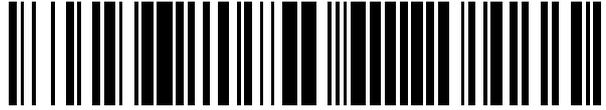


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 627**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10723113 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2438172**

54 Título: **Construcciones que expresan receptores quiméricos y su uso para la activación controlada de la respuesta defensiva frente a patógenos en plantas**

30 Prioridad:

04.06.2009 IT RM20090279

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.09.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" (100.0%)
Piazzale Aldo Moro, 5
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**CERVONE, FELICE;
DE LORENZO, GIULIA;
BRUTUS, ALEXANDRE y
SICILIA, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 627 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Construcciones que expresan receptores quiméricos y su uso para la activación controlada de la respuesta defensiva frente a patógenos en plantas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la construcción y el uso, en las plantas, de genes quiméricos que permiten controlar la activación de respuestas de defensa frente a organismos patógenos. La invención encuentra aplicación en el campo agroindustrial.

Antecedentes

- 10 La inmunidad innata, un sistema de defensa que es común en los vertebrados y los invertebrados, se basa en el reconocimiento de moléculas de origen microbiano, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) y moléculas de origen endógeno, llamadas HAMP (patrones moleculares asociados a huésped) o DAMP (patrones moleculares asociados a daño), que indican la presencia de potenciales patógenos.

- 15 En las plantas, un ejemplo de DAMP está representado por los oligogalacturonidos (OG), moléculas derivadas de la degradación del componente péptico de la pared, debido a poligalacturonasas liberadas por microorganismos patógenos durante la invasión.

- Los OG funcionan como señales de peligro e inducen la expresión de genes de defensa y proteínas (Ridley 2001, Denoux 2008, Casasoli 2008, Galletti 2008, Casasoli 2009), protegiendo las plantas contra enfermedades fúngicas (Ferrari 2007). Además de inducir respuestas de defensa, los OG también afectan a varios aspectos del crecimiento y del desarrollo de las plantas (Ridley, 2001, Bellincampi 1996). Tanto a nivel estructural como a nivel funcional, los OG son una reminiscencia de los fragmentos de ácido hialurónico de la matriz extracelular de los animales, una clase bien conocida de DAMP implicadas en la respuesta y la cicatrización de las heridas (Jiang, 2007). Al igual que las de los fragmentos de ácido hialurónico, la actividad biológica de los OG está relacionada con su tamaño molecular, ya que los fragmentos con un grado de polimerización (DP) comprendidos entre 10 y 15 son los más activos (13, 14). En particular, la conformación "caja de huevos" es necesaria para la actividad biológica de OG (Ridley, 2001, Cabrera 2008).

- Los PAMP más estudiados son la flagelina bacteriana y el factor de elongación Tu (EF-Tu) que, en Arabidopsis, son percibidos por dos receptores quinasa LRR (LRR-RLK, receptor tipo quinasa de repetición rica en leucina), llamados FLS2 y EFR, respectivamente. Estas proteínas son análogas a los receptores TLR humanos (receptores tipo Toll) y consisten en un dominio LRR extracelular, una región transmembrana de cadena única y un dominio quinasa intracelular del tipo de serina/treonina. El reconocimiento del ligando en los dos sistemas, flagelina/FLS2 y EF-Tu/EFR, determina la activación de las respuestas de defensa complejas, ampliamente compartidas, como la expresión de genes implicados en las respuestas de defensa, la acumulación de etileno, callosa, peróxido de hidrógeno y, finalmente, la inducción de la respuesta de hipersensibilidad. También se sabe que el receptor de EFR, después del reconocimiento de su ligando, activa estas respuestas de defensa no sólo en Arabidopsis, sino también en otras especies de plantas (Lacombe, 2010).

- Hay muchos fitopatógenos de origen diferente, tales como virus, bacterias y hongos que pueden reducir significativamente la productividad de los cultivos, causando lesiones en los tejidos de la planta, reduciendo el desarrollo de las hojas, las raíces o las semillas. En ausencia de síntomas obvios, los patógenos pueden causar un trastorno metabólico general que reduce la productividad de las propias plantas. Los agentes patógenos pueden causar daños antes o después de la cosecha. Las estrategias para el control químico de las enfermedades tienen desventajas obvias, debido a los altos costes y a la eventual toxicidad para los organismos no diana.

- La pared de la célula es la matriz extracelular que separa la célula de la planta del ambiente externo y que juega un papel fundamental en el filtrado y la interpretación de las señales externas, tales como el ataque de patógenos, heridas o el estrés mecánico (Kohorn 2000; Brownlee 2002). La pectina, un componente de la pared celular que se modifica y remodela continuamente durante el crecimiento y el desarrollo de la planta, es un polímero complejo que determina la porosidad, la hidratación y la plasticidad de la pared, así como la adhesión célula-célula. Por otra parte, la pectina es fundamental para procesos fisiológicos tales como el crecimiento del polen (Stenzel et al., 2008) y la compatibilidad (Lord 2003), el alargamiento de la raíz y del tallo, la germinación y la maduración del fruto (Micheli 2001; Pilling et al., 2004) así como a la respuesta frente a patógenos, no sólo como una barrera mecánica sino también como un sensor para infecciones entrantes (Vorwerk et al., 2004); La característica de la pectina que determina el mantenimiento de la integridad de la pared y la cohesión de las células es debida a la naturaleza polianiónica de su estructura, es decir al homogalacturonano, que es capaz de unirse al calcio para formar las estructuras llamadas "cajas de huevos". Estas estructuras de vez en cuando se pueden hidrolizar y ser fragmentadas por enzimas de origen microbiano o vegetal, para liberar el OG que realiza acciones regulativas y de activación de las respuestas de defensa (Cervone et al., 1989). El tratamiento de tejidos de planta con OG provoca la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la biosíntesis de fitoalexinas y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Ridley et al., 2001). En Arabidopsis, el OG induce la expresión de genes y

proteínas de defensa (Denoux et al., 2008; Casasoli et al., 2008) y protege a la planta frente a enfermedades fúngicas (Ferrari et al., 2007). En analogía con el papel de los fragmentos de ácido hialurónico en la inmunidad innata animal, los OG pueden ser considerados como patrones moleculares asociados a huésped (HAMP); (Taylor & Gallo 2006; Stern et al., 2006). Además de inducir respuestas de defensa, los OG también afectan a varios aspectos del crecimiento y del desarrollo de las plantas (Bellincampi et al., 1996; Mauro et al., 2002).

Puesto que la respuesta de Arabidopsis frente a OG coincide en gran medida con la de los PAMP flg22 (péptido derivado de la flagelina bacteriana) (Denoux et al., 2008) y ELFT 8 (péptido derivado de EF-Tu) (Zipfel et al., 2006), se ha hipotizado que el receptor de OG es similar a los receptores de flagelina Sensing 2 (FLS2) y el receptor Tu del factor de alargamiento (EFR). Estos son miembros de la familia de la quinasa receptora (RK) de la repetición rica en leucina (LRR) (Zipfel 2008; Sanabria et al., 2008) y la observación de que una proteína LRR extracelular, es decir, que la proteína inhibidora de poligalacturonasa PGIP interactúa con OG, apoya esta hipótesis (Spadoni et al., 2006). Por otra parte, los receptores candidatos de OG son también algunos miembros de la familia quinasa asociada a Wall (WAK).

Las proteínas WAK son quinasa-proteínas pertenecientes a la familia RLK (receptor tipo quinasa), que muestra un dominio de quinasa intracelular del tipo Ser/Thr y un dominio extracelular que contiene múltiples repeticiones, similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (He et al., 1996). En Arabidopsis, hay cinco genes que están muy juntos y que están altamente correlacionados (WAK1-WAK5); se expresan en hojas y meristemas sometidos a expansión, y son inducidos por patógenos, heridas y estrés mecánico (He et al. 1996; Verica et al., 2003). La familia WAK se correlaciona con otra familia llamada tipo WAK que incluye a 22 miembros (Verica & He 2002). WAK1 (At1g21250), el mejor gen caracterizado, es altamente expresado en órganos verdes y es inducido por ácido salicílico y codifica una proteína madura de 711 aminoácidos (He et al., 1998). WAK1 se une in vitro al homogalacturonano esterificado no de metilo, al OG con un grado de polimerización entre 9 y 14 activo como inductor y compatible con la formación de estructuras "caja de huevo" inducidas por calcio (Decreux & Messiaen 2005, Cabrera et al., 2008). La expresión antisentido e inducible de WAK2 o WAK4 causa una reducción de los niveles de proteína WAK y un fenotipo enano (Wagner & Kohorn 2001, Lally et al., 2001). El mutante wak2 sin modificar mostró una dependencia de azúcar (y sal) para el crecimiento de brotes, lo que sugiere que las proteínas WAK están involucradas en la regulación del metabolismo del azúcar (Kohorn et al., 2006b). Sin embargo, el papel preciso de los receptores individuales WAK sigue siendo en gran parte desconocido (Decreux & Messiaen 2005).

En Arabidopsis, sólo un número mínimo de los más de 600 RLK se han caracterizado (Shiu et al., 2004; Afzal et al., 2008) y la posible aparición dentro de esta superfamilia de los múltiples miembros con función similar y redundante hace muy difícil una aproximación genética inversa (gen modificado genéticamente) para la identificación de los receptores que perciben una señal pleiotrópica tipo OG.

La construcción de receptores quiméricos, constituidos por los dominios de proteínas diferentes, es un enfoque alternativo para la caracterización bioquímica y funcional de los RLK. Las permutas de dominio han sido ampliamente utilizadas para estudiar los receptores de animales (Tauszig et al., 2000; Tsujita et al., 2004; Weber et al., 2005), mientras que en Arabidopsis se ha publicado solo un ejemplo en el que el ectodominio de LRR del receptor quinasa BRI1 se fusiona con el dominio quinasa de serina/treonina del producto génico del arroz Xa21 y es capaz de iniciar respuestas de defensa de la planta en las células de arroz después del tratamiento con brasinoesteroides (He et al., 2000). El uso de un diseño similar, la parte ectodominio-TM-UM del gen Xa3/Xa26 de resistencia del arroz se fusionó a los dominios de quinasa de tanto MRKa como MRKc, que pertenecen a la misma familia de genes que Xa3/Xa26 y se expresa en arroz. Se mostró que las plantas transgénicas eran parcialmente resistentes a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Cao et al., 2007b).

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un constructo de gen quimérico que aprovecha las peculiaridades de dos receptores, FLS2 y EFR, así como de los receptores de WAK. El propósito aplicativo de la presente invención es el desarrollo y el uso de plantas con una defensa mejor y controlada frente a patógenos. En un aspecto particular, la construcción quimérica se basa en la fusión del dominio extracelular FLS2 con la transmembrana (TM) y el dominio intracelular de EFR, dominio de activación potente de las respuestas de defensa, o WAK. Los autores expresaron transitoriamente y de manera estable el gen quimérico FLS2-EFR bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S en plantas de Arabidopsis y en una Solanácea, *Nicotiana tabacum*. Las plantas transformadas, tras el tratamiento con flg22, internalizan el receptor y activan los genes marcadores de la respuesta de resistencia mediada por EFR, tales como la acumulación de etileno, peróxido de hidrógeno y la activación de genes marcadores de las respuestas mediadas por EFR. Por lo tanto, es posible utilizar la porción del receptor EFR que incluye dominios TM y quinasa en combinación con la porción extracelular de FLS2 y/o de otros receptores de plantas que responden a moléculas de señalización distintas a las que EFR responde. Las construcciones de la invención son del tipo EDR1-TMR2-IDR2, donde R1 y R2 son dos quinasas receptoras, TM es el dominio transmembrana, y ED e ID son, respectivamente, el dominio extracelular e intracelular. El uso de tales construcciones permite tener una respuesta de defensa que sea controlada, dirigida y reforzada, con el objetivo de aumentar la resistencia a diversos organismos fitopatógenos.

Así, los autores de la presente invención han demostrado que es posible diseñar y usar receptores quiméricos funcionales de plantas con el fin de identificar la función de un receptor específico por un enfoque quimérico. Al definir el diseño más apropiado de las quimeras, los autores han demostrado que EFR es susceptible a la construcción de receptores quiméricos funcionales capaces de activar la defensa contra los patógenos. Finalmente, los autores obtuvieron quimeras basadas en EFR, usando el dominio extracelular de WAK1 como un receptor candidato de OG, demostrando que WAK1 es capaz de detectar OG in vivo y desencadenar una respuesta de defensa.

La invención también se refiere a plantas transformadas con las construcciones quiméricas de la invención. Los constructos expresan moléculas capaces de reconocer un ligando de cualquier tipo y activar específicamente y de manera controlada las respuestas de defensa de las plantas. Esta tecnología es aplicable a todas las plantas de interés agronómico. El uso de plantas con una regulación controlada de las respuestas de defensa reduce considerablemente el uso de pesticidas.

Es un objeto de la presente invención un constructo capaz de expresar, en al menos un tejido de planta, un receptor quimérico, dicho receptor quimérico se compone esencialmente de:

a) la porción extracelular, que comprende la parte yuxtamembrana externa, de un primer receptor quinasa R1;

b) la porción de transmembrana y la porción intracelular, que comprende la parte yuxtamembrana interna de un segundo receptor quinasa R2, en donde R1 y R2 son diferentes y en donde el primer receptor de quinasa R1 se selecciona del grupo receptor FLS2 capaz de reconocer la flagelina bacteriana, receptor EFR capaz de reconocer el factor de elongación de la transcripción bacteriana o un receptor que pertenece a la familia de quinasas WAK y/o el segundo receptor quinasa R2 se selecciona a partir del grupo receptor EFR, receptor que pertenece a la familia de las quinasas WAK.

Más preferiblemente, los receptores derivados de *Arabidopsis thaliana*.

En la presente invención, para el % de identidad (o % de similitud) se pretende la cuantificación del % de elementos iguales (o similares) en una secuencia de una biomolécula (Larkin et al., 2007).

En una realización preferida, la porción extracelular del receptor FLS2, o una parte del mismo, tiene esencialmente una secuencia comprendida entre los aa 1 y aa 806 de la secuencia presente en la base de datos NCBI con el No. NP_199445.1 o tiene una secuencia de aminoácidos con un % de identidad de no menos de 70% de dicha secuencia FLS2.

En una realización más preferida, la porción extracelular del receptor EFR o una parte del mismo tiene esencialmente una secuencia comprendida entre aa 1 y aa 649 de la secuencia presente en la base de datos NCBI con el No. NP_197548.1 o tiene una secuencia de aminoácidos con un % identidad de no menos de 70% de dicha secuencia de EFR.

En una realización más preferida, la porción extracelular del receptor WAK1 o una parte del mismo tiene esencialmente una secuencia comprendida entre aa 1 y aa 333 de la secuencia presente en la base de datos NCBI con el No. NP_564137.1 o tiene una secuencia de aminoácidos con un % de identidad de no menos de 70% de dicha secuencia WAK1.

En una realización preferida, el primer receptor de quinasa R1 es un receptor capaz de reconocer un ligando derivado de fitopatógenos, liberado o producido durante la infección, tal como se define por Boller T. & Felix G., 2009.

En una realización preferida, la porción intracelular del receptor de EFR tiene esencialmente la secuencia del aa 650 al aa 1031 de la secuencia presente en la base de datos del NCBI con el No. NP_197548.1, o tiene una secuencia de aminoácidos con un % de identidad no menor que el 70% que dicha secuencia de EFR.

En una realización preferida, la porción intracelular es la del receptor WAK1, y tiene esencialmente la secuencia de 334 aa a 735 aa de la secuencia presente en la base de datos del NCBI con el No. NP_564137.1 o tiene una secuencia de aminoácidos con un % de identidad no menor que el 70% de dicha secuencia WAK1.

En una realización preferida adicional, la porción de transmembrana y la porción intracelular (incluyendo también la porción yuxtamembrana interna) de EFR se fusiona con la porción extracelular del receptor de FLS2 o WAK1, o de un receptor que reconoce un ligando derivado de fitopatógenos, o que se libera o es producido durante la infección.

En una realización preferida, la porción de transmembrana y la porción intracelular (incluyendo también la porción yuxtamembrana interna) de WAK1 se fusiona con la porción extracelular del receptor de EFR, o de un receptor que reconoce un ligando derivado de fitopatógenos, liberado o producido durante la infección.

Un objeto de la invención es el uso de la construcción que se describe anteriormente para la transformación de plantas o tejidos de plantas o células de plantas, ya sea de forma transitoria o estable.

Un objeto de la invención son plantas transformadas con las construcciones quiméricas de la invención o partes de la planta transformada.

Preferiblemente, las plantas transformadas son resistentes a hongos y/o bacterias patógenas tales como *B. cinerea*, *P. syringae* y/o *P. carotovorum*.

- 5 La presente invención se describirá ahora en ejemplos no exhaustivos experimentales, con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Las construcciones para la expresión de los receptores quiméricos FLS2/EFR.

10 A) Las regiones de codificación de EFR y FLS2 se marcan en blanco y gris, respectivamente, indicándose la región correspondiente al péptido señal en negro. eJMC y UM, porción yuxtamembrana externa e interna, respectivamente; TM, región transmembrana. Todos los genes se fusionaron con la secuencia que codifica GFP y se colocaron bajo el control del promotor CaMV 35S. NOS: terminador nos. Se indican los puntos de unión en los dos receptores quiméricos. Las secuencias YXX ϕ y PEST se indican respectivamente por (◆) y (★).

15 B) Secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana de EFR (NP_197548), FLS2 (NP_199445) y BAK1 (Q94F62). Las regiones que coinciden con una secuencia consenso de dimerización GXXXG identificadas en el receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (ErbB1: P00533) (Mendrola et al., 2002) se identifican en gris.

Figura 2: Localización de FLS2, EFR, eJMC y TMC expresados transitoriamente en *Arabidopsis thaliana* Col-0.

20 A) Análisis de transferencia Western utilizando extractos de proteínas totales de hojas *A. thaliana* Col-0 agroinfiltradas que expresan las proteínas de fusión fluorescentes indicadas utilizando anticuerpos GFP específicos (panel derecho). Se muestra la tinción de Coomassie (panel izquierdo). Se utilizó *Agrobacterium* que lleva pBI-GUS como control positivo para la infección y un control negativo para el análisis de transferencia Western.

B) Nivel de fluorescencia relativa de GFP en hojas de *Arabidopsis* agroinfiltradas que expresan las proteínas de fusión indicadas. Los resultados son medias \pm error estándar (n = 3).

25 C) Análisis de la expresión del receptor manifestada por microscopía de fluorescencia confocal de hojas de *Arabidopsis* agroinfiltradas. Las figuras muestran secciones transversales individuales de las células epidérmicas de la hoja que muestran la localización de FLS2, EFR, eJMC o TMC fluorescente en correspondencia con la membrana plasmática. Para todas las muestras, las barras corresponden a 10 μ m.

30 D) Análisis de transferencia en mancha usando anticuerpos específicos de GFP de proteínas de fracciones microsomales o fluidos de lavado intercelular (IWF) obtenidos de hojas de *Arabidopsis* agroinfiltradas que expresan las proteínas de fusión indicadas. Las hojas agroinfiltradas que expresan una proteína de fusión PVPGIP2-GFP se utilizaron como control para la expresión de una proteína apoplástica (De Lorenzo & Ferrari 2002).

Figura 3: Caracterización de receptores quiméricos transitoriamente expresados

35 A) Variación relativa de fluorescencia en hojas de *Arabidopsis* agroinfiltradas que expresan los receptores indicados. Los sectores infiltrados se extirparon, se lavaron y se trataron durante 30 min con flg22 10 μ M o elf18 ó 100 μ g/ml de OG. Cada valor se normalizó frente a la fluorescencia medida después de 10 minutos de estimulación. Las barras de error indican el error estándar de tres repeticiones independientes.

B) Micrografías de fluorescencia de secciones transversales fusionadas (375 μ m x 375 μ m x 20 μ m) durante un tratamiento con flg22 10 μ M durante 30 min de los sectores de la hoja de *Arabidopsis* agroinfiltrada que expresa eJMC. Las flechas indican las zonas del tejido que muestran la señal de fluorescencia decreciente.

40 C) Variación relativa de fluorescencia en hojas de *Arabidopsis* agroinfiltradas que expresan eJMC y eJMC^{Y859A}, tratadas durante 30 minutos con flg22 10 μ M. Cada valor se normalizó frente a la fluorescencia medida después de 10 minutos de estimulación.

D) Variación relativa de fluorescencia en hojas agroinfiltradas del mutante *Arabidopsis bak1-4* que expresan los receptores indicados y tratados durante 30 minutos con flg22 10 μ M. Cada valor se normalizó frente a la fluorescencia medida después de 10 minutos de estimulación.

45 E) Variación relativa de la fluorescencia en hojas de tabaco agroinfiltradas que expresan EFR, FLS2, eJMC y TMC y tratadas con elf18 10 μ M o flg22 10 μ M durante 30 min.

50 F) Inducción de la biosíntesis de etileno en las hojas tabaco agroinfiltrado que expresan EFR, FLS2, TMC, eJMC y eJMC^{Y859A} fluorescentes. Los sectores de hojas infiltradas escindidos se estimularon durante 2 h con el inductor (10 μ M) como se indica en la figura. NC: control negativo, representado por los tejidos foliares agroinfiltrados que expresan EFR o FLS2 fluorescentes y estimulados con flg22 o elf18, respectivamente. Los resultados son medias \pm error estándar (n = 3).

Figura 3-1: Inducción de la biosíntesis de etileno en hojas de tabaco no agroinfiltradas (SR1) y en hojas infiltradas con *Agrobacterium* que llevan el vector vacío (simulacro).

Los sectores de hojas infiltradas escindidos se estimularon durante 2 h con agua o el inductor (10 μ M para flg22, 1 μ M para elf18 y 100 μ g/ml para OG). Los valores son medias \pm E.E.M. (N = 3).

5 **Figura 4: La expresión de eJMC restaura el sistema de detección de flg22 en WS-0 transformado de manera estable.**

A) Análisis histoquímico de las respuestas de defensa a 1 h de tratamiento con H₂O, flg22 (1 μ M) o elf18 (10 μ M). El panel superior muestra la acumulación de H₂O₂ revelada por tinción de DAB. El panel inferior muestra la deposición de callosa revelada por la tinción con azul de anilina.

10 B) Acumulación inducida por el inductor de las transcripciones Ret-Ox, CYP81F2 y PAD3 analizados mediante PCR semicuantitativa, utilizando el gen UBQ5 para la normalización. Las hojas se incubaron con agua, flg22 (1 μ M), elf18 (10 μ M) o un péptido genérico (10 μ M) durante 30 minutos. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares. El mismo experimento se realizó en una segunda línea transgénica independiente que expresaba eJMC con resultados similares.

15 C) Infecciones DC3000 de *Pseudomonas*. (Panel izquierdo) Síntomas de la enfermedad de plantas tipo salvaje y transformadas después de 4 días después de la infección. (Panel derecho) Crecimiento de DC3000 de *Pseudomonas syringae* después de 4 días después de la infección. ***, p < 0,005.

Figura 5: Construcciones para la expresión de receptores quiméricos de WAK1/EFR.

20 A) Las regiones codificantes de EFR y WAK1 se marcan en blanco y gris oscuro, respectivamente, con la región correspondiente a los péptidos señal indicados en negro. Todos los genes se fusionaron con la secuencia que codifica GFP y se colocaron bajo el control del promotor CaMV 35S. NOS: terminador nos. Los aminoácidos anotados indican los puntos de unión de los dos receptores quiméricos. La secuencia YXX Φ se indica por (◆).

B) Nivel de fluorescencia relativa en hojas Col-0 de *Arabidopsis* agroinfiltrada que expresan las fusiones de proteínas fluorescentes indicadas (en 2 dpi). Los resultados son medias \pm error estándar (n = 3).

25 C) Análisis de la expresión del receptor manifestada por microscopía de fluorescencia confocal de hojas de *Arabidopsis* agroinfiltradas. Las micrografías muestran secciones transversales individuales de células epidérmicas de las hojas y la localización de WAK1, WEG o EWAK fluorescente en correspondencia con la membrana plasmática. Para todas las muestras, las barras corresponden a 10 μ m.

30 D) Análisis de transferencia de Western usando anticuerpos específicos a GFP (panel superior) de las proteínas de las fracciones microsomaes o IWF obtenidas a partir de hojas de *Arabidopsis* agroinfiltrada que expresan las fusiones de proteínas indicadas y la tinción de Coomassie mostrada para igualdad de carga (panel inferior). eJMC se utilizó como control positivo, mientras que se utilizó una versión no fluorescente de la WEG quimera (WE) como control negativo.

Figura 6: Caracterización transitoria de receptores quiméricos de WAK1/EFR

35 A) Variación relativa de la fluorescencia de los explantes que expresan WEG tratados con H₂O u OG (100 μ g/ml). Los explantes se prepararon a partir de hojas 3 días después de la agroinfiltración. Los valores de fluorescencia globales evaluados después de 20 y 30 minutos de tratamiento se normalizaron frente a la fluorescencia medida después de 10 min. Las barras de error indican el error estándar de las tres repeticiones independientes.

40 B) Variación relativa de fluorescencia en explantes que expresan WEG, WAK1 o FLS2 tratados durante 30 min con inductores (100 μ g/ml de OG, flg22 10 μ M; 100 μ g/ml de 3-6 OG y 100 μ g/ml de OM) y montados posteriormente en presencia de EDTA para el análisis de microscopía confocal. Todos los valores se normalizaron frente a la intensidad de GFP global detectada después de 10 minutos de estimulación. Las barras de error indican el error estándar de las tres repeticiones independientes.

45 C) Micrografías de fluorescencia de secciones transversales fusionadas (375 μ m x 375 μ m x 20 μ m) después de media hora antes de la estimulación con OG (100 μ g/ml), y tratadas con EDTA 5 mM, de los sectores de la hoja de *Arabidopsis* agroinfiltrada que expresan WEG. Las flechas indican las áreas de tejido que muestra la señal de fluorescencia decreciente.

50 D) Estallido oxidativo en hojas de tabaco que expresaban transitoriamente eJMC, EFR y EWAK. El recuento de fotones se realizó utilizando cortes de hojas de tabaco en una solución de luminol y peroxidasa, durante el tratamiento con elf18 10 μ M. Los explantes que expresan eJMC y EFR fueron utilizados como control negativo y positivo, respectivamente. El experimento se repitió al menos 6 veces en dos replicados independientes.

E) Inducción de la biosíntesis de etileno en hojas tabaco agroinfiltrado que expresan EFR, WAK1, WEG y EWAK. Cada construcción se estimuló durante 2 h con elf18 (10 μ M) o OG (100 μ g/ml). NC: control negativo, representado

por el tejido de la hoja agroinfiltrado que expresa EFR o FLS2 cuando OG o elf18, respectivamente, se utilizaron para la inducción. Las barras de error indican el error estándar de tres repeticiones independientes.

5 F) Crecimiento de *Agrobacterium* en los tejidos de *N. tabacum* que expresan transitoriamente proteínas receptoras. Las hojas de tabaco se infiltraron con *Agrobacterium* que expresa los receptores indicados y el número de unidades formadoras de colonias (c.f.u.) de *Agrobacterium* en los tejidos analizados justo después de la infiltración (barras blancas) y 24 h (barras grises). Se utilizaron EFR y eJMC como controles positivos y negativos, respectivamente. Para cada receptor, se analizaron tres muestras en cinco experimentos independientes. *, $p < 0,005$.

Figura 6-1: Inducción de respuestas de defensa por los receptores quiméricos de WAK1/EFR

10 (A) Inducción de la biosíntesis de etileno en explantes de tabaco agroinfiltrado que expresan EFR, WAK1, WEG y EWAK. Los explantes se estimularon durante 2 h con elf18 (10 μ M) u OG (100 μ g/mL) u OG cortos y biológicamente inactivos (OG3-6). Tejidos de hojas agroinfiltradas que expresan EFR o WEG y estimulados con OG o elf18 respectivamente, representaron el control negativo. Los valores son medias \pm E.E.M. (N = 3). (B) Expresión génica inducida por el inductor en plantas Col-0 no transformadas y Col-0 efr, y en plantas Col-0 efr de *Arabidopsis* transgénicas que expresan de forma estable WEG. La acumulación de transcripciones de At3g22270 y At4g37640 se analizó por PCR semi-cuantitativa, utilizando el gen UBQ5 para la normalización. Las hojas adultas se infiltraron con jeringa con agua, OG (25 μ g/ml) o elf18 (10 μ M) durante 3 h. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares. El mismo experimento se realizó en una segunda línea transgénica independiente que expresa WEG con resultados similares. (C) Estallido oxidativo en hojas de tabaco agroinfiltradas que expresan EWAK. Hojas que expresan eJMC y EFR se utilizaron como un control negativo y positivo, respectivamente. El estallido se midió por recuento de fotones utilizando cortes de hojas incubadas en una solución que contiene elf18 10 μ M, luminol y peroxidasa. El experimento se repitió al menos 6 veces con dos repeticiones independientes.

Figura 6-2: Respuesta frente a bacterias y hongos patógenos y a OG de plantas que expresan los receptores quiméricos.

25 (A) Crecimiento de *A. tumefaciens* en los tejidos de *N. tabacum* que expresan transitoriamente proteínas receptoras. Las hojas de tabaco se infiltraron con *Agrobacterium* que lleva las construcciones de receptores indicados y el número de unidades formadoras de colonias (c.f.u.) de *Agrobacterium* en los tejidos se analizaron inmediatamente después de la infiltración (barras blancas) y después de 24 h (barras grises). Se utilizaron EFR y eJMC como controles positivos y negativos, respectivamente. Para cada receptor, se analizaron tres muestras en cinco experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control (Col-0 para las plantas WAK1 y Col-0 efr para las plantas WEG y EWAK). (B) Desarrollo de lesiones en *Arabidopsis* de tipo salvaje (Col-0) y plantas del mutante Col-0 EFR y en plantas transgénicas que expresan las plantas WAK1, WEG y EWAK inoculadas con *B. cinerea* 48 h después de la inoculación. Los valores son medias \pm E.E.M. de al menos 16 lesiones. El mismo experimento se realizó en una segunda línea transgénica independiente que expresa WAK1 con resultados similares. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control (Col-0 para las plantas WAK1 y Col-0 efr para las plantas WEG y EWAK). No se observaron síntomas en las plantas inoculadas con caldo de dextrosa de patata (PDB) (maqueta de simulacro).

Figura 6-3: Las plantas transgénicas que expresan WAK1, WEG y EWAK no muestran activación constitutiva de las respuestas de defensa.

40 Las hojas se tiñeron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) para la visualización de H₂O₂ (panel superior) y con azul de anilina para la visualización de callosa (panel inferior).

Figura 6-4: Desarrollo de las lesiones en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* a las 24 h después de la infección con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

45 La concentración de inóculo fue de $5 \times 10^5 \times 10^7$ CFU/ml. Los valores son medias \pm SE de al menos 16 lesiones. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas contra las plantas de control (Col-0 o Col-0 EFR), según la prueba t de Student (*, $p < 0,0005$).

Figura 7: Secuencia de alineación de WAK quinasas de *A. thaliana*

50 Las secuencias están referenciadas con los números de entrada del GenBank o SwissProt correspondientes. La figura fue preparada con Bioedit (Hall et al., 1999). La WAK1 quinasa (NP_564137 de 371 a 735) se alineó con WAK2 quinasa (NP_173549 de 366 a 732), WAK3 (NP_173547 de 377 a 741), WAK4 (NP_173544 de 372 a 738) y WAK5 (NP_173546 de 370 a 733). La alineación que incluye también ORP-1, la resistencia a *Fusarium oxysporium* 1 (WAKL22: NP_859908 de 383 a 751) (Diener et al., 2005). En negro se indican las identidades de aminoácidos y en gris la similitud de aminoácidos.

Figura 8. La quinasa de WAK1 es del tipo RD.

55 Relaciones evolutivas de 13 secuencias de aminoácidos de quinasas RLK de *Arabidopsis thaliana*. La historia evolutiva se dedujo usando el Método de Agrupamiento de Vecinos (Decreux 2006, Kohorn 2009). El análisis

consenso de remuestreo inferido a partir de 10000 repeticiones se toma para representar la historia evolutiva de las quinazinas analizadas. Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50% de repeticiones del análisis de remuestreo se contraen. El porcentaje de árboles replicados, en el que la quinasa asociada está agrupada junta en la prueba de análisis de remuestreo (10000 repeticiones), se compara a continuación con las ramas. Los análisis filogenéticos se realizaron en MEGA4 (Wagner 2001). Se indican las quinazinas RD y no RD (Decreux 2005). La observación de que, en un muestreo de levadura, mosca, gusano, humanos, *Arabidopsis* y arroz kinomes, 12 de las 15 quinazinas conocidas funcionan como receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) en inmunidad innata son del tipo no-RD, mientras que la mayoría de los del tipo RD participa en los procesos de desarrollo, sugiere que el motivo RD también puede caracterizar quinazinas que juegan un papel en la defensa y el desarrollo, tales como (Galletti 2008).

Procedimientos experimentales

Parte material

pFLS2::FLS2 y *pEFR::EFR* fueron proporcionados gentilmente por Cyril Zipfel (Laboratorio Sainsbury, Centro John Innes) mientras que la línea bak1.4 genéticamente modificada fue amablemente proporcionada por Delphine Chinchilla (Zurich-Basel Plant Science Center, Instituto de Botánica de la Universidad de Basilea). El ADNc de WAK1 se adquirió de ABRC (U09348). Los grupos OG con un grado medio de polimerización (DP) de 10 a 15 (OG) se prepararon amablemente por el Dr. Salvi (Università di Roma "La Sapienza"). OG corto con un DP comprendido entre 3 y 6, se adquirió de Sigma (no. de cat. T7407). Los péptidos flg22 y elf18 fueron sintetizados por Pr. Schininà (Universidad de Roma "La Sapienza") y sus secuencias se han descrito por Felix et al., (1999) and Kunze et al., (2004). La secuencia de flg22 es QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA (SEQ ID No. 27); mientras que la secuencia de elf18 es Ac-SKEKFERTKPHVNVGTIG (SEQ ID No. 28). El péptido, que se utiliza para un control negativo en el análisis de la expresión génica, fue proporcionado amablemente por el Dr. Gianni (Universidad de Roma "La Sapienza"). Este hexapéptido (EQVSAV, SEQ ID No. 29) está implicado en la unión de PDZ (proteína de densidad post-sináptica (PSD95), supresor del tumor grande de disco de *Drosophila* (D1gA), y el motivo de la proteína Zonula occludens-1 (zo-1)) (Jemth P, Gianni S. 2007). Las bacterias *Agrobacterium thumefaciens* GV3101 que portan el vector auxiliar pSoup se utilizaron para las transformaciones en las plantas.

Material vegetal

Fueron adquiridas de semillas Lehle, semillas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) Columbia-0 (Col-0), Wassilewskija-0 (WS-0) tipo salvaje. Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* en una mezcla 3:1 de suelo (Einheitserde) y arena (Compo Agricultura) a 22°C y una humedad relativa del 70% en virtud de un ciclo de 16 h de luz/8 h de oscuridad (aproximadamente 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Fueron cultivadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) Petit Havana-SR1 en un invernadero a 23°C y 60% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 16 h (130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Clonación y expresión de plantas

Se utilizaron protocolos estándar para el aislamiento de ADN de plásmido, la purificación y las digestiones de las enzimas de restricción. Como se describe en Brutus et al. (2004), todas las quimeras se generaron utilizando el método de extensión por solapamiento con los cebadores listados en la Tabla 1 y los métodos que se resumen en la Tabla 2. Brevemente, para producir la quimera, se llevan a cabo PCR1 y PCR2 utilizando los cebadores y la plantilla listados en la Tabla 2, y siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada producto de PCR1 y PCR2 se purifica y se utiliza para PCR3A sin cebadores. A partir de entonces, se añadieron los cebadores a la reacción PCR3A y se realizaron 25 ciclos (PCR3B). Todos los fragmentos fueron clonados en pREV-1 (Reca et al., 2008). Las construcciones se verificaron por secuenciación (Eurofins MWG Operon, Italia). La fusión de GFP ha sido descrita anteriormente (Reca et al., 2008). La mutagénesis dirigida al sitio, que corresponde a Y849A, se logró utilizando el kit de Cambio XL-Quick (Stratagene).

Tabla 1: Lista de cebadores

NOMBRE	PFOR	PREV	PFOR-SOE	PREV-SOE
FLS2 (AT5G46330)	ATGCGGATCCAT GAAGTTACTCTCA (SEQ ID N.1)	GCATGGTAC CCTACCTAGG AACTTCTCGA TCC (SEQ ID N.2)		

NOMBRE	PFOR	PREV	PFOR-SOE	PREV-SOE
EFR (AT5G20480)	(1) (SEQ ID N.3) ATGCGGATCCAT GAAGCTGTCCTTT TC	GCATGGTAC CCTACCTAGG GCATACTATG		
	(2) (SEQ ID N.4) ATCGGAATCCAT GAAGCTGTCCTTT TCAC	TAG (SEQ ID N.5)		
TMC	-		ATTCTTGGATCAGCCGCG GCTCTTTTGTAAATCATAA TTGT (SEQ ID N.6)	ACAATTATGATTAACAAA AGAGCCGCGGCTGATCCA AGAAT (SEQ ID N.7)
eJMC	-		TTCTCGAAGAGAACCAGA GTTGTCAGTGGTATTGTGA TAG (SEQ ID N.8)	CTATACAAATACCACTGA CAACTCTGGTTCTCTCGA GAA (SEQ ID N.9)
WAK1 (AT1G21250)	(1) (SEQ ID N.10) ATGCGAATCCAT GAAGGTGCAGGA GGG	GCATGGTAC CCTACCTAGG GCGGCCAGT		
	(2) (SEQ ID N.11) ATGCCCGGGATG AAGGTGCAGGAG GG	TTCAATG (SEQ ID N.12)		
WEG	-	-	CTGCAAGCGTAAAGAGTT	ATACAAATACCACTGACA
			TGCAGTTGTCAGTGGTATT TGTAT (SEQ ID N.13)	ACTGCAAACCTTTTACGCT TGCAG (SEQ ID N.14)
EWAK	-	-	GCCTCTGTCAGTTAGAAA GAAATGGACTACAATTCT TCTTGG (SEQ ID N.15)	CCAAGAAGAATTGTAGTC CATTCTTTCTAACTGACA GAGGC (SEQ ID N.16)
eJMC^{Y859A}	CTTTGGGGATGTT CCATGAGAAGGT AAGTGCTGAAGA GCTTCATAG (SEQ ID N.17)	CTATGAAGCT CTTCAGCACT TACCTTCTCA TGGAACATC CCCCAAAG (SEQ ID N.18)		

NOMBRE	PFOR	PREV	PFOR-SOE	PREV-SOE
UBQ5 (AT1G62250)	GGAAGAAGAAGA CTTACACC (SEQ ID N.19)	AGTCCACACT TACCACAGT A (SEQ ID N.20)		
RetOx (AT1G26380)	CGAACCCCTAACA ACAAAAAC (SEQ ID N.21)	GACGACACG TAAGAAAGT CC (SEQ ID N.22)		
CYP81F2 (AT5G57220)	GTGAAAGCACTA GGCGAAGC (SEQ ID N.23)	ATCCGTTCCA GCTAGCATC A (SEQ ID N.24)		
PAD3 (AT3G26830)	TCGCTGGCATAA CACTATGG (SEQ ID N.25)	TTGGGAGCA AGAGTGGAG TT (SEQ ID N.26)		

Tabla 2: Esquema de las amplificaciones

Producto génico	PCR 1	PCR 2	PCR 3A	PCR 3B	Sitio de restricción para la clonación (sitio 5/sitio 3)
FLS2	pFw-FLS2 pRev-FLS2 ciclos 30 pFLS2::FLS2	-	-	-	BamHI/ KpnI
EFR	pFw-EFR1 prev-EFR 30 ciclos pEFR::EFR	-	-	-	BamHI/ KpnI
TMC	pFw-FLS2 pRev-SOE- TMC 30 ciclos pFLS2:: FLS2	pFw - SOE-TMC pRev -EFR 30 ciclos pEFR::EFR	5 ciclos TMC- PCR 1 TMC- PCR 2	pFw -FLS2 pRev - EFR 25 ciclos TMC- PCR 3A	BamHI/ KpnI
eJMC	pFw-FLS2 pRev-SOE- eJMC 30 ciclos pFLS2:: FLS2	pFw -SOE-eJMC pRev -EFR 30 ciclos pEFR::EFR	5 ciclos eJMC- PCR 1 eJMC- PCR 2	pFw -FLS2 pRev - EFR 30 ciclos eJMC-PCR3 A	BamHI/ KpnI
WAK1	pFw-WAK1A pRev- WAK1 30 ciclos de ADNc de WAK1	-	-	-	EcoRI/KpnI
WEG	pFw-WAK18 pRev- SOE-WEG 30 ciclos de ADNc de WAK1	pFw -SOE-WEG pRev -EFR 30 ciclos pEFR::EFR	5 ciclos WEG- PCR 1 WEG- PCR 2	pFw -WAK1B pRev - EFR 25 ciclos WEG- PCR 3A	SmaI/KpnI
EWAK	pFw-EFR2 pRev-SOE- EWAK 30 ciclos pEFR:: EFR	pFw -SOE-EWAK pRev -WAK1 30 ciclos de ADNc de WAK1	5 ciclos EWAK-PCR 1 EWAK-PCR 2	pFw -EFR2 pRev - WAK1 25 ciclos EWAK-PCR 3A	EcoRI/KpnI

Producto génico	PCR 1	PCR 2	PCR 3A	PCR 3B	Sitio de restricción para la clonación (sitio 5/sitio 3)
Para obtener los genes quiméricos, se realizaron ampliificaciones (PCR1 y PCR2) usando los cebadores indicados y las plantillas. Cada producto de PCR1 y PCR2 se purificó y se utilizó para un PCR3A sin cebador. A continuación, se añadieron cebadores a la reacción PCR3A para PCR3B. Las plantillas para la PCR están en negrita.					

5 Las plantillas de PCR se muestran en negrita. Los cebadores que figuran en la Tabla 1 se muestran en letras mayúsculas. Se generaron líneas transgénicas estables usando el procedimiento de transferencia de genes mediado por *A. tumefaciens* estándar de infiltración por inflorescencia (Bent et al., 2006). Se mantienen separados grupos de plantas transformadas independientes para la selección de líneas transgénicas independientes con base a su resistencia a la fosfotricina y la fluorescencia de GFP de las hojas. Se prepararon líneas transgénicas transitorias de tabaco y Arabidopsis mediante la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* que lleva las construcciones individuales, como se describe en Reca (2008).

Infecciones de *Agrobacterium tumefaciens*

10 Se llevaron a cabo infecciones de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* como se describe en Katagiri et al., (2002) y usando una concentración de *Agrobacterium* correspondiente a una DO_{600} de 1,0 en $MgCl_2$ 10 mM y acetosiringona 600 μM . Después de 24 h de la infiltración, la dilución en serie de las colonias de *Agrobacterium* se depositaron sobre agar LB suplementado con gentamicina y rifampicina y se cultivaron durante 2-3 días a 28°C en la oscuridad. Se utilizaron por experimento al menos 5 plantas independientes y 3 hojas por planta diferentes.

15 Infecciones de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovora*

20 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (antes *Erwinia carotovora*; Gardan et al., 2003) (cepa DMSZ 30169) se obtuvo de DSMZ GmbH (Alemania). Se preparó un cultivo líquido utilizando 10 ml de medio LB. Después de 16 h de crecimiento a 28°C en un agitador rotatorio a 250 rpm, las células bacterianas se recogieron por centrifugación y el sedimento se resuspendió en tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0 que corresponde a 5×10^7 CFU/ml.

25 Para la infección, hojas completamente desarrolladas de plantas de Arabidopsis de 4 semanas de edad se separaron y se colocaron en placas Petri de agar 0,8%. Se hizo un pequeño agujero con una aguja en cada mitad de la hoja y fue manchado con 5 μl de suspensión de gotas bacterianas. Los síntomas se puntuaron midiendo el área de tejido macerado 24 horas después de la inoculación a 22°C y 12 h de fotoperiodo. El área se midió mediante el software ImageJ. Los experimentos se repitieron tres veces y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional por la prueba de Tukey.

Microscopia confocal

30 La fluorescencia dependiente de GFP se monitorizó de 2 a 4 días después de la infección en las células de la epidermis inferior. Se cortaron al azar trozos de hojas de la zona infectada y se montaron en agua o suplementaron con inductores para las observaciones microscópicas. Se utilizaron F1g22 y elfl8 a 10 μM mientras que los oligosacáridos se utilizaron a 100 $\mu g/ml$. Los materiales fueron analizados utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DM IRE equipado con una cámara digital enfriada (DFC350FX R2; Leica). La fluorescencia de GFP se excita con una línea láser de 488 nm, y se recogió la fluorescencia emitida a 543 nm. El Software Confocal Leica y el Adobe Photoshop 5.0 se utilizaron para el procesamiento de imágenes posterior a la adquisición.

35 Todas las muestras produjeron imágenes con objetivos de aceite 40x o 100x. Las fotos fueron tomadas en el marco de Kahlman dando un promedio de 16 exploraciones para la dinámica de interiorización y 4 exploraciones para las localizaciones celulares.

Extracción de proteínas a partir de plantas

40 Se utilizaron hojas de Arabidopsis o tabaco agro-infiltradas con las construcciones correspondientes para preparar los extractos crudos, fracciones microsomales y fluidos de lavado intercelulares. Se prepararon extractos totales como se describe en Chinchilla et al. (2007); se prepararon fluidos de lavado microsomales e intercelulares como se describe en Sicilia et al. (2005). La concentración total de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). La expresión de las diferentes proteínas GFP fusionadas se confirmaron por análisis de transferencia Western usando anticuerpos policlonales anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) y se detectó usando el

45 kit ECL (Amersham).

Mediciones de etileno

Se cortaron aproximadamente 150 mg de hoja de tabaco agroinfiltrada en pequeñas rodajas y se lavaron exhaustivamente con agua destilada estéril. Los explantes se colocaron en frascos sellados de 10 ml que contenían 2 ml de agua estéril solo o suplementado con 100 mg L⁻¹ de OG, o flg22 1 µM o elf18 10 µM. Se retiraron 450 µl de muestras de espacio de cabeza del vial después de un tratamiento de 2 h y se analizaron por cromatografía de gas-espectrometría de masa utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6850A acoplado a un detector selectivo de masas cuadrupolo 5973N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna capilar de sílice fundida de HP Plot-Q (30 m x 0,32 mm de diámetro interno) revestida con poliestireno-divinilbenceno (espesor de la película 0,20 µm) como fase estacionaria. Modo de inyección: sin fraccionamiento a una temperatura de 220°C. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 50°C durante 8 minutos y se elevó a 220°C a una velocidad de 15°C/min y se mantuvo durante 5 min. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1,0 ml/min. Los espectros de masas se recogieron tanto en el modo de análisis de barrido completo como de SIM monitorizando los iones m/z 26, m/z 27 y m/z 28 (energía de ionización 70 eV; fuente de iones 280°C; fuente de iones al vacío 10⁻⁵ Torr).

Bioensayos con tejidos vegetales

Se ensayaron la tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB), la deposición callosa y el análisis de la resistencia del gen como se describe (Galleti, et al., 2008). Para la medición de especies de oxígeno activas liberadas por las plantas de tabaco agroinfiltradas después del tratamiento con inductor, los autores utilizaron un ensayo dependiente de luminol modificado (Gomez et al., 1999). Los cortes, correspondientes a aproximadamente 30 mg de peso fresco, se transfirieron a tubos de ensayo que contenían flg22 1 µM o elf18 10 µM en solución acuosa suministrada con luminol 40 µM (SIGMA). Se midió la quimio-luminiscencia en un contador de centelleo líquido (LS-6500, Beckman), después de 5 y 15 min con la adición de inductores.

Análisis estadístico.

Los datos se representan como media ± error estándar (s.e.m.). Se utilizó el t-test no pareado con igualdad de varianzas para calcular el valor P de dos colas para calcular la significación estadística de las diferencias entre dos grupos de tratamiento en todo el estudio. Los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado y se repitieron en un mínimo de tres ensayos independientes.

Resultados

Diseño de un receptor quimérico funcional FLS2/EFR

Se construyeron dos genes quiméricos denominados TMC y eJMC que comprende la parte extracitosólica de FLS2 y la porción intracitosólica de EFR (Figura 1A). Los receptores quiméricos difieren unos de otros y de los ensayados anteriormente en las plantas (He et al., 2000; Cao et al., 2007a) en el punto de unión. La quimera TMC (Ala817FLS2-Leu661EFR) incluyó el dominio de la repetición rica en leucina (LRR), el dominio yuxtamembrana externo (Ejm) y la mitad N-terminal del dominio transmembrana (TM) de FLS2 que se fusiona corriente arriba de la mitad C-terminal del dominio TM EFR, con exclusión de la secuencia de consenso putativa de dimerización GXXXG, y los dominios IJM y quinasa de EFR (Figura 1B). La quimera eJMC (Arg806FLS2-Val650EFR) incluyó los dominios LRR y de EJM de FLS2 fusionado corriente arriba de todo el dominio transmembrana (TM), IJM y los dominios quinasa de EFR. Ambos receptores quiméricos, así como FLS2 y EFR como controles, se fusionaron con GFP para permitir la detección por microscopía confocal y análisis de transferencia Western. Los genes que codifican las cuatro fusiones de proteínas fueron cada uno clonados en el vector pREV1, un vector pGREEN0229 modificado (Reca et al., 2008), bajo el control del terminador CaMV 35S y NOS.

La caracterización funcional de las fusiones de proteínas fluorescentes se realizó en un sistema de expresión transitorio, utilizando hojas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* que llevan las construcciones individuales. A los dos días después de la infiltración (dpi), se prepararon extractos de proteínas totales a partir de hojas infiltradas y se sometieron a análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal específico de GFP. Fue visible una banda específica, con una movilidad cercana a la presentada previamente para FLS2 (Robatzek et al., 2006), masa molecular aparente de ~170 kDa en los extractos de proteínas de las hojas agroinfiltradas con los cuatro constructos (Figura 2A). El análisis de microscopía confocal de las hojas agroinfiltradas mostró niveles comparables de fluorescencia, que estaban localizados en correspondencia con la membrana plasmática (Figure 2B and C) para todas las fusiones de proteínas. El análisis de transferencia de puntos utilizando el anticuerpo GFP de las fracciones microsomales y de los fluidos de lavado intercelular (IWF) confirmaron la localización de la membrana plasmática de las proteínas (Figure 2D).

A continuación, se estudió la dinámica de la localización de la fluorescencia tras el tratamiento con inductores. Considerando que la endocitosis de los receptores de superficie tras la unión del ligando a menudo se produce en animales (Warren y Landgraf 2006), este mecanismo en las plantas ha surgido solo recientemente (Geldner y Robatzek 2008) y, hasta ahora, FLS2 es el único receptor implicado en la inmunidad de planta mostrada al someterse a endocitosis tras la estimulación específica con flg22 (Robatzek et al., 2006). Los autores probaron el efecto de flg22 y elf 18, es decir, los péptidos específicamente reconocidos por FLS2 y EFR, respectivamente, y de

los oligogalacturonidos con un grado de polimerización entre 10 y 16 (OG), que actúan como inductores generales de las respuestas de defensa en varias plantas. Fueron tratados explantes de hojas de *Arabidopsis* agroinfiltrada en 2 dpi con inductores y después se sometieron a análisis de microscopía confocal. No se observó disminución de la señal de fluorescencia asociada a la membrana plasmática en los sectores de hoja no inducidos que expresaban FLS2, mientras que los tejidos tratados con flg22 mostraron un 15% y 30% de disminución después de 20 min y 30 min de estimulación, respectivamente (Figura 3A). La disminución de la fluorescencia no involucró a todo el sector infiltrado sino sólo parches, probablemente debido a la penetración heterogénea y/o a la difusión de flg22 (Figura 3B). En su lugar, las hojas tratadas con elfl8 que expresaban EFR no mostraron ninguna disminución significativa de la fluorescencia (Fig. 3A), hasta una concentración de inductor 1 mM (datos no mostrados). Del mismo modo, las hojas que expresaban TMC no mostraron ninguna disminución de la fluorescencia tras el tratamiento con flg22. En cambio, cuando los explantes que expresaban eJMC fueron estimulados con flg22, la señal fluorescente se redujo al 25% y 40% después de 20 min y 30 min, respectivamente (Figura 3B). El tratamiento de explantes que expresaban eJMC con elfl8 y el inductor activo de los OG no indujo ninguna variación significativa de la fluorescencia.

La disminución de la fluorescencia en explantes que expresaban eJMC en respuesta a flg22 puede ser debida a un mecanismo de endocitosis similar al demostrado en FLS2 y en función de la aparición del motivo tipo PEST en su región C-terminal, entre Arg1090 y Leu 1105 (Hammond et al., 2001). El motivo tipo PEST está ausente en eJMC, que contiene en su lugar el tetrapéptido tirosina YXXΦ (Husebye et al., 2006), originalmente presente en EFR (restos 859-862) (Zipfel et al., 2006; Robatzek et al., 2006). Con el fin de verificar si este tetrapéptido es responsable de la disminución de la fluorescencia en explantes que expresaban eJMC tratados con flg22, se obtuvo una variante mutada en el primer aminoácido de la secuencia de YXXΦ (eJMC^{Y859A}) y se analizó su comportamiento tras la estimulación con flg22 por microscopía confocal en explantes agroinfiltrados. Los niveles de fluorescencia no disminuyeron con la estimulación de tanto flg22 10 μM como 100 μM (Figura 3C), lo que sugiere que la disminución de la fluorescencia es probablemente debida a la internalización de la proteína mediada por YXXΦ.

Los autores también analizaron si la presencia de LRR-RLK BAK1 (Nam & Li 2002), una proteína necesaria para la señalización de flg22 y elfl8 (Chinchilla et al., 2007), también se requería para la internalización de la eJMC inducida por flg22. La internalización de flg22 fue casi abolida en el mutante *bak1-4*; en cambio, la de eJMC inducida por flg22 no se vio afectada (Figura 3D). Estos datos demuestran que mientras que la internalización de FLS2 depende de la presencia de BAK1, la internalización de la quimera eJMC no lo hace.

El comportamiento de TMC y eJMC tras el tratamiento con flg22 y elfl8 también se analizó en hojas agroinfiltradas del ecotipo SR1 de *N. tabacum* y se comparó con el de EFR y FLS2. El análisis de microscopía confocal de sectores de hojas infiltradas en 2 dpi mostró niveles similares de fluorescencia y un patrón similar de localización en el nivel de la membrana plasmática de todas las fusiones de proteínas expresadas (datos no mostrados). Ni FLS2 ni TMC se sometieron a la internalización tras la estimulación con flg22; del mismo modo, EFR no mostró ninguna respuesta frente a la estimulación con elfl8. En cambio, en las plantas que expresaban eJMC, la fluorescencia disminuyó de 10 a 30 min después de la estimulación con flg22, en una medida similar a la observada en *Arabidopsis*, es decir, alrededor del 25% y 35% después de 20 min y 30 min, respectivamente (Figura 3E).

La expresión de eJMC confiere a las plantas la capacidad de activar respuestas de defensa típicas de EFR tras el tratamiento con flg22.

Con el fin de caracterizar los receptores quiméricos y su capacidad para activar respuestas de defensa secuencia abajo, la producción de etileno, conocida por ser activada por FLS2 y EFR en respuesta a flg22 y elfl8, respectivamente (Zipfel et al., 2006; Robatzek et al., 2007), se controló en explantes de hojas de tabaco agroinfiltradas que expresaban de forma separada FLS2, EFR, TMC, eJMC o eJMC^{Y859A} fluorescente (Figura 3F). Los niveles de etileno fueron ligeramente más altos en hojas de explantes agroinfiltrados no estimulados que en los no infiltrados (Fig. 3-1), y aumentó ligeramente en respuesta a flg22, pero no a elfl8, en ambos tipos de explantes, lo que indica una intrínseca débil capacidad de *N. tabacum* para responder a flg22. Por otro lado, en explantes que expresaban EFR, elfl8 indujo una liberación de etileno 3,8 veces mayor que en explantes que expresaban EFR (control negativo), lo que confirma las observaciones anteriores de que EFR es funcional en el tabaco (Zipfel et al., 2006). En explantes que expresaban eJMC, flg22 indujo una liberación de etileno significativamente mayor que en explantes que expresaban EFR usados como controles negativos, mientras que explantes que expresaban tanto TMC como FLS2 mostraron sólo una débil respuesta frente a este inductor. Este resultado está de acuerdo con la observación de que FLS2 no es funcional en *Nicotiana benthamiana* (Zipfel et al., 2004; Robatzek et al., 2007). En particular, la acumulación de etileno inducida por flg22 en explantes que expresaban eJMC^{Y859A} fue 4,8 veces mayor que en el control negativo, lo que sugiere que la mutación del motivo YXX impide la internalización del receptor, pero no la activación de la quinasa y la respuesta subsiguiente.

También se expresaron de forma estable eJMC y FLS2 fluorescentes en *Arabidopsis* transgénica ecotipo Wassilewskija (Ws-0), que lleva EFR, pero que carece de un sistema de percepción flg22 (Gomez-Gomez et al., 1999, Bauer et al., 2001). Fueron seleccionadas plantas T1 transformadas que expresaban las proteínas, denominadas plantas eJMC y plantas FLS2, respectivamente, por análisis de microscopía confocal de hojas de roseta adultas. Fueron elegidas para posteriores análisis dos líneas positivas independientes (Nos. 1,4 y 1,6) para plantas eJMC y una para plantas FLS2, que mostraban niveles comparables de fluorescencia. Sin embargo, las plántulas T2 transgénicas de las tres líneas mostraron resistencia frente a los antibióticos, pero no fluorescencia, en

diferentes órganos durante el crecimiento de la planta. Se detectó fluorescencia sólo en hojas de roseta adultas, probablemente debido al bajo nivel de expresión del receptor en las diferentes etapas de desarrollo. Probablemente, debido al bajo nivel de eJMC y FLS2, las plántulas transgénicas no mostraban inhibición del crecimiento (Gómez-Gómez *et al.*, 1999) al tratarlas con flg22 (datos no mostrados). Flg22 indujo la producción de H₂O₂ y la deposición de callosa tanto en FLS2 (datos no presentados) como en plantas eJMC, pero no en plantas Ws-0 sin transformar; este último, en su lugar, respondió a elfl8 (figura 4A). Del mismo modo, la expresión de tres genes potencialmente implicados en la resistencia a patógenos, es decir, un gen putativo de reticulina oxidasa (*RetOx*; At1g26380), el gen ATCYP81F2 (At5g57220) de la citocromo P450 y PAD3 (At3g26830), que codifica la última enzima de la ruta biosintética de camalexina (Ferrari *et al.*, 2007), fue inducido por flg22 en ambos FLS2 y eJMC, pero no en las plantas no transformadas (figura 4B). Estos resultados confirman la funcionalidad del receptor quimérico eJMC.

Por tanto, los autores infectaron plantas de *A. thaliana* mediante pulverización de bacterias Pst DC3000 sobre las superficies de las hojas. En estas condiciones, las plantas Ws-0 mostraron un desarrollo más rápido y más severo de los síntomas de la enfermedad que las plantas FLS2 o eJMC (Figura 4C). Estos síntomas fuertes se correlacionaron con un mayor número de bacterias en WS-0 que en hojas FLS2 o eJMC (Figura 4C). Se encontró una mayor resistencia de las plantas eJMC, en comparación con las plantas Ws-0 de tipo salvaje, en todos los tres experimentos independientes.

Las plantas Ws-0 transformadas con un gen eJMC funcional adquirieron capacidad de respuesta frente a flg22 y se convirtieron en menos susceptibles frente a Pst DC3000, lo que indica que la deficiencia natural en la percepción de flagelina en el ecotipo Ws-0 se puede complementar con el gen quimérico eJMC.

20 **Diseño de receptores quiméricos WAK1/EFR e identificación de WAK1 como un receptor de oligogalacturonidos.**

Después de la demostración de que el receptor quimérico FLS2/EFR es funcional, la estrategia de diseño utilizada anteriormente se utilizó para construir dos quimeras adicionales, con el objetivo de investigar si WAK1, un RLK sin una función biológica definida pero que se sabe que interactúa con el componente de pectina de la matriz extracelular, es un receptor para OG (Figura 5A). El primer receptor quimérico, indicado como WEG, comprendía el ectodominio WAK1 fusionado a la porción TM-iJM-quinasa de EFR y fue diseñado para probar la capacidad del ectodominio WAK1 de percibir OG y transmitir la señal dentro de la célula. Una segunda quimera, indicada como EWAK, que comprende el ectodominio EFR fusionado a la porción TM-iJM-quinasa de WAK1, fue diseñada para determinar si las respuestas secuencia abajo de la activación mediada por elfl8 de la quinasa WAK1 están relacionadas con las que normalmente se inducen por OG. Tanto WEG como EWAK, así como WAK1, se fusionaron a GFP y se usaron en experimentos de agroinfiltración (Figura 5A). El análisis de microscopía confocal de los explantes agroinfiltrados mostró que la fluorescencia que se deriva de EWAK, WEG y WAK1 fue localizada en correspondencia de la membrana plasmática, a niveles similares a los observados para FLS2 e EFR (Figura 5B, 5C). El análisis de transferencia Western, que utiliza anticuerpos específicos de GFP en las proteínas de IWF y las fracciones microsomaes preparadas a partir de hojas infiltradas confirmó la localización de la membrana plasmática de las dos quimeras fluorescentes (Figura 5D).

El efecto de los OG en la internalización de WEG fue seguido en hojas de Arabidopsis Col-0 agroinfiltradas. No se detectó disminución de la fluorescencia asociada a la membrana plasmática hasta 30 min después del tratamiento con los OG (Figura 6A). Esto podría ser debido a la incapacidad de WEG de desacoplar su ectodominio de pectinas, puesto que se sabe que se une WAK1 fuertemente a pectina y sólo los tratamientos desnaturalizantes permiten su separación de la pared celular (He *et al.*, 1996). Por otra parte, los estudios de afinidad han demostrado que WAK1 interactúa con las pectinas de la pared celular que se encuentran en una conformación inducida por Ca²⁺ (es decir, las estructuras denominadas "cajas de huevo") y que la interacción se interrumpe mediante la adición de un agente quelante tal como EDTA (Decreux *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2008). Por tanto, los autores analizaron si la internalización inducida por OG de WEG ocurría en presencia de EDTA 5 mM. Las hojas agroinfiltradas que expresan WEG se infiltraron mediante jeringa con los OG y después de 30 minutos los tejidos se montaron en presencia de EDTA para el análisis de microscopía confocal. En estas condiciones, la fluorescencia de WEG disminuyó de la membrana celular en un 15% y 25% después de 20 min y 30 min, respectivamente. No se observó disminución de la fluorescencia en presencia de EDTA bajo estimulación de cualquiera de WEG con flg22 o WAK1 o FLS2 con OG, descartando una activación no específica de endocitosis por EDTA o inductores (Figura 6B y 6C). La internalización de WEG en presencia de EDTA no se produjo bajo la estimulación con OG con un grado de polimerización entre 3 y 6 (3-6 OG) y oligomannurónidos (OMS), dos clases de oligosacáridos que se sabe que son biológicamente inactivos.

La capacidad de WEG para activar respuestas de defensa secuencia abajo bajo la estimulación con OG fue analizada mediante la medición de la producción de etileno, que normalmente no se induce por OG tanto en tabaco como en Arabidopsis (Ferrari *et al.*, 2007); (véase también la Figura 3F) pero se espera que se induce tras la activación del dominio quinasa de EFR. Las hojas de tabaco agroinfiltradas que expresaban WEG acumularon etileno cuando se trataban con OG, a un nivel significativamente mayor (2,4 veces) que el del control negativo, es decir, los tejidos que expresaban EFR estimulados con OG (Figura 6F).

En resumen, el ectodominio de WAK1 fue capaz de detectar específicamente la presencia de OG y transmitir una señal dentro de la célula.

Después de la demostración de que el ectodominio de WAK1 es capaz de responder a OG los autores investigaron si el dominio quinasa WAK1 es capaz de activar una respuesta específica normalmente activada por OG en las plantas. La inducción del estallido oxidativo y de la producción de etileno se analizaron en hojas de tabaco agroinfiltradas que expresaban EWAK bajo la inducción con elf18. Se utilizaron tejidos que expresaban EJM y EFR como un control negativo y uno positivo, respectivamente. Como los explantes que expresaban EFR, los tejidos que expresaban EWAK produjeron una explosión oxidativa después de 15 min de tratamiento con elf18, mientras que los explantes que expresaban EJM no mostraron ninguna respuesta significativa (Figura 6E). Por otro lado, los explantes que expresaban EFR acumularon etileno tras la estimulación con elf18, mientras que los tejidos que expresaban EWAK y EJM no lo hicieron (Figura 6F). La incapacidad de los tejidos que expresaban EWAK para activar la producción de etileno y su capacidad para activar la explosión oxidativa está de acuerdo con la observación de que OG no provoca la síntesis de etileno pero normalmente induce a la explosión oxidativa en tejidos vegetales (Figura 3F).

La capacidad de WEG para activar respuestas secuencia abajo con la estimulación de OG se analizó en tabaco agroinfiltrado. El tratamiento con OG indujo una mayor acumulación de etileno (2,4 veces) en explantes que expresaban WEG que en los controles negativos, es decir, tejidos tratados con OG y tejidos que expresaban WEG tratados con OG cortos y biológicamente inactivos (OG3-6) (Fig. 6-1A). Además, la funcionalidad de WEG se analizó después de la expresión en plantas transgénicas Col-0 efr mediante el control de la expresión de dos genes (At3g22270 y At4g37640) que están regulados por fig22 y elf18 pero no por OG (Denoux 2008, Zipfel 2006). No se observó una activación constitutiva de la expresión de estos genes en las plantas transgénicas (véase controles de agua en la Fig. 6-1B). Después de un tratamiento de 3 h, ambos genes fueron sobre-regulados por elf18 y no por OG en Col-0 de tipo salvaje y no respondió a elf18 en el mutante efr, como se esperaba, mientras que en las plantas transgénicas WEG ambos genes fueron inducidos por OG pero no por otros inductores (Fig. 6-1B). Estos resultados muestran que WEG induce una respuesta de tipo EFR al detectar OG.

Por el contrario, la quimera EWAK nos permitió investigar si el dominio de quinasa WAK1 activa las respuestas específicas normalmente activadas por OG. Tras la inducción con elf18 de hojas de tabaco agroinfiltradas, la expresión de ambos EWAK y EFR, pero no de eJMC, se asoció a un estallido oxidativo fuerte (Fig. 6D y 6-1C); por otro lado, mientras que los explantes que expresaban EFR tratados con elf18 acumularon etileno, los tejidos que expresaban EWAK o eJMC, utilizados como control negativo, no lo hicieron (Fig. 6-1A). Dos características de la respuesta frente a OG, es decir, la aparición de un fuerte estallido oxidativo y la ausencia de inducción de etileno, por lo tanto, se observaron después de la activación específica de EWAK. Como el tabaco, como *N. benthamiana*, adquiere la capacidad de respuesta frente a elf18 solamente después de la expresión de EFR, y este receptor, pero no FLS2, reconoce *A. tumefaciens* y restringe su crecimiento (Zipfel 2006), se investigó si la expresión de EWAK afecta a la supervivencia en *Agrobacterium* en los tejidos. Se observó una disminución del 30% ($p < 0,005$) en el número de células vivas de *Agrobacterium* 24 h después de la inoculación en los tejidos que expresaban EFR o EWAK, mientras que no se observó ningún efecto significativo en los tejidos que expresaban eJMC, WAK1 o WEG (Fig. 6-2A). Estos resultados indican que la activación inducida de *Agrobacterium* de la quinasa derivada de WAK1 de EWAK desencadena las respuestas de defensa que restringen la colonización por esta bacteria. La quinasa de WAK1, como la de BAK1/SERK3 y WAKL22, es del tipo RD (Fig. 8), es decir, que lleva una arginina conservada (R), inmediatamente anterior a la de aspartato constante (D) en el subdominio catalíticamente activo VI y requerido para la activación de la quinasa a través de una autofosforilación de una región reguladora denominada el bucle de activación (Ferrari 2008). La observación de que, en una encuesta de la levadura, mosca, gusano, humanos, *Arabidopsis* y arroz kinomes, 12 de las 15 quinasas conocidas para hacer funcionar receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) en inmunidad innata son del tipo no-RD, mientras que la mayoría del tipo RD participa en los procesos de desarrollo, sugiere que el motivo RD también puede caracterizar quinasas que juegan un papel en la defensa y el desarrollo.

WAK1 y WEG, pero no EWAK, las plantas mostraron un aumento de la resistencia a la infección por *B. cinerea* en comparación con los controles de tipo salvaje (Col-0 o Col-0 EFR) (Fig. 6-2b), de acuerdo con estudios anteriores que muestran que la percepción de OG juega un papel en la resistencia contra *B. cinerea* (Ferrari 2007). Dado que ninguna de las plantas transgénicas mostraron una activación constitutiva de las respuestas de defensa, tal como se determina por el análisis de los niveles de H₂O₂ y de los depósitos de callosa (Fig. 6-3), estos datos sugieren por un lado que tanto los dominios de WAK1 y EFR quinasa inducen respuestas eficaces contra este hongo y, por otra parte, que *Botrytis* no activa el ectodominio EFR en un grado suficiente para reducir su crecimiento.

Ensayo de la infección con *Pectobacterium carotovorum* en plantas transgénicas que expresan WAK1 o los receptores quiméricos WEG y EWAK

Las plantas transgénicas que expresan singularmente los receptores fluorescentes WAK1, WEG y EWAK bajo el control del promotor 35S de CaMV mostraron una mayor resistencia a la *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (anteriormente *Erwinia carotovora*; Gardan et al., 2003) en comparación con los controles no transformados (Col-0 o Col-0 efr) (Fig. 6-4). Debido a que ninguna de las plantas transgénicas mostró una activación constitutiva de las respuestas de defensa, tal como se determina por el análisis de los niveles de H₂O₂ y deposición

de callosa, estos datos indican que tanto los dominios de quinasa WAK1 y EFR son capaces de inducir respuestas efectivas contra esta bacteria. También muestran que ambas quimeras WEG y EWAK confieren resistencia frente a *Pectobacterium carotovorum*.

Discusión

5 Validación del enfoque que utiliza receptores quiméricos basados en EFR

La construcción de receptores quiméricos representa una herramienta única para elucidar la función de receptores huérfanos o funcionalmente redundantes y ha sido ampliamente utilizada en biología animal para proporcionar un profundo conocimiento de los mecanismos de la percepción de la señal. En las plantas, sin embargo, se ha avanzado muy poco en el uso de este enfoque y desde la primera publicación sobre quimeras BRI1/XA21 (He et al., 2000), sólo se ha obtenido información pertinente cuando se llevaron a cabo intercambios de dominios en receptores homólogos muy estrechamente relacionados (Wulff et al., 2001; Van der Hoorn et al., 2005; Rairdan & Moffett 2006). No obstante, los autores decidieron utilizar un enfoque de receptor quimérico para investigar si la quinasa del receptor WAK1, que se ha mostrado que unía OG y homogalacturonano, está implicada en la percepción y transducción de la señal de OG. Fue elegido PAMP LRR, receptor de quinasa EFR de Arabidopsis, como una estructura de la proteína receptora porque, a diferencia de FLS2, funciona tanto en Arabidopsis como en *N. benthamiana* (Zipfel et al., 2006; Chinchilla et al., 2007; Robatzek et al., 2007). Ya que FLS2 y EFR están relacionados y activan respuestas con una superposición en más de un 98% (Zipfel et al., 2006), los autores inicialmente diseñaron un procedimiento experimental de prueba de concepto y probaron si podría obtenerse una quimera funcional utilizando el dominio extracelular de FLS2 y el dominio quinasa de EFR. Para la construcción de las quimeras, los autores eligieron un diseño diferente del anteriormente utilizado, donde la parte del ectodominio TM-iJM de un receptor se fusionó a los dominios de quinasa de un segundo receptor (He et al., 2000; Cao et al., 2007b). Los autores plantearon la hipótesis de que un diseño que mantiene la integridad de la porción de iJM-quinasa de un receptor es más susceptible de proporcionar receptores quiméricos plenamente activos; de hecho, se ha encontrado la región iJM de BRI1 y otros receptores que se autofosforilaban en múltiples sitios, y se ha propuesto que esta autofosforilación podría indicar múltiples parejas citoplasmáticas interactuando por el receptor, cada una con una secuencia diana fosforilada específica (Oh et al., 2000).

En el diseño ejemplificado por eJMC, todo el dominio extracelular de FLS2 se fusionó a la parte de TM-iJM quinasa de EFR. Se utilizó una fusión basada en un diseño similar para estudiar los receptores relacionados con Toll de *Drosophila* (Tauszig et al., 2000) y los receptores tipo Toll de la trucha arco iris (TLR) (Tsujita et al., 2004). Por otro lado, el diseño de la quimera TMC destinada a comprobar si la integridad del dominio helicoidal de EFR TM y una secuencia de dimerización consenso putativa TM (GXXXG) (Mendrola et al., 2002), presente en EFR y ausente en FLS2 (Ali et al., 2007), es importante para la funcionalidad de la quimera. En los animales, los dominios TM han demostrado que desempeñan un papel importante en la dimerización dependiente del ligando y la activación de varios receptores (Bennasroune et al., 2005; Bocharov et al., 2008), mientras que en otros casos pueden inducir un estado inactivo dimerizado del receptor en ausencia del ligando que puede ser cambiado más rápidamente a un estado activo por el ligando a una concentración baja (Constantinescu et al., 2001). Ambas quimeras eJMC y TMC mantienen la integridad de la región de limitación situada en el extremo C-terminal del ectodominio, que se ha propuesto que es importante para la protección del núcleo hidrófobo del dominio LRR del disolvente (Forrer et al., 2003), y la región yuxtamembrana externa, que transmite el cambio conformacional inducido por ligando (Moriki et al., 2001).

La caracterización de las quimeras se llevó a cabo primero por la expresión transitoria en planta. Curiosamente, mientras que EFR y TMC no mostraron internalización en la respuesta frente a *elfl8* y *flg22* respectivamente, eJMC, como FLS2 en Arabidopsis, mostró internalización en respuesta a *flg22* tanto en Arabidopsis como en tabaco. En el mutante de Arabidopsis *bak1-4*, donde la respuesta frente a *flg22* está casi abolida y la respuesta a *elfl8* se deteriora (Chinchilla et al., 2007), los autores observaron internalización de eJM como en el WT. Los autores también observaron que la internalización requiere el tetrapéptido YXXΦ presente en el dominio quinasa EFR, como el mutante eJMC^{Y849A} no pudo salir de la membrana plasmática después de la estimulación.

La producción de etileno, una respuesta típica relacionada con EFR, se indujo en una medida similar a la estimulación de eJMC y más fuertemente a la activación de eJMC^{Y849A}. La producción de etileno se induce en lugar apenas tejidos que expresan TMC activado o FLS2. La observación de que EFR activado no se internaliza, mientras que el eJMC lo hace, de manera similar a FLS2, indica que la falta de internalización no se debe a la ausencia de señales de orientación apropiadas en EFR y sugiere que depende de las características de afinidad de la interacción entre *elfl8* y el ectodominio EFR. Además, la fuerte respuesta de etileno observada con eJMC^{Y849A} indica que la internalización no es un requisito para la señalización de eJMC, sino que más bien disminuye la intensidad de la respuesta, de acuerdo con la noción de que la endocitosis del receptor está a menudo acompañada por la degradación (Robatzek et al., 2006; Henriksen et al., 2008; Roepstorff et al., 2008; Chen 2009). La expresión estable de la quimera eJMC en Arabidopsis ecotipo Wassilewskija (Ws-0), que carece de FLS2 y no responde a *flg22*, produjo plantas transgénicas que mostraban producción de H₂O₂, deposición de callosa y expresión de genes de defensa en respuesta a *flg22*, así como la capacidad de restringir la colonización de *Pseudomonas syringae*.

En conjunto, estos datos muestran que la eJMC es completamente funcional tanto en *Arabidopsis* como en tabaco, donde confiere la capacidad de percibir flg22.

Los receptores quiméricos basados en EFR muestran un papel de WAK1 como receptor de oligogalacturonidos

5 En la segunda parte de este trabajo, se utilizó el enfoque del receptor quimérico basado en el tipo EFR y eJMC de diseño para estudiar si WAK1 responde a OG. Las quimeras WEG y EWAK se construyeron para caracterizar el dominio de ectodominio y quinasa de WAK1, respectivamente. La quimera WEG, transitoriamente expresada en hojas de tabaco, mostró internalización sólo en presencia de ambos OG y EDTA, probablemente debido a que el agente quelante, mediante el secuestro de Ca^{++} y la interrupción de la conformación "caja de huevos" de OG y HGA (Cabrera et al., 2008), y el desanclaje de receptor de la pared celular y permite la internalización. La producción de etileno, que no ocurre en respuesta a OG tanto en *Arabidopsis* como en tabaco (Ferrari et al., 2008 y la presente invención) se indujo por OG en los tejidos que expresaban WEG, aunque a un nivel inferior que el observado en tejidos que expresaban EFR- o eJMC^{Y849A} tratados con elfl8 y flg22, respectivamente. La respuesta más débil de WEG puede ser intrínseca con el modo de señalización de OG o debido a los niveles más bajos de expresión de la quimera en comparación con EFR o eJMC. Curiosamente, un retraso en la expresión de un WAK1 fluorescente se ha informado anteriormente, probablemente debido a su asociación con componentes de la pared celular en el compartimiento citoplásmico (aparato de Golgi) para formar complejos de detergente insolubles (Kohorn et al., 2006a).

20 Una vez demostrado que el ectodominio WAK1 es capaz de percibir OG y transmitir la señal dentro de la célula, el siguiente paso de la presente invención fue caracterizar la función del dominio quinasa WAK1. La quimera EWAK, tras el tratamiento con elfl8, produce una gran explosión oxidativa y no induce la acumulación de etileno. Finalmente, dado que el tabaco, como *N. benthamiana*, adquiere la capacidad de respuesta a elfl8 solamente después de la expresión transitoria de EFR (véase la presente fig. 3F) y este receptor se conoce por reducir el grado de infección con *A. tumefaciens* (Zipfel et al., 2006), los autores probaron si la expresión de eWAK tenía un efecto negativo en la colonización bacteriana en tejidos de tabaco agroinfiltrados. Ningún cambio significativo en el número de bacterias que colonizan se observó por la infiltración de *Agrobacterium* que lleva un vector vacío (datos no mostrados), la construcción de eJMC (de acuerdo con la noción de que *Agrobacterium* flagelina no es reconocida por el ectodominio FLS2), WAK1 o WEG. Por el contrario, la expresión de cualquiera de EFR o EWAK se asoció a una disminución de 30% del número de colonias de *Agrobacterium*. Este resultado indica que la activación mediada por elfl8 del dominio quinasa de WAK1 de EWAK desencadena una respuesta de defensa que afecta a la supervivencia bacteriana. En conjunto, nuestros resultados muestran que WAK1 es capaz de percibir OG y la activación de una cascada de transducción de señales que conduce a la activación de las respuestas de defensa. Esto apoya firmemente la función propuesta de la familia de receptores de WAK en las interacciones planta-patógeno. De hecho, se sabe que WAK1 es inducido por ácido salicílico (Park et al., 2001), cuya sobreexpresión en arroz OsWAK1 mejora la resistencia de las plantas contra el hongo del añublo *Magnaporthe oryzae* (Li et al., 2009), y que WAKL22, que comparte el 45% de identidad y más del 65% de similitud con WAK1, es una proteína de resistencia a enfermedades dominantes que confiere resistencia a un amplio espectro de razas de *Fusarium* [resistencia a *Fusarium oxysporium* 1 (RFO1); (Diener & Ausubel 2005)]. Vale la pena señalar que WAK1 es el único miembro de la familia WAK que muestra una inducción significativa de la correspondiente transcripción en respuesta a OG (alrededor de 2 veces en 1 y 3 h), y la represión por flg22 (3 h). Por lo tanto, WAK1, de manera similar a lo que se ha demostrado para FLS2 y EFR, está sobre-regulado en la percepción de su propio ligando.

Los autores mostraron que la expresión constitutiva de los receptores quiméricos confiere resistencia a ambos patógenos fúngicos y bacterianos (*B. cinerea* para plantas WEG; *P. syringae* para plantas EWAK; *P. carotovorum* para plantas WEG y EWAK), lo que indica el gran potencial de la presente invención para conferir resistencia de amplio espectro.

45 En conclusión, los autores han demostrado la versatilidad de un enfoque receptor quimérico basado en EFR. Este enfoque, aplicado inicialmente en LRR-RKS, permitió la caracterización de WAK1, un receptor de quinasa no LRR, como receptor de OG. Los autores proponen el diseño del receptor quimérico de la invención para la caracterización de los muchos receptores de plantas que no tienen función conocida.

Bibliografía

- Afzal AJ, Wood AJ, Lightfoot DA (2008) *Mol Plant Microbe Interact* 21: 507-517
- Ali GS, Prasad KV, Day dl, Reddy AS (2007) *Plant Cell Physiol* 48: 1601-1611
- Bauer et al., (2001) *Journal of Biological Chemistry* 276:45669-45676
- 5 Bellincampi D, et al., (1996) *Plant Cell* 8: 477-487
- Bennasroune A, et al., (2005) *Cell Mol Life Sci* 62: 2124-2131
- Bocharov EV, et al., (2008) *J Biol Chem* 283: 6950-6956
- Boller T, Felix G.(2009) *Annu Rev Plant Biol.*;60:379-406.
- Brownlee C (2002) *Curr Opin Plant Biol* 5: 396-401
- 10 Cabrera JC, et al., (2008) *Glycobiology* 18: 473-482
- Cao Y, Ding X, Cai M, Zhao J, Lin Y, Li X, Xu C, Wang S (2007a) *Genetics* 177: 523-533
- Cao Y, et al., (2007b) *Theor Appl Genet* 115: 887-895
- Casasoli M, et al., (2008) *Proteomics* 8: 1042-1054
- Casasoli M et al. (2009) *PNAS* 106:7666-7671
- 15 Cervone F, et al., P (1989) In BJJ Lugtenberg, ed *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. NATO ASI Series, Volumen H36. Springer Verlag, Heidelberg, FRG, pp 85-89
- Chen YG (2009) *Cell Res* 19: 58-70
- Chinchilla D, et al., (2007) *Nature* 448: 497-500
- Constantinescu SN, et al., (2001) *PNAS* 98: 4379-4384
- 20 Decreux A, Messiaen J (2005) *Plant Cell Physiol* 46: 268-278
- Denoux C, et al., (2008) *Molecular Plant* 1: 423-445
- Diener AC, Ausubel FM (2005) *Genetics* 171: 305-321
- Ferrari S, et al., (2007) *Plant Physiol* 144: 367-379
- Ferrari S, et al., (2008) *Plant Physiol* 146: 669-681
- 25 Forrer P, Stumpp MT, Binz HK, Pluckthun A (2003) *FEBS Lett* 539: 2-6
- Galletti R et al. (2008) *Plant Physiol* 148:1695-1706
- Gardan L., et al., 2003. *Int J System Evol Microbiol* 53: 381-391.
- Geldner N, Robatzek S (2008) *Plant Physiol* 147: 1565-1574
- Gomez-Gomez L, et al., (1999) *Plant J.* 18:277-284
- 30 Hammond DE, Urbe S, Woude GFV, Clague MJ (2001) *Oncogene* 20: 2761-2770
- He Z, Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C, Ronald P, Chory J (2000) *Science* 288: 2360-2363
- He ZH, Fujiki M, Kohorn BD (1996) *J Biol Chem* 271: 19789-19793
- He ZH, He DZ, Kohorn BD (1998) *Plant Journal* 14: 55-63
- Henriksen L, et al., (2008) *Apmis* 116: 431
- 35 Husebye H, et al., (2006) *EMBO J* 25: 683-692
- Jemth P, Gianni S., (2007) *Biochemistry* 46(30):8701-8.
- Jiang D, et al., (2007) *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23:435-461

- Kohorn BD (2000) *Plant Physiol* 124: 31-38
- Kohorn BD, et al., (2006a) *J Cell Sci* 119: 2282-2290
- Kohorn BD, et al., (2006b) *Plant Journal* 46: 307-316
- Lacombe D, et al., (2010) *Nature Biotechnology* 28:365-369
- 5 Lally D, Ingmire P, Tong HY, He ZH (2001) *Plant Cell* 13: 1317-1331
- Larkin M.A., et al., (2007) *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Li H, Zhou SY, Zhao WS, Su SC, Peng YL (2009) *Plant Mol Biol*, en prensa
- Lord EM (2003) *Journal of Experimental Botany* 54: 47-54
- Mauro ML, De Lorenzo G, Costantino P, Bellincampi D (2002) *Planta* 215: 494-501
- 10 Mendrola JM, Berger MB, King MC, Lemmon MA (2002) *J Biol Chem* 277: 4704-4712
- Micheli F (2001) *Trends Plant Sci* 6: 414-419
- Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN (2001) *J Mol Biol* 311: 1011-1026
- Nam KH, Li J (2002) *Cell* 110: 203-212
- Oh MH, et al., (2000) *Plant Physiol* 124: 751-766
- 15 Park AR, et al., (2001) *J Biol Chem* 276: 26688-26693
- Pilling J, Willmitzer L, Bucking H, Fisahn J (2004) *Planta* 219: 32-40
- Rairdan GJ, Moffett P (2006) *Plant Cell* 18: 2082-2093
- Reca IB, et al., (2008) *Biochimie* 90: 1611-1623
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) *Phytochemistry* 57: 929-967
- 20 Robatzek S, et al., (2007) *Plant Mol Biol* 64: 539-547
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T (2006) *Genes Dev* 20: 537-542
- Roepstorff K, et al., (2008) *Histochem Cell Biol* 129: 563-578
- Sanabria N, Goring D, Nurnberger T, Dubery I (2008) *New Phytol* 178: 503-513
- Shiu SH, et al., (2004) *Plant Cell* 16: 1220-1234
- 25 Spadoni S, et al., (2006) *Plant Physiol* 141: 557-564
- Stenzel I, et al., (2008) *Plant Cell* 20: 124-141
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006) *Eur J Cell Biol* 85: 699-715
- Tauszig S, et al., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10520-10525
- Taylor KR, Gallo RL (2006) *FASEB J* 20: 10-20
- 30 Tsujita T, et al., (2004) *J Biol Chem* 279: 48588-48597
- Van der Hooft RA, et al., (2005) *Plant Cell* 17: 1000-1015
- Verica JA, Chae L, Tong HY, Ingmire P, He ZH (2003) *Plant Physiol* 133: 1732-1746
- Verica JA, He ZH (2002) *Plant Physiol* 129: 455-459
- Vorwerk S, Somerville S, Somerville C (2004) *Trends Plant Sci* 9: 203-209
- 35 Wagner TA, Kohorn BD (2001) *Plant Cell* 13: 303-318
- Weber AN, et al., (2005) *J Biol Chem* 280: 22793-22799
- Wulff BB, Thomas CM, Smoker M, Grant M, Jones JD (2001) *Plant Cell* 13: 255-272

Zipfel C (2008) *Curr Opin Immunol* 20: 10-16

Zipfel C, et al., (2006) *Cell* 125: 749-760

Zipfel C, et al., (2004) *Nature* 428: 764-767

Listado de secuencias

<110> UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

- 5 <120> Construcciones que expresan receptores quiméricos y su uso para la activación controlada de la respuesta defensiva frente a patógenos en plantas
 <130> PCT 109424
- 10 <150> RM2009A000279
 <151> 04-06-2009
 <160> 32
- 15 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
- 25 <400> 1
 atgcgatcc atgaagttac tctca 25
 <210> 2
 30 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 2
 gcatgtacc ctacctagga acttctcgat cc 32
 40 <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 50 atgcgatcc atgaagctgt cctttc 27
 <210> 4
 <211> 29
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 4
 atcggaatcc atgaagctgt cctttcac 29
 65 <210> 5
 <211> 32

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 5

 10 gcatggtacc ctacctaggg catactatgt ag 32

 <210> 6
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador

 <400> 6
 20 attcttgat cagccgggc tctttgta atcataattg t 41

 <210> 7
 <211> 41
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 30
 <400> 7

 acaattatga ttaacaaaag agccgaggct gatccaagaa t 41
 35 <210> 8
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador

 <400> 8
 45 ttctcgaaga gaaccagagt tgcagtggt attgtatag 40

 <210> 9
 <211> 40
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 9

 ctatacaaat accactgaca actctggtc tcttcgagaa 40
 60 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> cebador

<400> 10
 atgcgaatcc atgaaggtgc aggaggg 27

5 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador
 <400> 11

15 atgcccggga tgaaggtgca ggaggg 26
 <210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

25 <400> 12
 gcatggtacc ctacctaggg cggccagttt caatg 35
 <210> 13
 30 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 13

40 ctgcaagcgt aaagagttg cagttgacag tggatttgt at 42
 <210> 14
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador
 <400> 14

50 atacaatac cactgacaac tgcaactct ttacgcttgc ag 42
 <210> 15
 <211> 42
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

60 <400> 15
 gcctctgtca gttagaaga aatggactac aattcttct gg 42

65 <210> 16
 <211> 42

ES 2 582 627 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 16

 10 ccaagaagaa ttgtagtcca ttcttcta actgacagag gc 42

 <210> 17
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador

 <400> 17
 20 cttggggat gttccatgag aaggtaatg ctgaagagct tcatag 46

 <210> 18
 <211> 47
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 30
 <400> 18

 ctatgaagct cttcagcact taccttcta tggaaatcc ccaaag 47
 35 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> cebador

 <400> 19
 45 ggaagaagaa gacttacacc 20

 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 20
 55 agtccacact taccacagta 20

 <210> 21
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> cebador

ES 2 582 627 T3

<400> 21
 cgaaccctaa caacaaaaac 20

5 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador
 <400> 22

15 gacgacacgt aagaaagtcc 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

25 <400> 23
 gtgaaagcac taggcgaagc 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

35 <400> 24
 atccgttcca gctagcatca 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

45 <400> 25
 tcgctggcat aacctatgg 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN

50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

55 <400> 26
 ttgggagcaa gaggagtt 20
 <210> 27
 <211> 22

ES 2 582 627 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> péptido flg22 sintético

<400> 27

Gln Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15

Ala Gly Leu Gln Ile Ala
20

10 <210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> elf18 sintético

<400> 28

20 Ser Lys Glu Lys Phe Glu Arg Thr Lys Pro His Val Asn Val Gly Thr
1 5 10 15

Ile Gly

<210> 29
<211> 6
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido control sintético

30 <400> 29

Glu Gln Val Ser Ala Val
1 5

35 <210> 30
<211> 1173
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

40 <400> 30

ES 2 582 627 T3

Met Lys Leu Leu Ser Lys Thr Phe Leu Ile Leu Thr Leu Thr Phe Phe
 1 5 10 15

Phe Phe Gly Ile Ala Leu Ala Lys Gln Ser Phe Glu Pro Glu Ile Glu
 20 25 30

Ala Leu Lys Ser Phe Lys Asn Gly Ile Ser Asn Asp Pro Leu Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asp Trp Thr Ile Ile Gly Ser Leu Arg His Cys Asn Trp Thr
 50 55 60

Gly Ile Thr Cys Asp Ser Thr Gly His Val Val Ser Val Ser Leu Leu
 65 70 75 80

Glu Lys Gln Leu Glu Gly Val Leu Ser Pro Ala Ile Ala Asn Leu Thr
 85 90 95

Tyr Leu Gln Val Leu Asp Leu Thr Ser Asn Ser Phe Thr Gly Lys Ile
 100 105 110

Pro Ala Glu Ile Gly Lys Leu Thr Glu Leu Asn Gln Leu Ile Leu Tyr
 115 120 125

Leu Asn Tyr Phe Ser Gly Ser Ile Pro Ser Gly Ile Trp Glu Leu Lys
 130 135 140

Asn Ile Phe Tyr Leu Asp Leu Arg Asn Asn Leu Leu Ser Gly Asp Val
 145 150 155 160

Pro Glu Glu Ile Cys Lys Thr Ser Ser Leu Val Leu Ile Gly Phe Asp
 165 170 175

ES 2 582 627 T3

Tyr Asn Asn Leu Thr Gly Lys Ile Pro Glu Cys Leu Gly Asp Leu Val
 180 185 190

His Leu Gln Met Phe Val Ala Ala Gly Asn His Leu Thr Gly Ser Ile
 195 200 205

Pro Val Ser Ile Gly Thr Leu Ala Asn Leu Thr Asp Leu Asp Leu Ser
 210 215 220

Gly Asn Gln Leu Thr Gly Lys Ile Pro Arg Asp Phe Gly Asn Leu Leu
 225 230 235 240

Asn Leu Gln Ser Leu Val Leu Thr Glu Asn Leu Leu Glu Gly Asp Ile
 245 250 255

Pro Ala Glu Ile Gly Asn Cys Ser Ser Leu Val Gln Leu Glu Leu Tyr
 260 265 270

Asp Asn Gln Leu Thr Gly Lys Ile Pro Ala Glu Leu Gly Asn Leu Val
 275 280 285

Gln Leu Gln Ala Leu Arg Ile Tyr Lys Asn Lys Leu Thr Ser Ser Ile
 290 295 300

Pro Ser Ser Leu Phe Arg Leu Thr Gln Leu Thr His Leu Gly Leu Ser
 305 310 315 320

Glu Asn His Leu Val Gly Pro Ile Ser Glu Glu Ile Gly Phe Leu Glu
 325 330 335

Ser Leu Glu Val Leu Thr Leu His Ser Asn Asn Phe Thr Gly Glu Phe
 340 345 350

Pro Gln Ser Ile Thr Asn Leu Arg Asn Leu Thr Val Leu Thr Val Gly
 355 360 365

Phe Asn Asn Ile Ser Gly Glu Leu Pro Ala Asp Leu Gly Leu Leu Thr
 370 375 380

Asn Leu Arg Asn Leu Ser Ala His Asp Asn Leu Leu Thr Gly Pro Ile
 385 390 395 400

Pro Ser Ser Ile Ser Asn Cys Thr Gly Leu Lys Leu Leu Asp Leu Ser
 405 410 415

ES 2 582 627 T3

His Asn Gln Met Thr Gly Glu Ile Pro Arg Gly Phe Gly Arg Met Asn
 420 425 430

Leu Thr Phe Ile Ser Ile Gly Arg Asn His Phe Thr Gly Glu Ile Pro
 435 440 445

Asp Asp Ile Phe Asn Cys Ser Asn Leu Glu Thr Leu Ser Val Ala Asp
 450 455 460

Asn Asn Leu Thr Gly Thr Leu Lys Pro Leu Ile Gly Lys Leu Gln Lys
 465 470 475 480

Leu Arg Ile Leu Gln Val Ser Tyr Asn Ser Leu Thr Gly Pro Ile Pro
 485 490 495

Arg Glu Ile Gly Asn Leu Lys Asp Leu Asn Ile Leu Tyr Leu His Ser
 500 505 510

Asn Gly Phe Thr Gly Arg Ile Pro Arg Glu Met Ser Asn Leu Thr Leu
 515 520 525

Leu Gln Gly Leu Arg Met Tyr Ser Asn Asp Leu Glu Gly Pro Ile Pro
 530 535 540

Glu Glu Met Phe Asp Met Lys Leu Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Asn
 545 550 555 560

Asn Lys Phe Ser Gly Gln Ile Pro Ala Leu Phe Ser Lys Leu Glu Ser
 565 570 575

Leu Thr Tyr Leu Ser Leu Gln Gly Asn Lys Phe Asn Gly Ser Ile Pro
 580 585 590

Ala Ser Leu Lys Ser Leu Ser Leu Leu Asn Thr Phe Asp Ile Ser Asp
 595 600 605

Asn Leu Leu Thr Gly Thr Ile Pro Gly Glu Leu Leu Ala Ser Leu Lys
 610 615 620

Asn Met Gln Leu Tyr Leu Asn Phe Ser Asn Asn Leu Leu Thr Gly Thr
 625 630 635 640

Ile Pro Lys Glu Leu Gly Lys Leu Glu Met Val Gln Glu Ile Asp Leu
 645 650 655

ES 2 582 627 T3

Ser Asn Asn Leu Phe Ser Gly Ser Ile Pro Arg Ser Leu Gln Ala Cys
660 665 670

Lys Asn Val Phe Thr Leu Asp Phe Ser Gln Asn Asn Leu Ser Gly His
675 680 685

Ile Pro Asp Glu Val Phe Gln Gly Met Asp Met Ile Ile Ser Leu Asn
690 695 700

Leu Ser Arg Asn Ser Phe Ser Gly Glu Ile Pro Gln Ser Phe Gly Asn
705 710 715 720

Met Thr His Leu Val Ser Leu Asp Leu Ser Ser Asn Asn Leu Thr Gly
725 730 735

Glu Ile Pro Glu Ser Leu Ala Asn Leu Ser Thr Leu Lys His Leu Lys
740 745 750

Leu Ala Ser Asn Asn Leu Lys Gly His Val Pro Glu Ser Gly Val Phe
755 760 765

Lys Asn Ile Asn Ala Ser Asp Leu Met Gly Asn Thr Asp Leu Cys Gly
770 775 780

Ser Lys Lys Pro Leu Lys Pro Cys Thr Ile Lys Gln Lys Ser Ser His
785 790 795 800

Phe Ser Lys Arg Thr Arg Val Ile Leu Ile Ile Leu Gly Ser Ala Ala
805 810 815

Ala Leu Leu Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ile Leu Thr Cys Cys Lys
820 825 830

Lys Lys Glu Lys Lys Ile Glu Asn Ser Ser Glu Ser Ser Leu Pro Asp
835 840 845

Leu Asp Ser Ala Leu Lys Leu Lys Arg Phe Glu Pro Lys Glu Leu Glu
850 855 860

Gln Ala Thr Asp Ser Phe Asn Ser Ala Asn Ile Ile Gly Ser Ser Ser
865 870 875 880

Leu Ser Thr Val Tyr Lys Gly Gln Leu Glu Asp Gly Thr Val Ile Ala
885 890 895

Val Lys Val Leu Asn Leu Lys Glu Phe Ser Ala Glu Ser Asp Lys Trp

ES 2 582 627 T3

900	905	910
Phe Tyr Thr Glu Ala Lys Thr Leu Ser Gln Leu Lys His Arg Asn Leu 915 920 925		
Val Lys Ile Leu Gly Phe Ala Trp Glu Ser Gly Lys Thr Lys Ala Leu 930 935 940		
Val Leu Pro Phe Met Glu Asn Gly Asn Leu Glu Asp Thr Ile His Gly 945 950 955 960		
Ser Ala Ala Pro Ile Gly Ser Leu Leu Glu Lys Ile Asp Leu Cys Val 965 970 975		
His Ile Ala Ser Gly Ile Asp Tyr Leu His Ser Gly Tyr Gly Phe Pro 980 985 990		
Ile Val His Cys Asp Leu Lys Pro Ala Asn Ile Leu Leu Asp Ser Asp 995 1000 1005		
Arg Val Ala His Val Ser Asp Phe Gly Thr Ala Arg Ile Leu Gly 1010 1015 1020		
Phe Arg Glu Asp Gly Ser Thr Thr Ala Ser Thr Ser Ala Phe Glu 1025 1030 1035		
Gly Thr Ile Gly Tyr Leu Ala Pro Glu Phe Ala Tyr Met Arg Lys 1040 1045 1050		
Val Thr Thr Lys Ala Asp Val Phe Ser Phe Gly Ile Ile Met Met 1055 1060 1065		
Glu Leu Met Thr Lys Gln Arg Pro Thr Ser Leu Asn Asp Glu Asp 1070 1075 1080		
Ser Gln Asp Met Thr Leu Arg Gln Leu Val Glu Lys Ser Ile Gly 1085 1090 1095		
Asn Gly Arg Lys Gly Met Val Arg Val Leu Asp Met Glu Leu Gly 1100 1105 1110		
Asp Ser Ile Val Ser Leu Lys Gln Glu Glu Ala Ile Glu Asp Phe 1115 1120 1125		
Leu Lys Leu Cys Leu Phe Cys Thr Ser Ser Arg Pro Glu Asp Arg 1130 1135 1140		
Pro Asp Met Asn Glu Ile Leu Thr His Leu Met Lys Leu Arg Gly 1145 1150 1155		
Lys Ala Asn Ser Phe Arg Glu Asp Arg Asn Glu Asp Arg Glu Val 1160 1165 1170		

5 <210> 31
 <211> 1031
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

ES 2 582 627 T3

<400> 31

Met Lys Leu Ser Phe Ser Leu Val Phe Asn Ala Leu Thr Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Val Cys Ile Phe Ala Gln Ala Arg Phe Ser Asn Glu Thr Asp Met
 20 25 30

Gln Ala Leu Leu Glu Phe Lys Ser Gln Val Ser Glu Asn Asn Lys Arg
 35 40 45

Glu Val Leu Ala Ser Trp Asn His Ser Ser Pro Phe Cys Asn Trp Ile
 50 55 60

Gly Val Thr Cys Gly Arg Arg Arg Glu Arg Val Ile Ser Leu Asn Leu
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Lys Leu Thr Gly Val Ile Ser Pro Ser Ile Gly Asn Leu
 85 90 95

Ser Phe Leu Arg Leu Leu Asn Leu Ala Asp Asn Ser Phe Gly Ser Thr
 100 105 110

Ile Pro Gln Lys Val Gly Arg Leu Phe Arg Leu Gln Tyr Leu Asn Met
 115 120 125

Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Gly Arg Ile Pro Ser Ser Leu Ser Asn Cys
 130 135 140

Ser Arg Leu Ser Thr Val Asp Leu Ser Ser Asn His Leu Gly His Gly
 145 150 155 160

Val Pro Ser Glu Leu Gly Ser Leu Ser Lys Leu Ala Ile Leu Asp Leu
 165 170 175

5

ES 2 582 627 T3

Ser Lys Asn Asn Leu Thr Gly Asn Phe Pro Ala Ser Leu Gly Asn Leu
 180 185 190

Thr Ser Leu Gln Lys Leu Asp Phe Ala Tyr Asn Gln Met Arg Gly Glu
 195 200 205

Ile Pro Asp Glu Val Ala Arg Leu Thr Gln Met Val Phe Phe Gln Ile
 210 215 220

Ala Leu Asn Ser Phe Ser Gly Gly Phe Pro Pro Ala Leu Tyr Asn Ile
 225 230 235 240

Ser Ser Leu Glu Ser Leu Ser Leu Ala Asp Asn Ser Phe Ser Gly Asn
 245 250 255

Leu Arg Ala Asp Phe Gly Tyr Leu Leu Pro Asn Leu Arg Arg Leu Leu
 260 265 270

Leu Gly Thr Asn Gln Phe Thr Gly Ala Ile Pro Lys Thr Leu Ala Asn
 275 280 285

Ile Ser Ser Leu Glu Arg Phe Asp Ile Ser Ser Asn Tyr Leu Ser Gly
 290 295 300

Ser Ile Pro Leu Ser Phe Gly Lys Leu Arg Asn Leu Trp Trp Leu Gly
 305 310 315 320

Ile Arg Asn Asn Ser Leu Gly Asn Asn Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe
 325 330 335

Ile Gly Ala Val Ala Asn Cys Thr Gln Leu Glu Tyr Leu Asp Val Gly
 340 345 350

Tyr Asn Arg Leu Gly Gly Glu Leu Pro Ala Ser Ile Ala Asn Leu Ser
 355 360 365

Thr Thr Leu Thr Ser Leu Phe Leu Gly Gln Asn Leu Ile Ser Gly Thr
 370 375 380

Ile Pro His Asp Ile Gly Asn Leu Val Ser Leu Gln Glu Leu Ser Leu
 385 390 395 400

Glu Thr Asn Met Leu Ser Gly Glu Leu Pro Val Ser Phe Gly Lys Leu
 405 410 415

Leu Asn Leu Gln Val Val Asp Leu Tyr Ser Asn Ala Ile Ser Gly Glu

ES 2 582 627 T3

420 425 430

Ile Pro Ser Tyr Phe Gly Asn Met Thr Arg Leu Gln Lys Leu His Leu
435 440 445

Asn Ser Asn Ser Phe His Gly Arg Ile Pro Gln Ser Leu Gly Arg Cys
450 455 460

Arg Tyr Leu Leu Asp Leu Trp Met Asp Thr Asn Arg Leu Asn Gly Thr
465 470 475 480

Ile Pro Gln Glu Ile Leu Gln Ile Pro Ser Leu Ala Tyr Ile Asp Leu
485 490 495

Ser Asn Asn Phe Leu Thr Gly His Phe Pro Glu Glu Val Gly Lys Leu
500 505 510

Glu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ala Ser Tyr Asn Lys Leu Ser Gly Lys
515 520 525

Met Pro Gln Ala Ile Gly Gly Cys Leu Ser Met Glu Phe Leu Phe Met
530 535 540

Gln Gly Asn Ser Phe Asp Gly Ala Ile Pro Asp Ile Ser Arg Leu Val
545 550 555 560

Ser Leu Lys Asn Val Asp Phe Ser Asn Asn Asn Leu Ser Gly Arg Ile
565 570 575

Pro Arg Tyr Leu Ala Ser Leu Pro Ser Leu Arg Asn Leu Asn Leu Ser
580 585 590

Met Asn Lys Phe Glu Gly Arg Val Pro Thr Thr Gly Val Phe Arg Asn
595 600 605

Ala Thr Ala Val Ser Val Phe Gly Asn Thr Asn Ile Cys Gly Gly Val
610 615 620

Arg Glu Met Gln Leu Lys Pro Cys Ile Val Gln Ala Ser Pro Arg Lys
625 630 635 640

Arg Lys Pro Leu Ser Val Arg Lys Lys Val Val Ser Gly Ile Cys Ile
645 650 655

Gly Ile Ala Ser Leu Leu Leu Ile Ile Ile Val Ala Ser Leu Cys Trp
660 665 670

ES 2 582 627 T3

Phe Met Lys Arg Lys Lys Lys Asn Asn Ala Ser Asp Gly Asn Pro Ser
 675 680 685

Asp Ser Thr Thr Leu Gly Met Phe His Glu Lys Val Ser Tyr Glu Glu
 690 695 700

Leu His Ser Ala Thr Ser Arg Phe Ser Ser Thr Asn Leu Ile Gly Ser
 705 710 715 720

Gly Asn Phe Gly Asn Val Phe Lys Gly Leu Leu Gly Pro Glu Asn Lys
 725 730 735

Leu Val Ala Val Lys Val Leu Asn Leu Leu Lys His Gly Ala Thr Lys
 740 745 750

Ser Phe Met Ala Glu Cys Glu Thr Phe Lys Gly Ile Arg His Arg Asn
 755 760 765

Leu Val Lys Leu Ile Thr Val Cys Ser Ser Leu Asp Ser Glu Gly Asn
 770 775 780

Asp Phe Arg Ala Leu Val Tyr Glu Phe Met Pro Lys Gly Ser Leu Asp
 785 790 795 800

Met Trp Leu Gln Leu Glu Asp Leu Glu Arg Val Asn Asp His Ser Arg
 805 810 815

Ser Leu Thr Pro Ala Glu Lys Leu Asn Ile Ala Ile Asp Val Ala Ser
 820 825 830

Ala Leu Glu Tyr Leu His Val His Cys His Asp Pro Val Ala His Cys
 835 840 845

Asp Ile Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Asp Asp Leu Thr Ala His
 850 855 860

Val Ser Asp Phe Gly Leu Ala Gln Leu Leu Tyr Lys Tyr Asp Arg Glu
 865 870 875 880

Ser Phe Leu Asn Gln Phe Ser Ser Ala Gly Val Arg Gly Thr Ile Gly
 885 890 895

Tyr Ala Ala Pro Glu Tyr Gly Met Gly Gly Gln Pro Ser Ile Gln Gly
 900 905 910

ES 2 582 627 T3

Asp Val Tyr Ser Phe Gly Ile Leu Leu Leu Glu Met Phe Ser Gly Lys
 915 920 925

Lys Pro Thr Asp Glu Ser Phe Ala Gly Asp Tyr Asn Leu His Ser Tyr
 930 935 940

Thr Lys Ser Ile Leu Ser Gly Cys Thr Ser Ser Gly Gly Ser Asn Ala
 945 950 955 960

Ile Asp Glu Gly Leu Arg Leu Val Leu Gln Val Gly Ile Lys Cys Ser
 965 970 975

Glu Glu Tyr Pro Arg Asp Arg Met Arg Thr Asp Glu Ala Val Arg Glu
 980 985 990

Leu Ile Ser Ile Arg Ser Lys Phe Phe Ser Ser Lys Thr Thr Ile Thr
 995 1000 1005

Glu Ser Pro Arg Asp Ala Pro Gln Ser Ser Pro Gln Glu Trp Met
 1010 1015 1020

Leu Asn Thr Asp Met His Thr Met
 1025 1030

<210> 32

<211> 735

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 32

Met Lys Val Gln Glu Gly Leu Phe Leu Val Ala Ile Phe Phe Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Cys Thr Gln Leu Val Lys Gly Gln His Gln Pro Gly Glu Asn Cys
 20 25 30

Gln Asn Lys Cys Gly Asn Ile Thr Ile Glu Tyr Pro Phe Gly Ile Ser
 35 40 45

Ser Gly Cys Tyr Tyr Pro Gly Asn Glu Ser Phe Ser Ile Thr Cys Lys
 50 55 60

Glu Asp Arg Pro His Val Leu Ser Asp Ile Glu Val Ala Asn Phe Asn
 65 70 75 80

10 His Ser Gly Gln Leu Gln Val Leu Leu Asn Arg Ser Ser Thr Cys Tyr

ES 2 582 627 T3

Ile Leu Leu Val Thr Thr Ile Gly Phe Leu Val Ile Leu Leu Gly Val
 340 345 350

Ala Cys Ile Gln Gln Arg Met Lys His Leu Lys Asp Thr Lys Leu Arg
 355 360 365

Glu Gln Phe Phe Glu Gln Asn Gly Gly Gly Met Leu Thr Gln Arg Leu
 370 375 380

Ser Gly Ala Gly Pro Ser Asn Val Asp Val Lys Ile Phe Thr Glu Asp
 385 390 395 400

Gly Met Lys Lys Ala Thr Asn Gly Tyr Ala Glu Ser Arg Ile Leu Gly
 405 410 415

Gln Gly Gly Gln Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Leu Pro Asp Asn Ser
 420 425 430

Ile Val Ala Ile Lys Lys Ala Arg Leu Gly Asp Ser Ser Gln Val Glu
 435 440 445

Gln Phe Ile Asn Glu Val Leu Val Leu Ser Gln Ile Asn His Arg Asn
 450 455 460

Val Val Lys Leu Leu Gly Cys Cys Leu Glu Thr Glu Val Pro Leu Leu
 465 470 475 480

Val Tyr Glu Phe Ile Thr Asn Gly Thr Leu Phe Asp His Leu His Gly
 485 490 495

Ser Met Ile Asp Ser Ser Leu Thr Trp Glu His Arg Leu Lys Ile Ala
 500 505 510

Ile Glu Val Ala Gly Thr Leu Ala Tyr Leu His Ser Ser Ala Ser Ile
 515 520 525

Pro Ile Ile His Arg Asp Ile Lys Thr Ala Asn Ile Leu Leu Asp Val
 530 535 540

Asn Leu Thr Ala Lys Val Ala Asp Phe Gly Ala Ser Arg Leu Ile Pro
 545 550 555 560

Met Asp Lys Glu Glu Leu Glu Thr Met Val Gln Gly Thr Leu Gly Tyr
 565 570 575

ES 2 582 627 T3

Leu Asp Pro Glu Tyr Tyr Asn Thr Gly Leu Leu Asn Glu Lys Ser Asp
 580 585 590

Val Tyr Ser Phe Gly Val Val Leu Met Glu Leu Leu Ser Gly Gln Lys
 595 600 605

Ala Leu Cys Phe Lys Arg Pro Gln Ser Ser Lys His Leu Val Ser Tyr
 610 615 620

Phe Ala Thr Ala Thr Lys Glu Asn Arg Leu Asp Glu Ile Ile Gly Gly
 625 630 635 640

Glu Val Met Asn Glu Asp Asn Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ala Ala Arg
 645 650 655

Ile Ala Ala Glu Cys Thr Arg Leu Met Gly Glu Glu Arg Pro Arg Met
 660 665 670

Lys Glu Val Ala Ala Lys Leu Glu Ala Leu Arg Val Glu Lys Thr Lys
 675 680 685

His Lys Trp Ser Asp Gln Tyr Pro Glu Glu Asn Glu His Leu Ile Gly
 690 695 700

Gly His Ile Leu Ser Ala Gln Gly Glu Thr Ser Ser Ser Ile Gly Tyr
 705 710 715 720

Asp Ser Ile Lys Asn Val Ala Ile Leu Asp Ile Glu Thr Gly Arg
 725 730 735

REIVINDICACIONES

- 1.** Un constructo capaz de expresarse en al menos un tejido de planta, un receptor quimérico, estando compuesto dicho receptor quimérico de:
- a) la porción extracelular, que comprende la parte yuxtamembrana externa, de un primer receptor quinasa R1;
- 5 b) la porción transmembrana y la porción intracelular, que comprende la parte yuxtamembrana interna, de un segundo receptor de quinasa R2, en donde R1 y R2 son diferentes y
- en donde el primer receptor de quinasa R1 se selecciona entre el grupo de: receptor de FLS2 capaz de reconocer la flagelina bacteriana, receptor de EFR capaz de reconocer el factor de elongación de la transcripción bacteriana o un receptor que pertenece a la familia de quinasas WAK y/o el segundo receptor de quinasa R2 se selecciona a partir
- 10 del grupo de: receptor de EFR, receptor que pertenece a la familia de las quinasas WAK.
- 2.** El constructo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos receptores derivan de *Arabidopsis thaliana*.
- 3.** El constructo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha porción extracelular del receptor de FLS2 o una parte del mismo tiene esencialmente una secuencia compuesta entre aa 1 y aa 806 de la secuencia NCBI, No. NP_199445.1 o una secuencia de aa con un % de identidad de no menos del 70% de dicha secuencia FLS2.
- 15 **4.** El constructo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha porción extracelular del receptor de EFR o una parte del mismo tiene esencialmente una secuencia compuesta de entre 1 aa y 649 aa de la secuencia NCBI, No. NP_197548.1 o una secuencia de aa con un % de identidad de no menos del 70% de dicha secuencia de EFR.
- 5.** El constructo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha región extracelular del receptor de WAK1 o una parte del mismo tiene esencialmente una secuencia compuesta entre 1 aa y 333 aa de la secuencia NCBI, No. NP_564137.1 o una secuencia de aa con un % de identidad de no menos del 70% de dicha secuencia de WAK1.
- 20 **6.** El constructo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho primer receptor de quinasa R1 es capaz de reconocer un ligando derivado de fitopatógenos, liberados o producidos durante la infección.
- 7.** El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la porción intracelular del receptor de EFR tiene esencialmente la secuencia de 650 aa a 1031 aa de la secuencia NCBI, N°. NP_197548.1, o tiene una secuencia de aa con un % de identidad de no menos del 70% de dicha secuencia de EFR.
- 25 **8.** El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la porción intracelular del receptor de WAK1 tiene esencialmente la secuencia de 334 aa a 735 aa de la secuencia NCBI, No. NP_564137.1 o tiene una secuencia de aa con un % de identidad de no menos del 70% de dicha secuencia de WAK1.
- 9.** El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-7, en el que la porción de transmembrana y la porción intracelular, que comprende la región yuxtamembrana interna de EFR está fusionada con la porción extracelular de WAK1 o FLS2 o de un receptor capaz de reconocer un ligando derivado de fitopatógenos, liberados o producidos durante la infección.
- 30 **10.** El constructo de acuerdo con la reivindicación 1-2, 4, 6 ó 8, en el que la porción de transmembrana y la porción intracelular, que comprende la región yuxtamembrana interna de WAK1 se fusiona con la porción extracelular de EFR o de un receptor capaz de reconocer un ligando derivado de fitopatógenos, liberados o producidos durante la infección.
- 35 **11.** El uso del constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para transformar plantas, o tejidos de plantas o células de plantas tanto temporalmente como establemente.
- 12.** Plantas o sus partes que comprenden las construcciones quiméricas de acuerdo con las reivindicaciones anteriores de 1 a 10.
- 40 **13.** Las plantas de acuerdo con la reivindicación 12 que son resistentes a patógenos fúngicos y/o bacterianos.

A

FLS2



EFR



Ala817_{FLS2}-Leu661_{EFR}

TMC



Arg806_{FLS2}-Val650_{EFR}

eJMC



B

EFR	650	VVSGEGIGIA SLLLIIIVASLQWEM	674
FLS2	807	VILLIILGSA AALLVLLLVLIIITCC	831
BAK-1	225	GALAGGVAAGAALLFAVPATAIAW	249
ErbB1	643	IPSIATG IVGALLLLLWVALGIGLF	667

Fig. 1

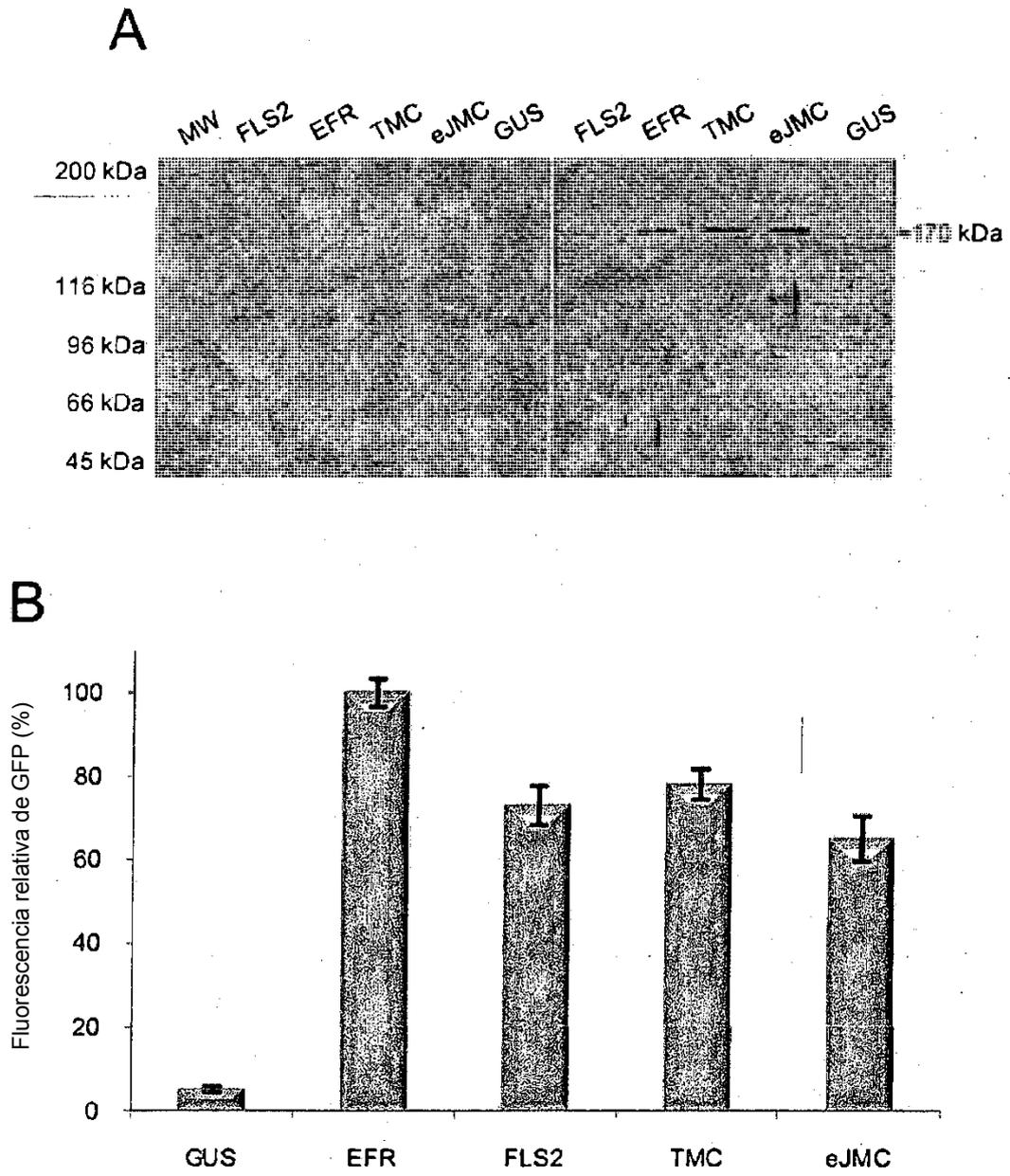
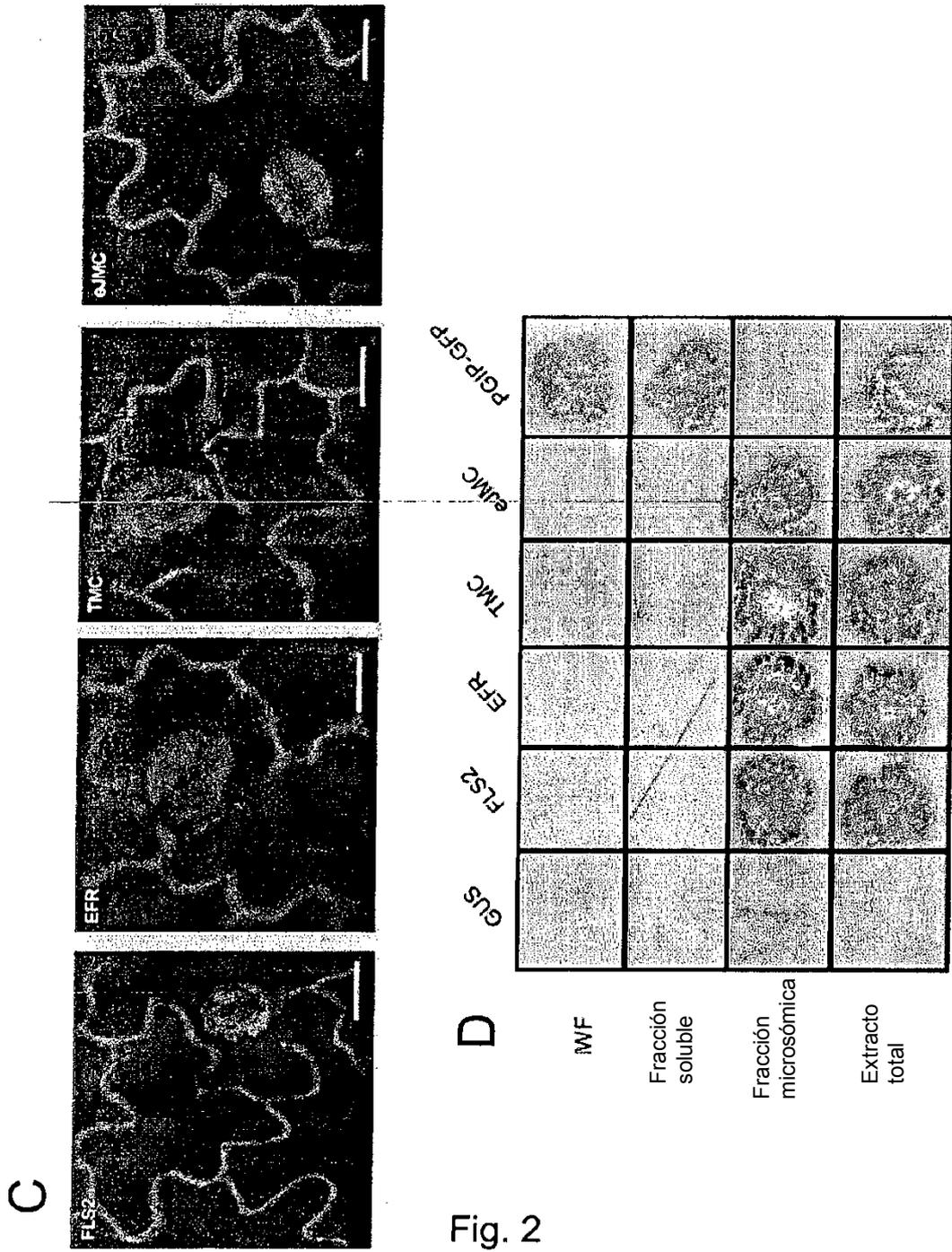


Fig. 2



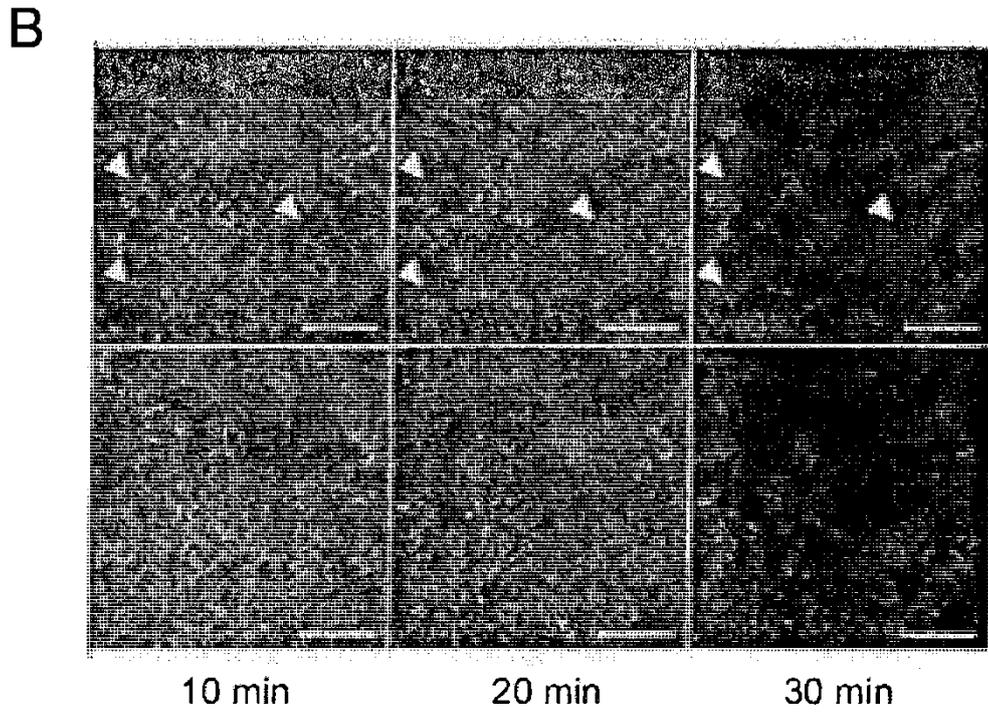
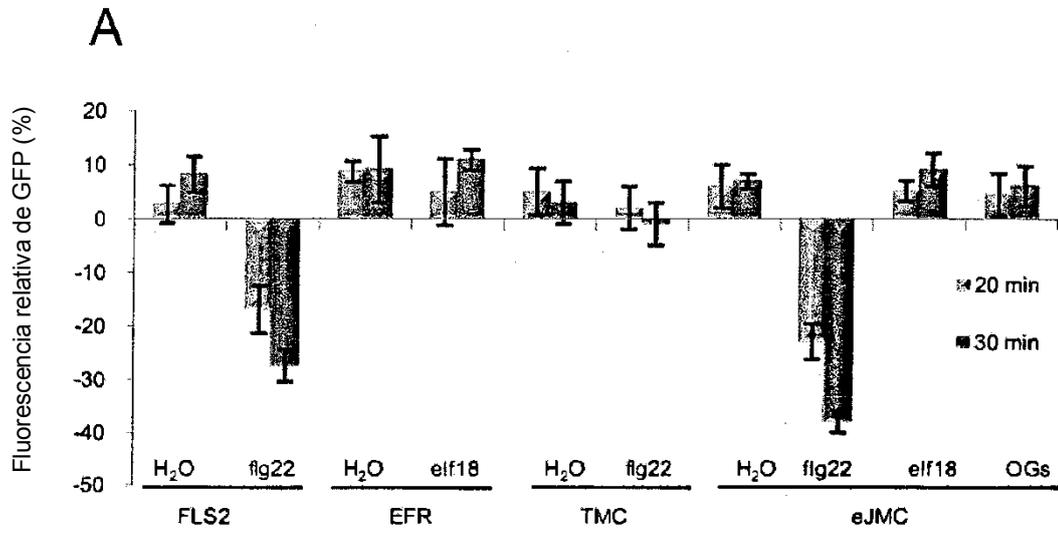


Fig. 3

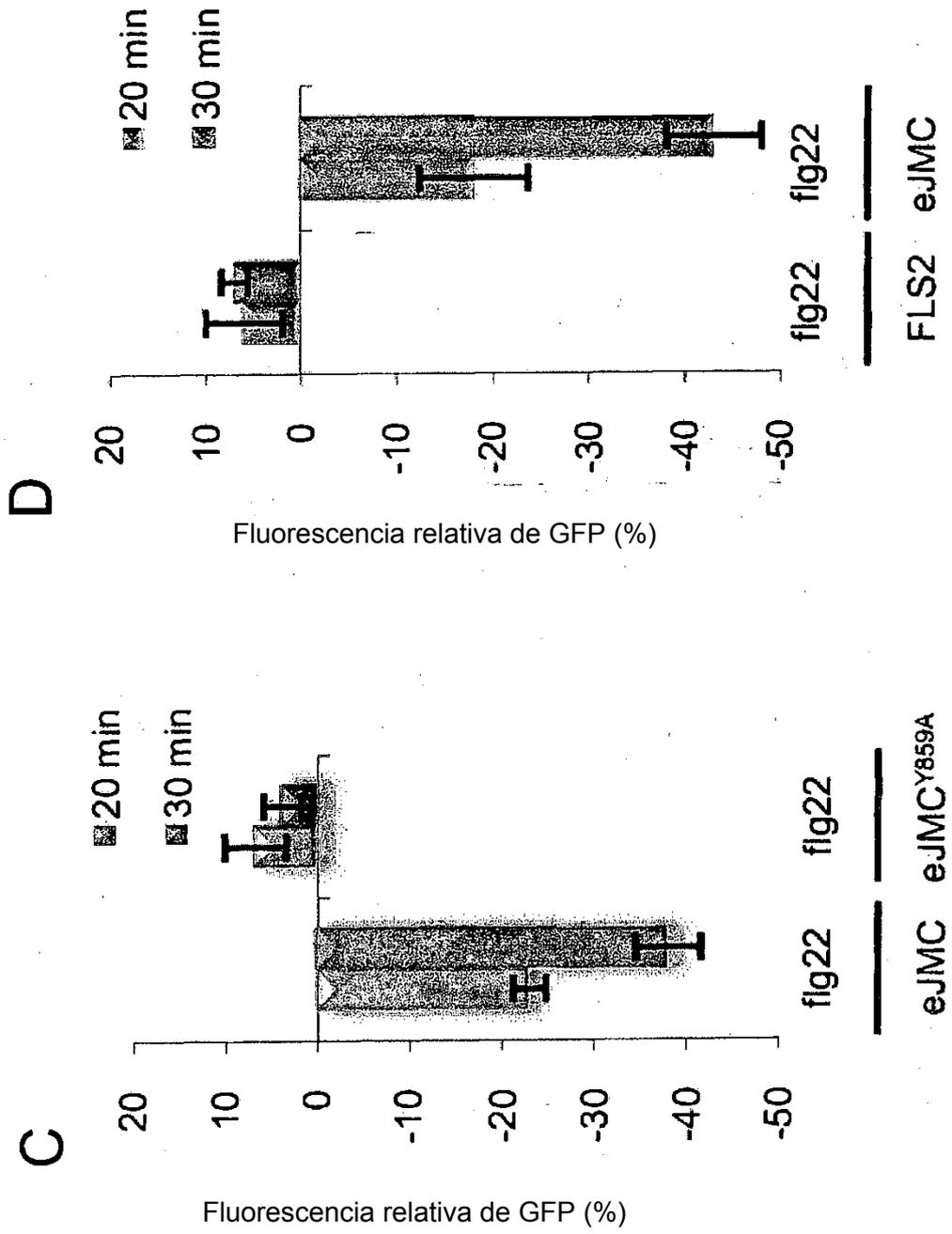


Fig. 3

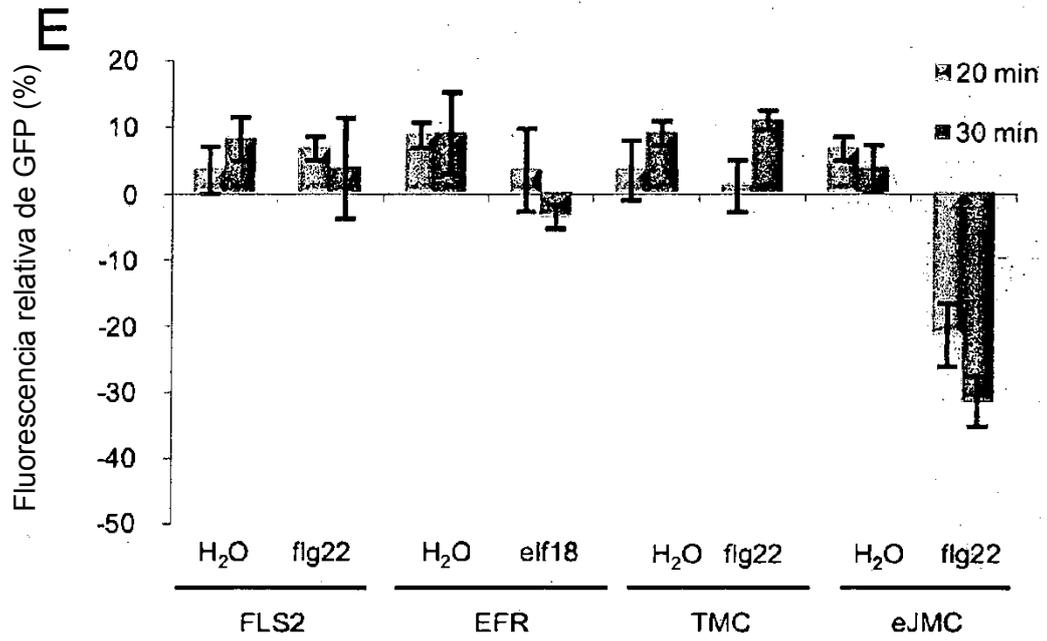


Fig. 3

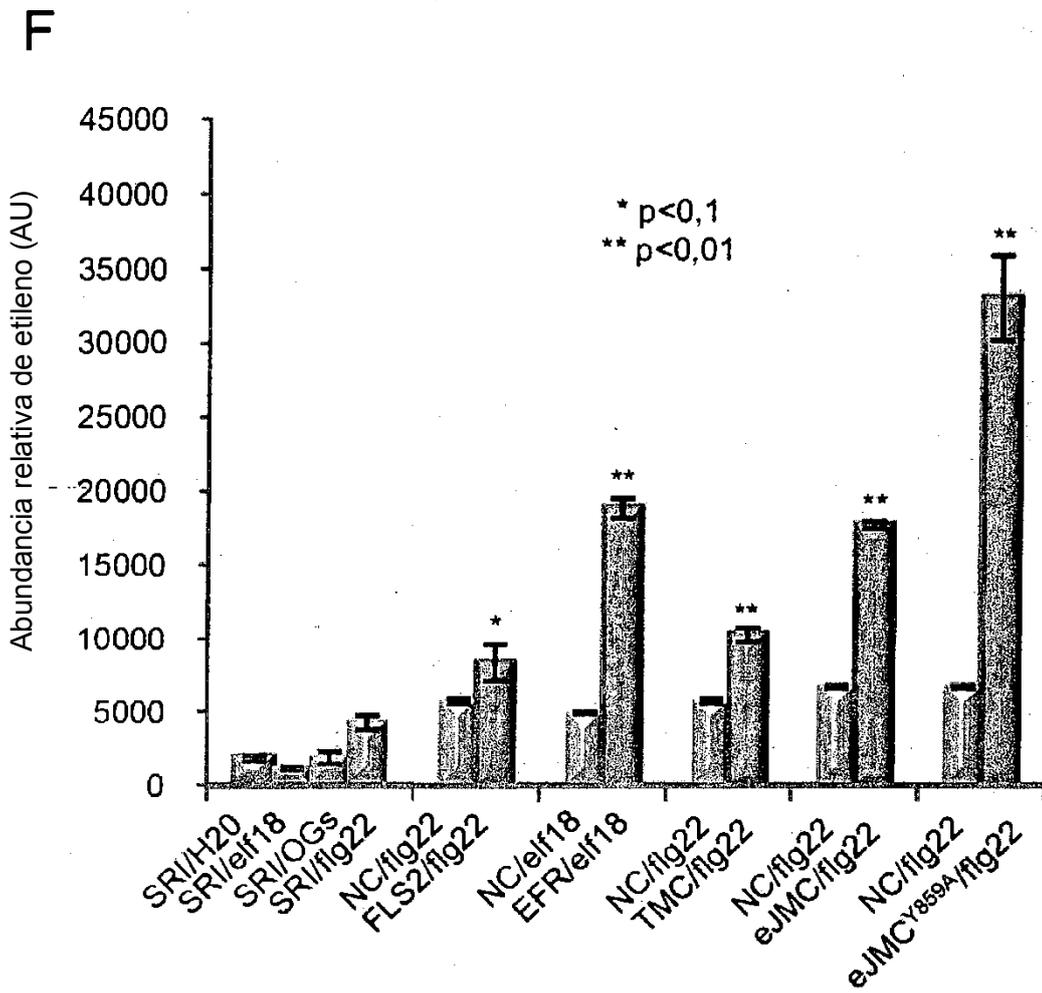


Fig. 3

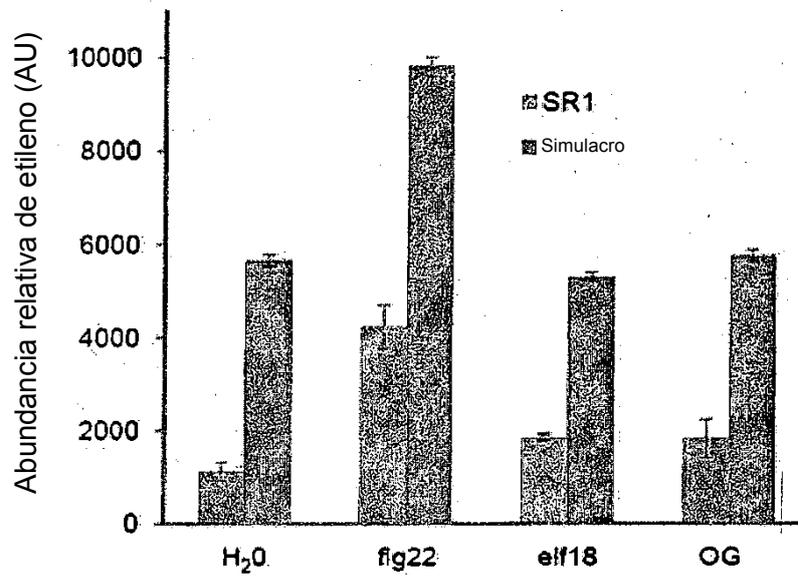


Fig. 3-1

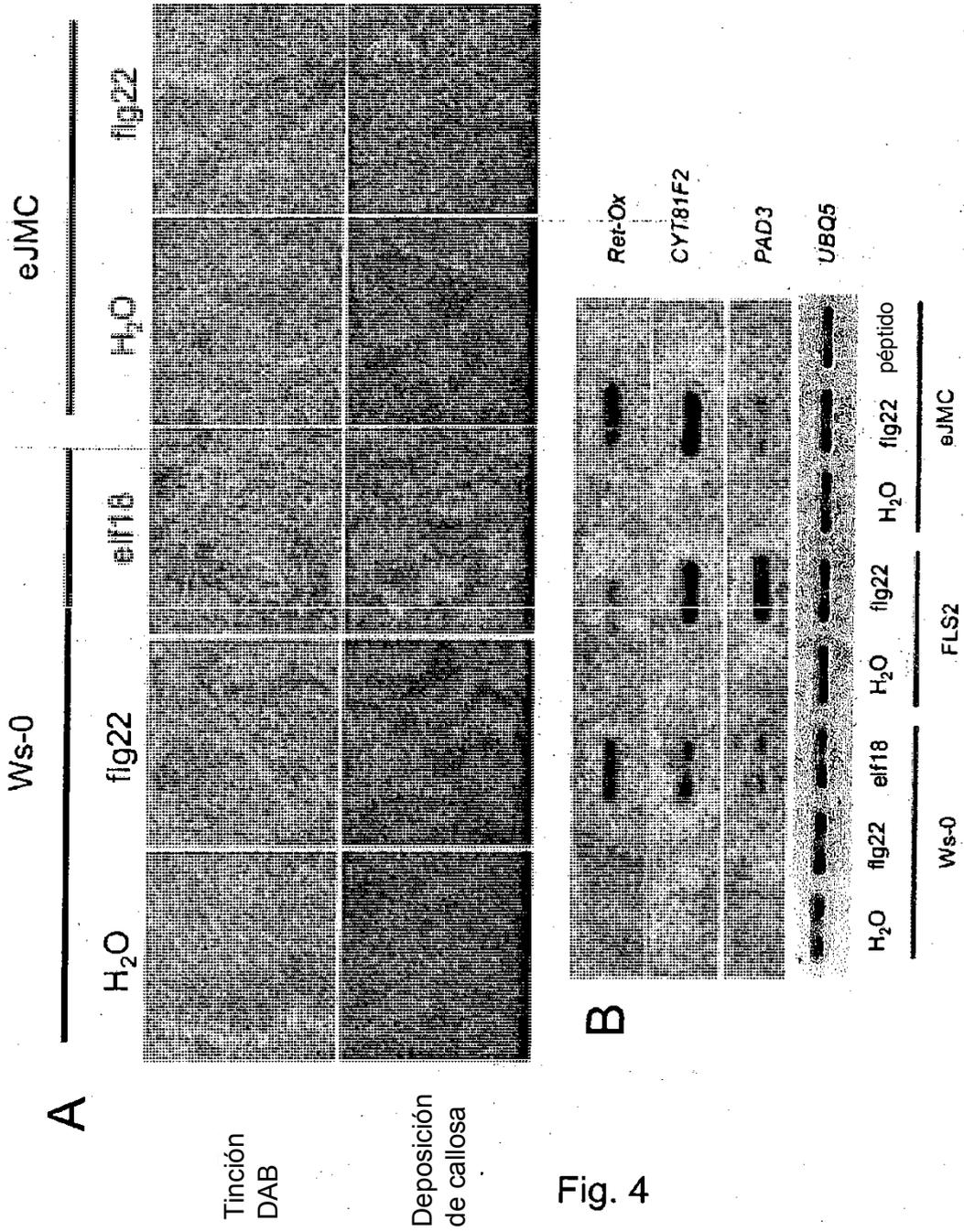


Fig. 4

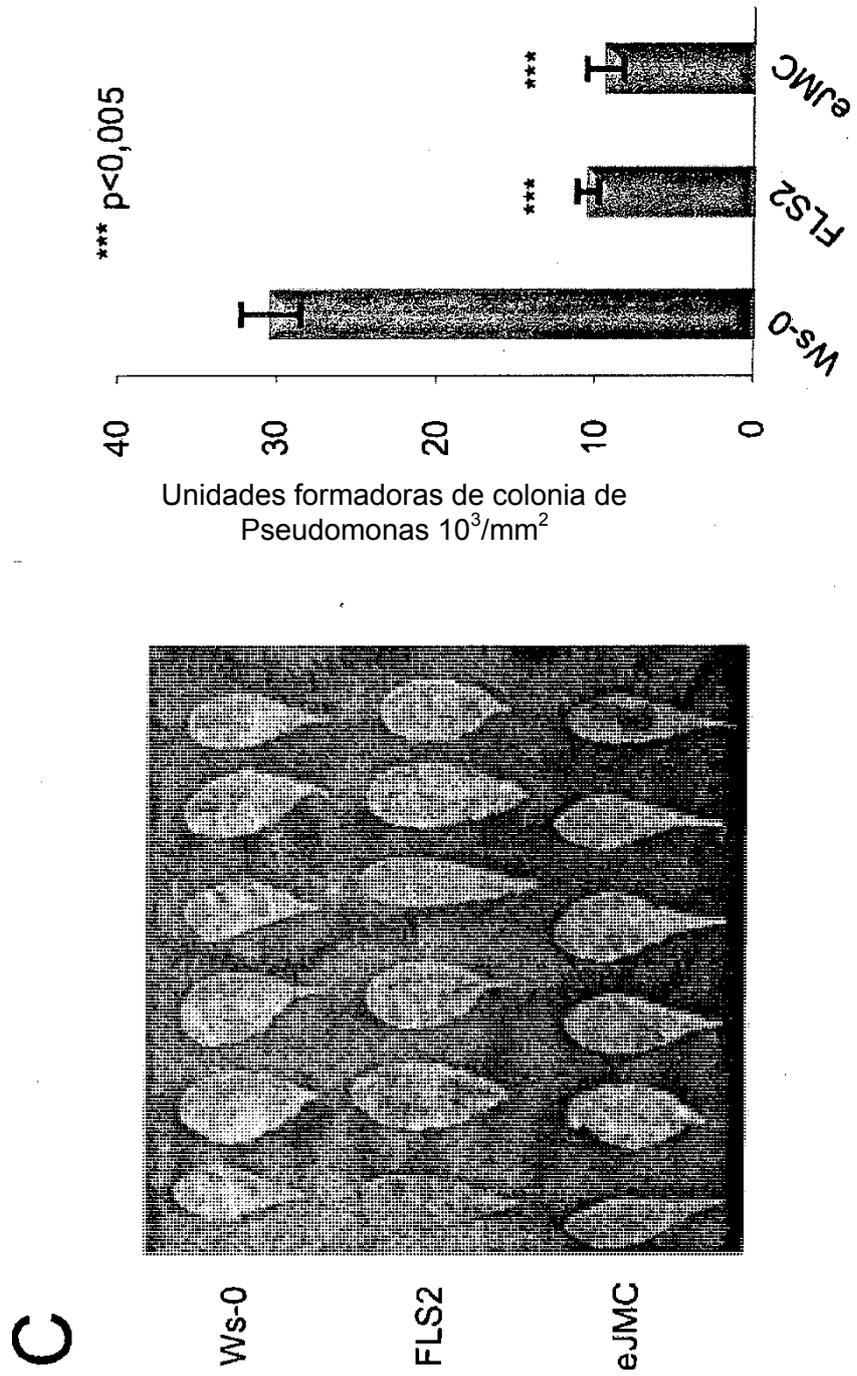
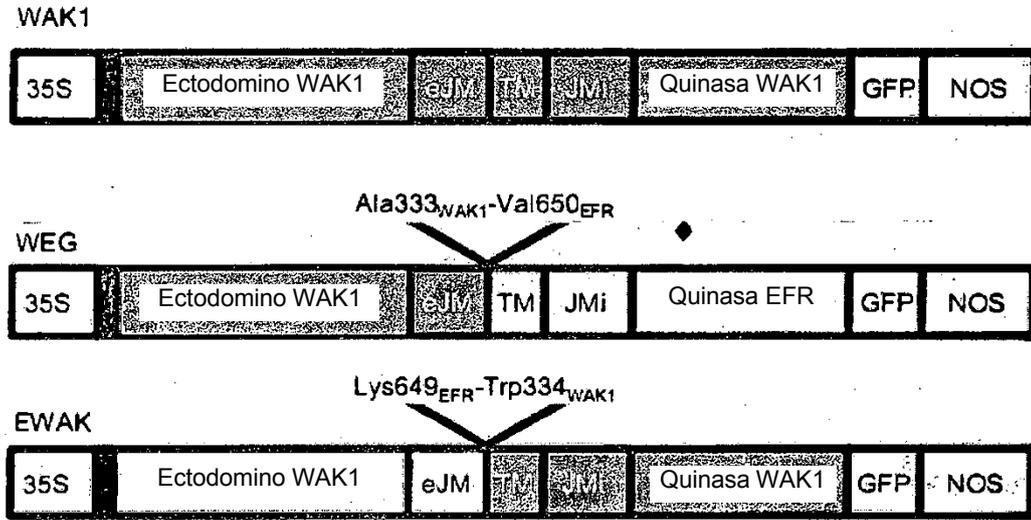


Fig. 4

A



B

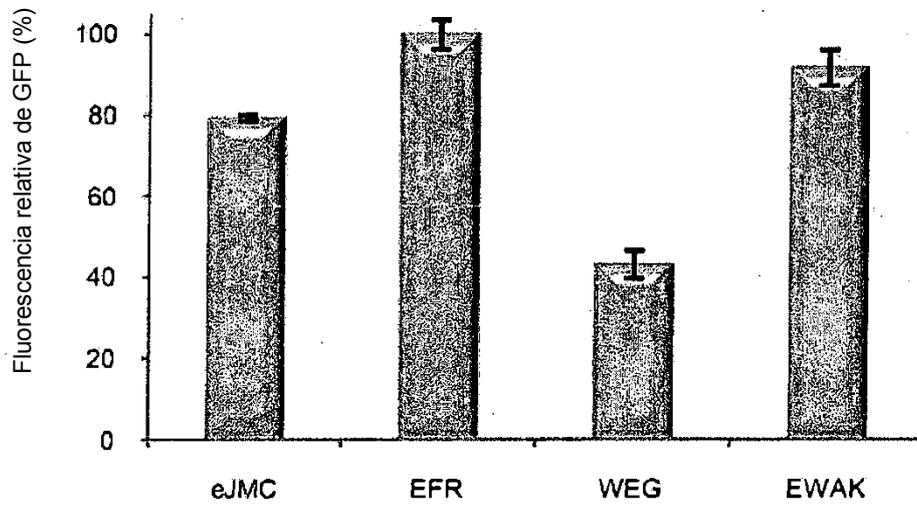
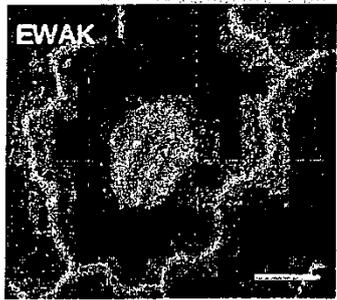
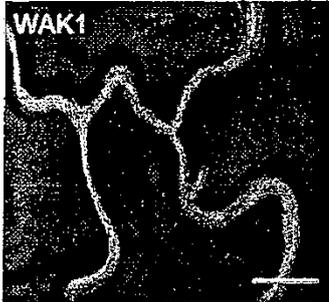


Fig. 5

C



D

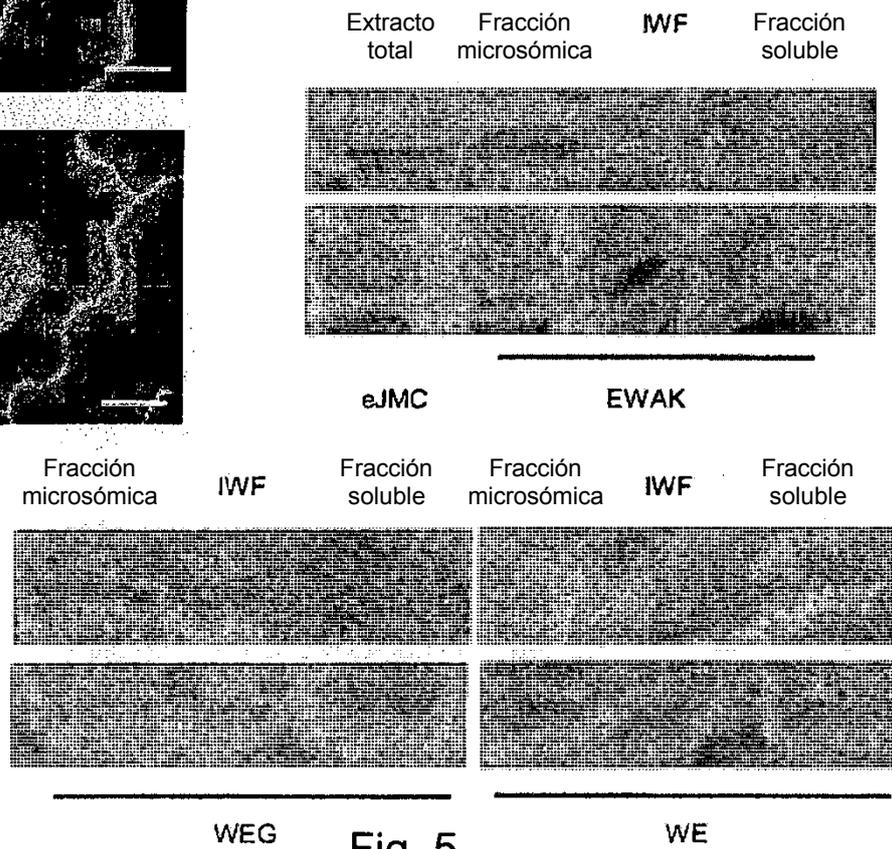


Fig. 5

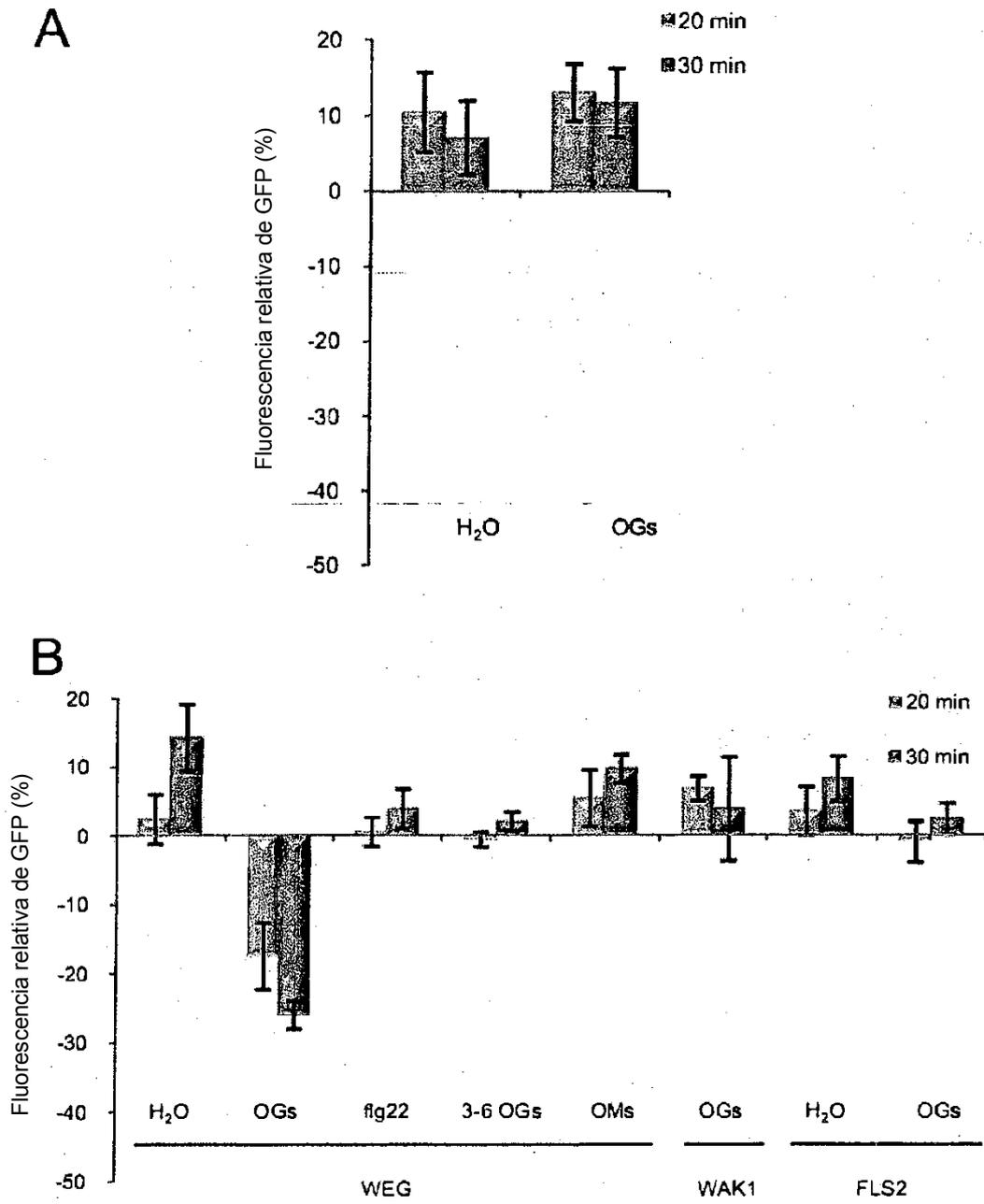
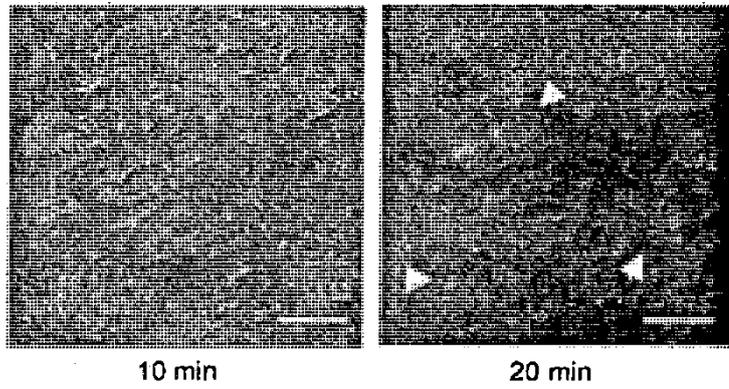


Fig. 6

C



D

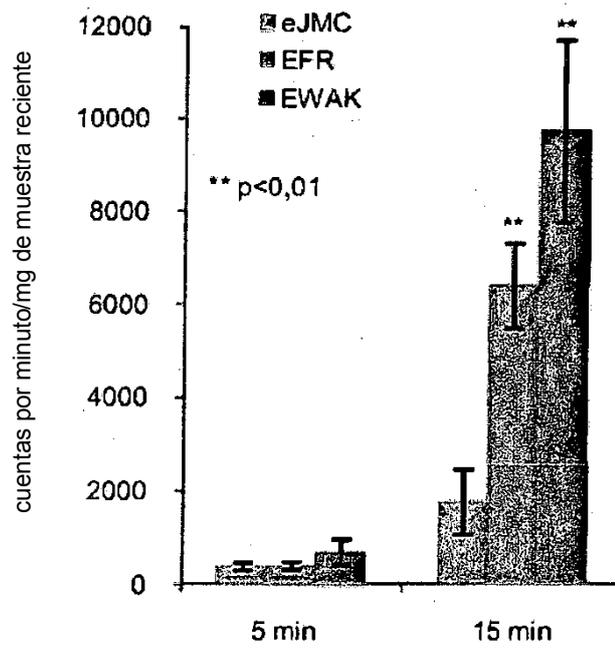


Fig. 6

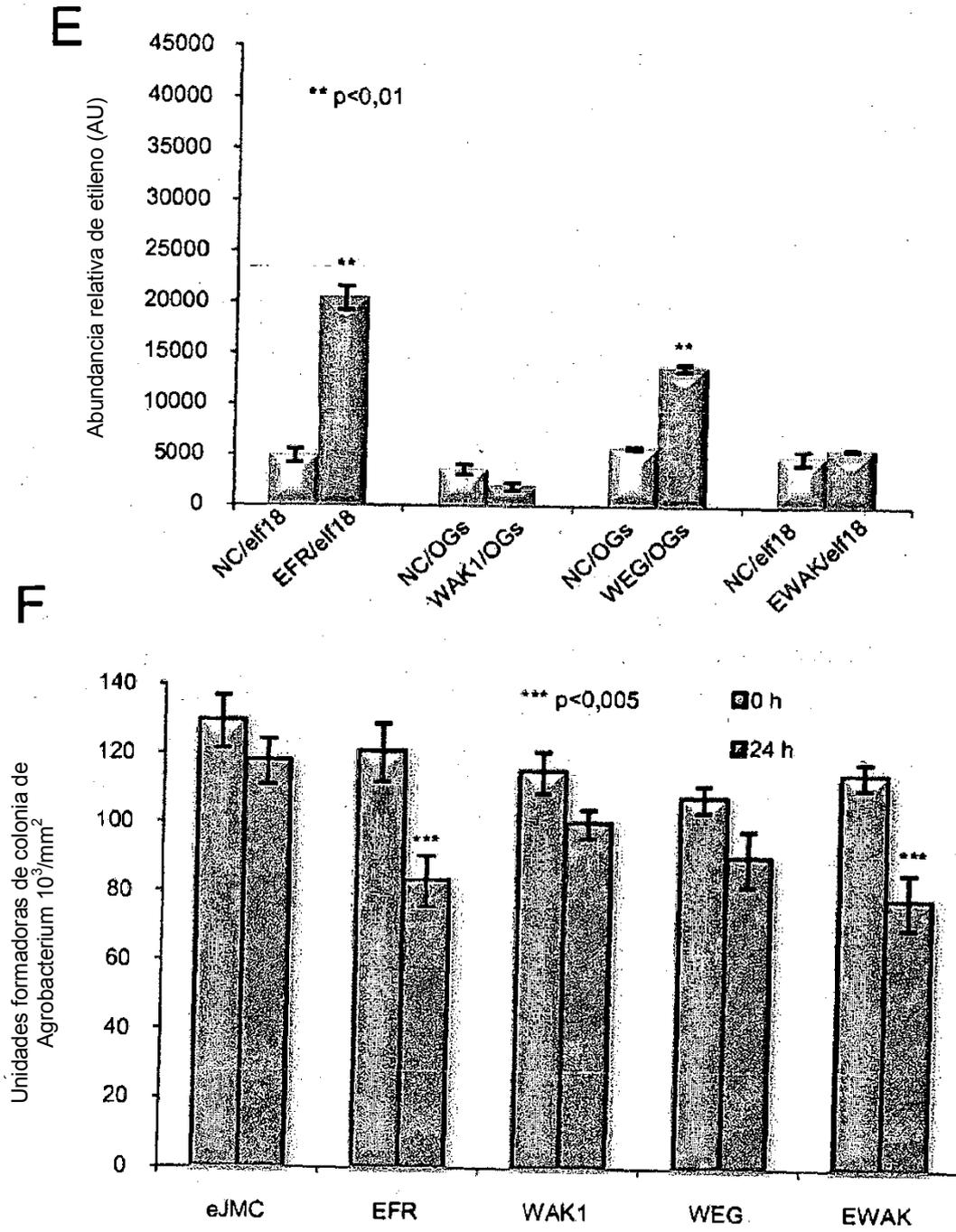


Fig. 6

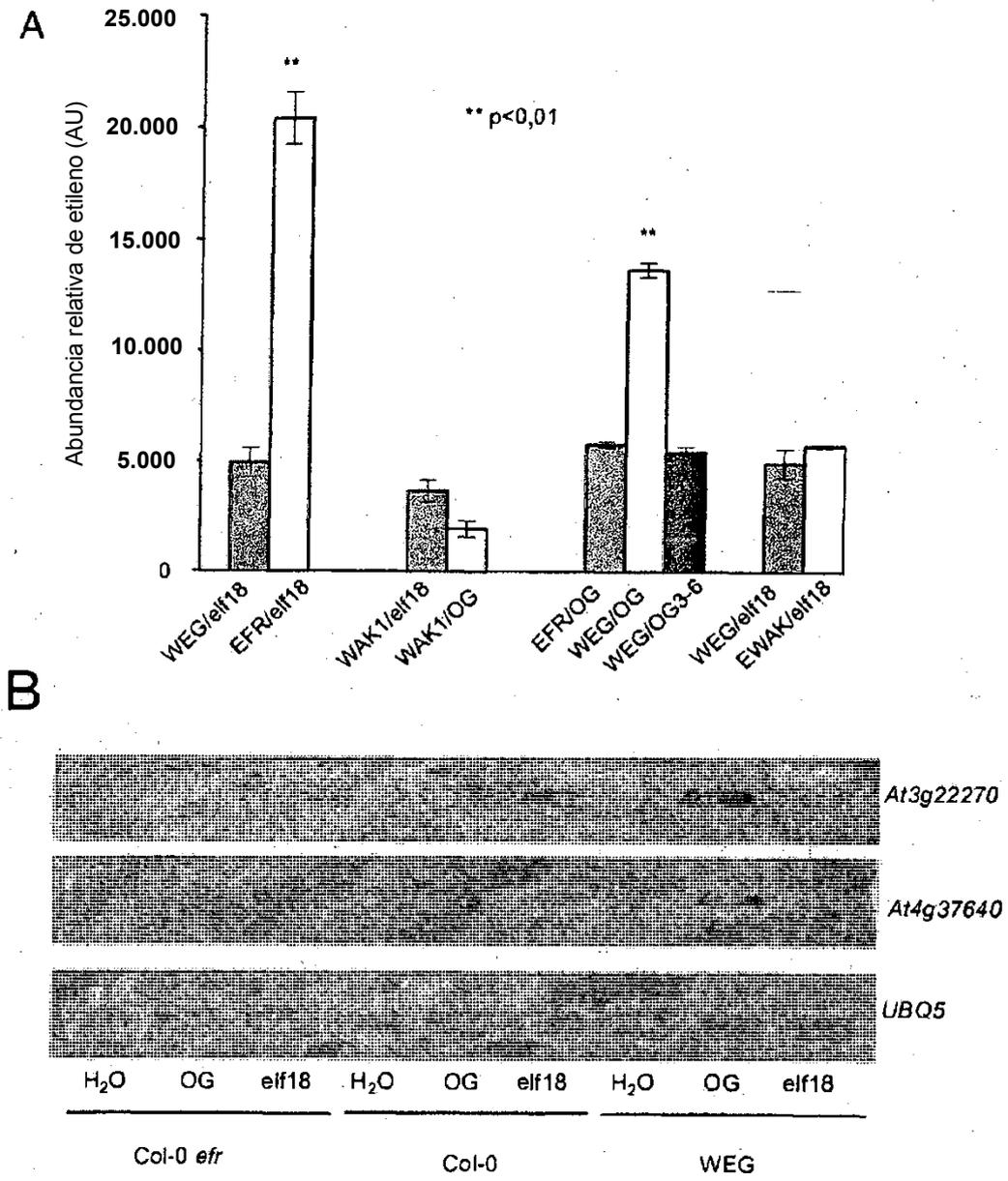


Fig. 6-1

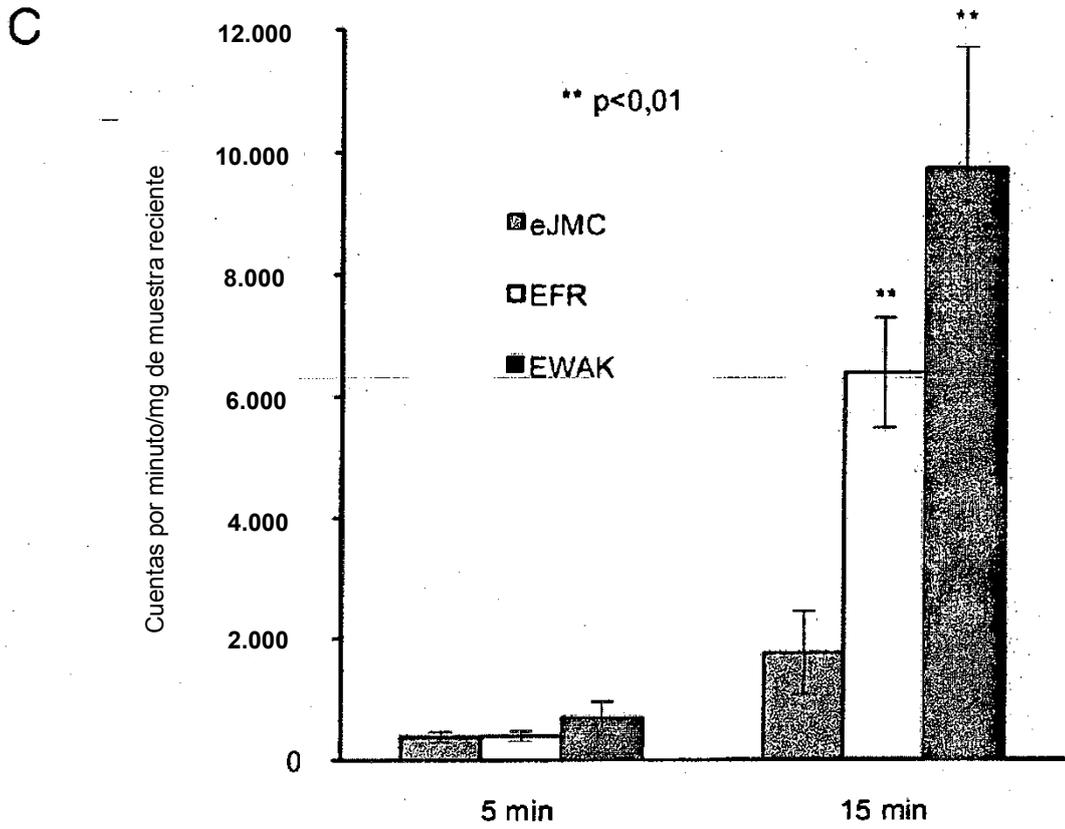


Fig. 6-1

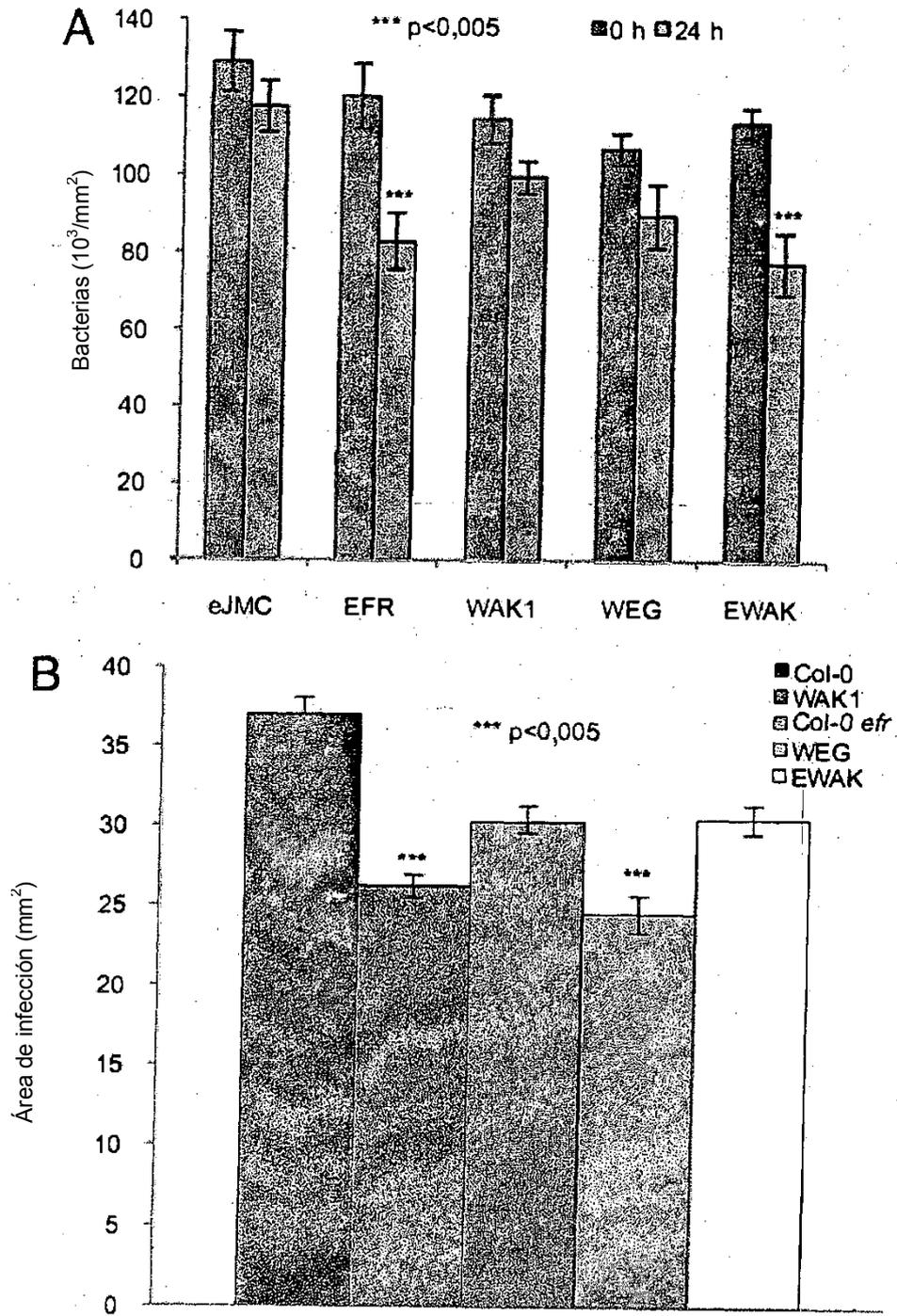


Fig. 6-2

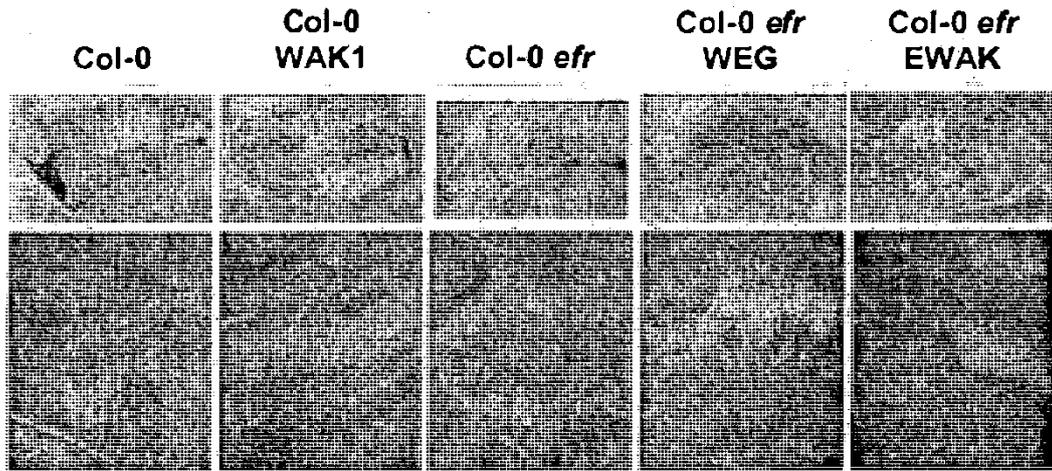


Fig. 6-3

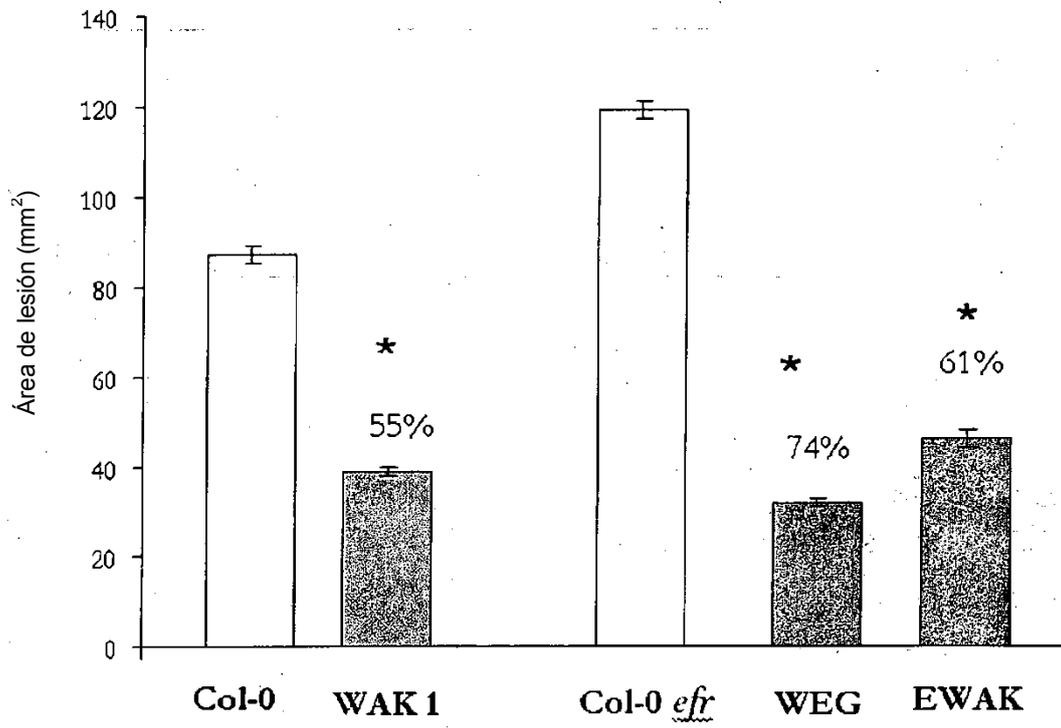


Fig. 6-4

WAK1	371		430
WAK2	366		425
WAK3	377		436
WAK4	372		431
WAK5	370		429
RFO-1	383	FFKGGGLKTRKQCLTRCGVVOSSKIFSSKREDEKADNENMNRVLGGCGGTVYRGMVD	442
WAK1	431		490
WAK2	426		485
WAK3	437		496
WAK4	432		491
WAK5	430		489
RFO-1	443	GRIVAVRSKVLDEDVVEEPIREAVGVLQIINERIVRLGCCLETEVEILVYBHPKGD	502
WAK1	491		550
WAK2	486		545
WAK3	497		556
WAK4	492		551
WAK5	490		549
RFO-1	503	SKRLEHDSDDYMTQDVRIRISVLAGALAKLHSASLVYHRDVKYTNILLDEKYRAKV	562
WAK1	551	ADEGASRLIEMDKEDIEIVQCGTLCGLDPEYNTGLLNEKSDVYSPGVVLMELLSCORAL	610
WAK2	546	ADEGASRLIEMDKEDIEIVQCGTLCGLDPEYNTGLLNEKSDVYSPGVVLMELLSCORAL	605
WAK3	557	ADEGASRLIEMDKEDIEIVQCGTLCGLDPEYNTGLLNEKSDVYSPGVVLMELLSCORAL	616
WAK4	552	ADEGASRLIEMDKEDIEIVQCGTLCGLDPEYNTGLLNEKSDVYSPGVVLMELLSCORAL	611
WAK5	550	ADEGASRLIEMDKEDIEIVQCGTLCGLDPEYNTGLLNEKSDVYSPGVVLMELLSCORAL	609
RFO-1	563	SDFGTSRSINVDQTHITLIVAGLGLDPEYNTQSQFTRSDVYSPGVVLMELLSCORAL	622
WAK1	611		670
WAK2	606		665
WAK3	617		676
WAK4	612		671
WAK5	610		669
RFO-1	623	SVMRPEENRGLVSHENEAMKONRVLDIIMDSRIKEGCTLEQVLAVKQARRCLSLKCKRF	682
WAK1	671		728
WAK2	666		725
WAK3	677		734
WAK4	672		731
WAK5	670		726
RFO-1	683	NMRVSVLELRISSPEDLELHIIEEDEDPCAMEINMDDSWVDMAPASLEFLLSPKQDV	742
WAK1	729	LDIEIAGR--	735
WAK2	726	LDIEIAGR--	732
WAK3	735	LDIEIAGR--	741
WAK4	732	LDIEIAGR--	738
WAK5	727	LDIEIAGR--	733
RFO-1	743	EPVVPQNTW	751

Fig. 7

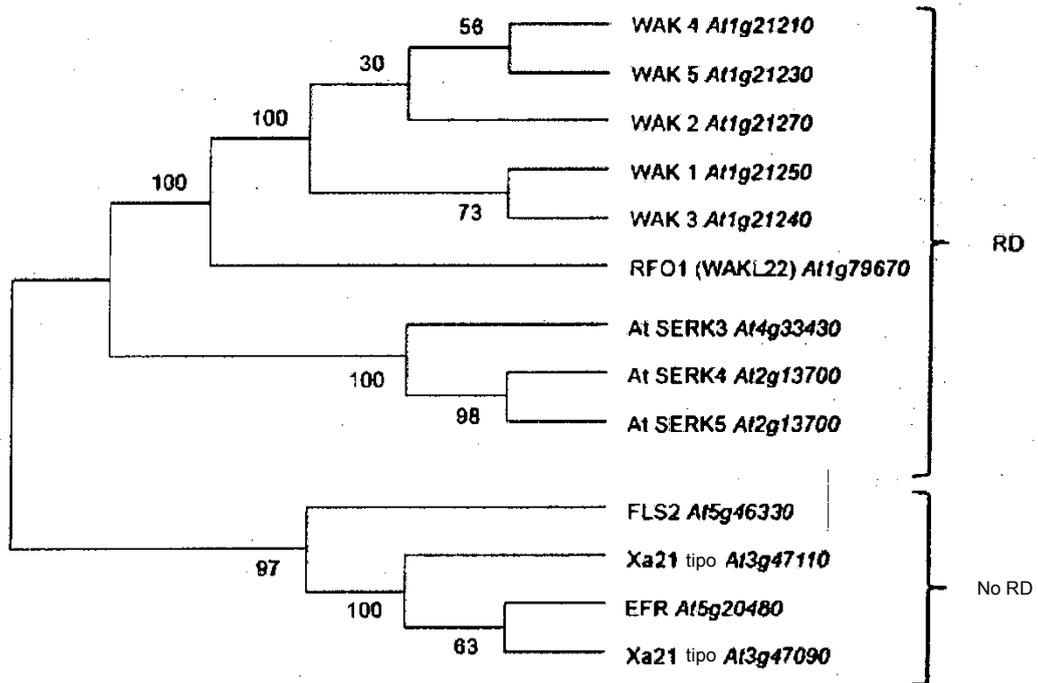


Fig. 8