83
3.5.8.1.	Extracción.....	83
3.5.8.1.1.	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	83
3.5.8.1.2.	<i>Nezara viridula</i>	83
3.5.8.2.	Caracterización proteica.	84
3.5.9.	Fase 9: Análisis de daño en semillas.	84
3.5.9.1.	Poder germinativo.....	84
3.5.9.2.	Tinción del daño producido por la chinche en vainas y semillas. .	85
3.5.9.3.	Zimogramas.	85
3.5.9.3.1.	Extracción proteica.	85
3.5.9.3.2.	Actividad Peroxidasa.	86
3.5.9.3.3.	Actividad Proteasa.	86

3.5.10.	Fase 10: Microscopia.....	87
3.5.10.1.	Microscopia de campo claro.....	87
3.5.10.2.	Preparación de muestras para observación por Microscopía Electrónica de Barrido (MBE).....	87
3.5.10.3.	Manejo de imágenes.	88
3.5.11.	Fase 11: Clonado y expresión heteróloga de MAPKK1 (MEK1) para obtención de un anticuerpo específico.	88
3.5.11.1.	Amplificación de MAPKK1.....	88
3.5.11.2.	Preparación de bacterias competentes.	89
3.5.11.3.	Clonado.....	89
3.5.11.4.	Secuenciación de ADN.....	90
3.5.11.5.	Extracción de ADN plasmídico.....	91
3.5.11.6.	Subclonado.	91
3.5.11.7.	Inducción de la expresión recombinante.	92
3.5.11.8.	Extracción de MAPKK1-His (MEK1) recombinante.....	93
3.5.11.9.	Purificación.....	94
3.5.11.10.	Preparación de antisuero específico contra MAPKK1 para inmunización de ratones Balb c.	94
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	96
4.1.	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE MAPKS DE SOJA.....	96
4.2.	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	99
4.2.1.	Secreción oral.	99

4.2.2.	Análisis de transcritos de MAPKs.....	102
4.2.3.	Actividad de MAPKs.	104
4.2.4.	Actividades enzimáticas relacionadas a los compuestos de defensa.....	105
4.2.4.1.	Actividad LOX.	106
4.2.4.2.	Actividad PAL.	107
4.3.	<i>Nezara viridula</i>	111
4.3.1.	Observación del daño en vainas y semillas.	111
4.3.2.	Secreción oral.	114
4.3.3.	Consecuencias de la picadura en la germinación de las semillas.	118
4.3.3.1.	Poder germinativo.....	119
4.3.3.2.	Actividades enzimáticas.	120
4.3.4.	Actividad de MAPKs.	122
4.3.5.	Actividades enzimáticas relacionadas a los compuestos de defensa.....	124
4.3.5.1.	Actividad LOX.	124
4.3.5.2.	Actividad PAL.	125
4.4.	ANTICUERPO ESPECÍFICO ANTI-MAPKK1	126
4.4.1.	Clonado del gen <i>MAPKK1</i> de soja.	126
4.4.2.	Expresión heteróloga y purificación.....	127
4.4.3.	Preparación, reactividad y especificidad del antisuero contra la proteína MAPKK1.....	128
5.	CONCLUSIONES	131
6.	RECOMENDACIONES	134
	REFERENCIAS.....	135