



“Generación y caracterización de un mutante de *Physcomitrella patens* (*Ppnp12*) en un gen homólogo a *NPR1* involucrado en la señalización del ácido salicílico en plantas”

Ma. Virginia Cantera

Tutora: Dra. Alexandra Castro

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

Facultad de Ciencias - UdelAR

Licenciatura en Bioquímica

Trabajo final, Abril 2016

Resumen

NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1) es un regulador positivo de la vía de señalización dependiente del ácido salicílico (SA), el cual es requerido para la transducción de la señal del SA para activar la expresión de los genes de resistencia (PR) y el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (SAR). Estudios previos demostraron que su mutante nulo es insensible al SA y posee una expresión reducida de los genes PR, siendo por lo tanto, más susceptible a cierto tipo de patógenos.

Se han realizado varios estudios sobre NPR1 en plantas vasculares, pero hasta la fecha no hay registros sobre su funcionamiento en *Physcomitrella patens* (*P. patens*), una briofita modelo para estudios de genómica funcional. A pesar de que se ha demostrado que algunos patógenos son capaces de inducir la síntesis de SA en *P. patens*, se desconoce qué función cumple esta hormona en la defensa frente a patógenos, ni si genes homólogos a NPR1 cumplen la misma función que en plantas vasculares. A partir de análisis bioinformáticos realizados previamente en el laboratorio, se identificaron dos genes homólogos a NPR1 en el genoma de *P. patens*, que denominaron *PpNPL1* y *PpNPL2*.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el rol del gen *PpNPL2* durante el desarrollo y en respuesta a patógenos en *P. patens*. Con la intención de dilucidar el rol fisiológico de *PpNPL2* en *P. patens* y dada la posibilidad de realizar disrupciones génicas dirigidas en su genoma, se obtuvo un mutante “*knockout*” para dicho gen. Análisis fenotípicos preliminares sugieren que los mutantes son menos susceptibles a la infección con *Botrytis cinerea*.

Índice

1. Introducción.....	5
1.1 Interacción planta-patógeno.....	5
1.1.1 Percepción del patógeno.....	6
1.1.2 Respuesta de defensa.....	7
1.1.3 Señalización de Ácido Salicílico.....	8
1.1.4 NPR1 (NONEXPRESSOR PR1).....	11
1.2 <i>Physcomitrella patens</i> como modelo de estudio.....	13
1.3 Resultados previos de npl1.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y métodos.....	18
3.1 Material biológico.....	18
3.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	18
3.1.2 Cepas y cultivos de microorganismos.....	18
3.1.3 Fitopatógenos.....	18
3.1.3.1 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>	18
3.1.3.2 <i>Botrytis cinerea</i>	19
3.1.3.3 <i>Pythium irregulare</i>	19
3.2 Vectores y construcciones.....	19
3.3 Obtención de ADN genómico a partir de tejido vegetal.....	21
3.4 Obtención de ADN plasmídico.....	21
3.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	22
3.6 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa.....	22
3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
3.7.1 Amplificación de las regiones 5' y 3' para la generación de la construcción de reemplazo alélico en el gen <i>PpNPL2</i>	22
3.7.2 Oligonucleótidos.....	23
3.7.2.1 Amplificación del ADN genómico de <i>PpNPL2</i>	23
3.7.2.2 Análisis de líneas mutantes del gen <i>PpNPL2</i> mediante PCR.....	23
3.8 Digestión con enzimas de restricción.....	24
3.9 Construcción del vector de reemplazo alélico.....	24
3.10 Ligación del ADN.....	25
3.11 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	25
3.12 Transformación de <i>P. patens</i>	25

3.13 Análisis molecular de las líneas de <i>P. patens</i> generadas	26
3.14 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo.....	27
3.15 Detección de muerte celular.....	27
3.16 Análisis de la expresión génica.....	28
3.17 Análisis de datos.....	28
4. Resultados y discusión.....	29
4.1 Predicción de la función del gen <i>PpNPL2</i>	29
4.1.1 Análisis de la expresión génica de <i>PpNPL2</i>	30
4.2 Construcción del vector de reemplazo alélico en el gen <i>PpNPL2</i>	30
4.3 Transformación de protoplastos de <i>P. patens</i>	32
4.4 Análisis de los transformantes mediante PCR.....	33
4.5 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo.....	34
4.6 Análisis de la susceptibilidad de las plantas mutantes <i>npl2</i> comparado con plantas salvajes en respuesta a patógenos.....	35
5. Conclusiones.....	39
6. Perspectivas futuras.....	40
7. Bibliografía.....	41
8. Anexo.....	46
8.1 Figuras suplementarias.....	46
8.2 Abreviaturas.....	47

1. Introducción

Existen diversos factores ambientales, cuya naturaleza puede ser abiótica ó biótica, que afectan el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales. Como parte de su proceso evolutivo, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de adaptación frente a distintas condiciones de estrés. Los mecanismos moleculares que se disparan durante la respuesta de defensa no son del todo comprendidos, por lo cual el estudio de estas interacciones a nivel celular y molecular es de gran interés. El conocimiento generado a través de este tipo de análisis puede ser sumamente útil a la hora de diseñar estrategias biotecnológicas orientadas al desarrollo de plantas de interés agronómico tolerantes a diversos factores de estrés.

1.1 Interacción planta-patógeno

Las plantas en la naturaleza están en contacto con una gran variedad de microorganismos, dentro de los cuales se incluyen bacterias, hongos, oomycetes, nemátodos y virus. La respuesta de defensa que presentan las plantas difiere de la que podemos encontrar en animales. Esto se debe a que las plantas no poseen células especializadas para defenderse, por lo tanto cada una de las células necesita ser capaz de responder frente a un ataque de cualquier patógeno. Las plantas poseen la capacidad de perder partes de ella sin ocasionar su muerte, esto es beneficioso para evitar la dispersión del patógeno dentro del organismo ya que ocurre una muerte localizada en el sitio de ingreso del patógeno (Heath, 2000).

Las plantas durante la evolución han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa frente a patógenos dentro de las cuales existen barreras físicas y químicas preexistentes y respuestas de defensa inducidas por el patógeno (Yuan *et al.*, 2007). Entre las barreras físicas preexistente se hallan la pared celular y la cutícula. Las barreras químicas son compuestos que están presentes en las células y poseen actividad antimicrobiana (terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, entre otros) (Heath, 2000). Sin embargo, existen situaciones en las que estas barreras no son suficientes para impedir la infección del patógeno en el tejido vegetal, en estos caso se desencadena una respuesta de defensa más compleja, la cual implica la percepción del patógeno, la transducción de las señales y la activación de genes de defensa (Shah *et al*, 1999). Por lo tanto la especificidad de las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del genotipo del patógeno.

La resistencia que se puede observar en todos los individuos pertenecientes a una determinada especie frente a un patógeno específico es llamada resistencia tipo no-huésped,

siendo éste el mecanismo de protección de las plantas más frecuentemente utilizado frente a la mayoría de los patógenos. Por otro lado, también existe lo que se denomina resistencia tipo huésped, la cual se expresa solamente en algunos genotipos de especies que son sensibles (Heath, 2000; Thordal-Christensen, 2003).

La resistencia de una planta frente a un patógeno determinado se puede deber a que el patógeno es incapaz de infectar a la planta o a que la planta es capaz de evitar la infección y/o la propagación del patógeno en el tejido vegetal a través de respuestas de defensa. Para el caso de la enfermedad, esta puede deberse a la falta de reconocimiento del patógeno por parte de la planta, o a la habilidad del patógeno de evadir o sobreponerse a las respuestas de defensa.

Se debe tener en cuenta que para que la planta enferme, además de requerirse que ésta sea susceptible al patógeno y que esté en contacto con un patógeno virulento, también es necesario que las condiciones ambientales sean favorables para que esto ocurra.

1.1.1 Percepción del patógeno

La resistencia de tipo huésped está basada en el modelo llamado “gen para gen”. Este modelo fue propuesto por Flor en 1946 y acorde a éste la resistencia se establece a través de la interacción de los productos de dos genes, uno correspondiente al patógeno, denominado gen de avirulencia (proteínas Avr), y el otro por el huésped, denominado gen de resistencia (proteínas R). La interacción incompatible ocurre cuando los genes de resistencia y de avirulencia son dominantes. En este tipo de interacción el patógeno logra ingresar al tejido y desencadenar una infección inicial, pero no es capaz de invadir el resto de la planta, por lo tanto la planta va a ser resistente al patógeno y el patógeno actúa como un patógeno avirulento. En el caso de la interacción compatible ocurre que uno de los genes es recesivo o se encuentra ausente y, consecuentemente, la planta es incapaz de reconocer al patógeno. Allí, el patógeno ingresa al tejido donde prolifera, logra invadir el resto del tejido vegetal de la planta y puede llegar a provocar la muerte de la planta. En este caso la planta es susceptible al patógeno, y el patógeno es virulento para la planta (Keen, 1990).

Las proteínas R en general no son los receptores de las proteínas Avr, por lo que se han propuesto modelos como el modelo de “co-receptor” y el “modelo de guardia”. El modelo de “co-receptor” plantea que el producto del gen R, la proteína R, se une a una proteína intermedia y juntas se unen al factor de avirulencia, permitiendo que se produzca la respuesta de defensa. El “modelo de guardia” plantea que el factor Avr se une a una proteína diana que

no es la proteína R. En interacciones incompatibles la proteína R bloquea la diana del factor Avr, evitando de esta forma que la interacción del factor Avr con la proteína diana provoque la enfermedad (Bonas *et al.*, 2002).

1.1.2 Respuesta de defensa

Cuando la célula vegetal detecta la presencia de un patógeno, se activa una potente reacción de defensa inducida. Esta respuesta es más fuerte a nivel local, en el tejido por donde ingresó el patógeno, y más leve a nivel sistémico, en el resto de los tejidos que no han sido infectados por el patógeno. Los mecanismos de defensa involucrados incluyen una combinación de cambios físicos, químicos y moleculares, como la lignificación o la inducción de varias proteínas PR (Rangel Sánchez *et al.*, 2010).

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) es uno de los primeros sucesos que ocurren luego de la percepción del patógeno, ocurriendo a los minutos de la infección. Algunas de las ROS que se producen son el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lamb & Dixon, 1997). Esta acumulación de ROS es conocido como “estallido oxidativo” y posee un rol importante ya que presenta un efecto antimicrobiano directo al inducir el reforzamiento de la pared celular, la expresión de genes de defensa y el desarrollo de la muerte celular programada (PCD) y localizada en el sitio de infección denominada respuesta hipersensible (HR, “hypersensitive response”) (Apel & Hirt, 2004; Yang *et al.*, 1997). El óxido nítrico (NO) también juega un papel esencial, siendo capaz de inducir genes de defensa y de actuar en forma sinérgica con las ROS para promover la muerte celular programada (Delledonne *et al.*, 1998).

Además de la defensa local, la resistencia de las plantas puede extenderse hacia regiones alejadas del sitio de infección, que no han sido lesionadas por el patógeno. Esta defensa generalizada ha sido denominada respuesta sistémica adquirida o SAR (“systemic acquired resistance”). La SAR tiene una duración de semanas y es no específica, ya que actúa de forma semejante para una amplia variedad de patógenos, o incluso tras lesiones mecánicas no causadas por patógenos invasores (Ross, 1961; Ryals *et al.*, 1996).

La señal del patógeno es percibida y amplificada a través de la acumulación de moléculas señales de la planta, como las hormonas ácido salicílico (SA), etileno (ET) y jasmonatos (JA) (Yang *et al.*, 1997). La inducción de estas vías conduce en cada caso a la inducción de un grupo específico de genes de defensa, los cuales contribuyen a la protección

de la planta frente a distintos tipos de patógenos, aunque existe una intrincada interconexión de señales regulatorias entre las tres vías (Feys & Parker, 2000; McDowell & Dangl, 2000).

La resistencia mediada por los genes R está ligada a la activación de la vía del SA y a la aparición de la HR. El tipo de respuesta de la HR, donde ocurre la PCD, beneficia a la planta frente a patógenos biótros ya que logra evitar su dispersión en la planta. Un ejemplo de este tipo de patógeno es *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasítica* y *Erysiphe orontii*. Por el contrario, los patógenos necrótrofos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*, se benefician de la PCD y, por lo tanto, sólo son limitados por otros mecanismo que son dependientes de ET y JA (Bowling *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1998).

1.1.3 Señalización de Ácido Salicílico

Cuando las plantas perciben el ataque por parte del patógeno activan defensas en la zona del ataque y también en los tejidos distales. Esta respuesta, la SAR, requiere de SA para activarla (Mach, 2015).

El SA forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Rangel Sánchez *et al.*, 2010). En plantas es sintetizado en los plastidos (Kumar, 2014). Los compuestos fenólicos participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como la síntesis de lignina, actividad alelopática, y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa como las fitoalexinas. El SA participa en varios procesos fisiológicos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades y estrés abiótico (Raskin, 1992; Métraux & Raskin, 1993; Vlot *et al.*, 2009; Rangel Sánchez *et al.*, 2010). Se ha descrito que en algunos casos el efecto del SA dentro del metabolismo de las plantas puede ser de forma indirecta ya que altera la síntesis y/o señalización de otras hormonas que incluyen la vía del JA, ET, y auxinas (Loake & Grant 2007; Rangel Sánchez *et al.*, 2010).

La síntesis de SA puede darse por 2 vías donde ambas requieren corismato, un producto de la vía de shikimato. El aminoácido L-fenilalanina, puede ser convertido en ácido salicílico por dos vías, una mediante el intermediario benzoato y la otra mediante el ácido cumárico, a través de una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL). A su vez, el corismato puede también ser convertido en SA vía isocorismato, en un proceso de dos pasos que implica la participación de las enzimas

isocorismato sintasa (ICS) e isocorismato piruvato liasa (IPL) (Verberne *et al.*, 2000; Wildermuth *et al.*, 2001) (Figura 1). Más del 90% del SA producido como respuesta al ataque por patógenos es sintetizado por la segunda vía en *Arabidopsis* (Kumar, 2014).

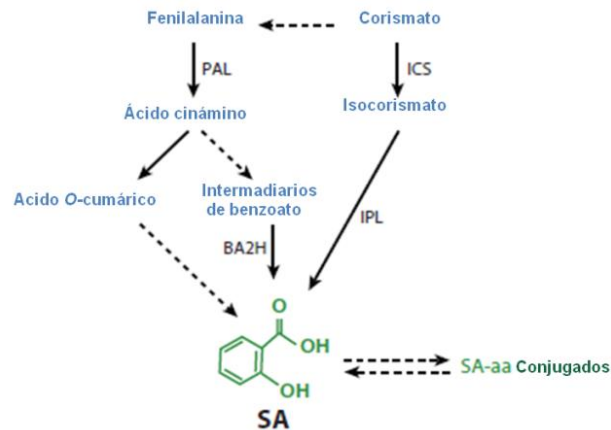


Figura 1. Biosíntesis de ácido salicílico. Abreviaturas: PAL, fenilalanina amonio liasa; ICS, isocorismato sintasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; BA2H, ácido benzoico 2-hidroxilasa; SA, ácido salicílico; aa, aminoácidos. Las flechas continuas representan pasos conocidos de la síntesis y las flechas punteadas pasos de la síntesis que no han sido completamente descriptos. (Modificada de Vlot *et al.*, 2000).

El SA es luego modificado (vía glicosilación, metilación, conjugación con aminoácidos, sulfonación, hidroxilación, etc.) para dar varios derivados (Figura 2). La mayor parte de estos derivados no son compuestos activos. La mayoría del SA producido por la planta va a ser glucosilado (SAG) y se cree que es la principal forma de almacenamiento, con el potencial para ser convertido nuevamente a SA mediante reacciones enzimáticas catalizadas por SA β -glucosidasa. Uno de los derivados metilados, el salicilato de metilo (MeSA), que también es inactivo, es volátil y puede difundir a través de las membranas. Esto podría ayudar a la planta a excretar el exceso de SA fuera de la célula donde es sintetizado y permite una eventual difusión fuera de la planta. Este mecanismo ayudaría a la planta a reducir la acumulación de SA y su resultante efecto tóxico, que posee la capacidad de provocar la muerte celular (Kumar; 2014).

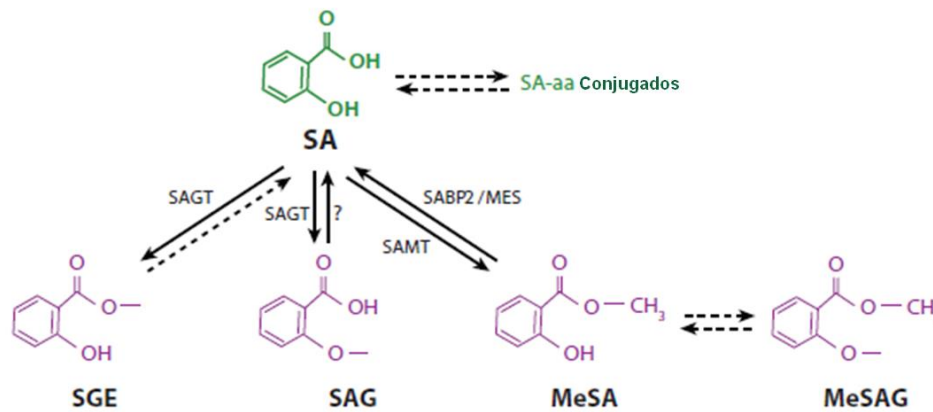


Figura 2. Metabolismo del SA. Abreviaturas: SA, ácido salicílico; SAGT, ácido salicílico glucosil transferasa; aa, amino ácidos; SAMT, SA metil transferasa; SABP2, proteína 2 unida a SA; MES, metil esterasa; SGE, saliciloil éster glucosa; SAG, SA O-β glucósido; MeSA, salicilato de metilo; MeSAG, salicilato de metilo O-β-glucósido. Las flechas continuas representan pasos conocidos de la síntesis y las flechas punteadas pasos de la síntesis que no han sido completamente descritos. (Modificado de Vlot *et al.*, 2009).

La activación de la señalización por parte del SA en plantas bajo situaciones de estrés es precedido por el estallido oxidativo originado en diferentes compartimentos celulares. El SA juega un rol esencial en la transducción de señales que conducen a la activación de genes de defensa, que además de codificar proteínas relacionadas a la patogénesis, permiten establecer la HR (Dixon *et al.*, 1994; Van Doorn *et al.*, 2011).

El estrés biótico induce en plantas respuestas fisiológicas y bioquímicas que incluyen cambios en la expresión génica y también modificaciones en el metabolismo de las células. Existe una respuesta a nivel transcripcional de muchos genes frente al estrés biótico y sus productos son capaces de actuar en la respuesta adaptativa de la planta. Los productos de estos genes inducidos son capaces de actuar como protectores del daño celular o incluso como intermediarios para la percepción y la transducción de la señal. Estos genes y sus proteínas asociadas al estrés pueden clasificarse en dos grupos, el primero de ellos está constituido por proteínas funcionales o por proteínas que actúan en la tolerancia al estrés. El segundo grupo está formado por proteínas reguladoras de la transducción de señales y la expresión de genes responsables de la respuesta al estrés. Dentro de este último grupo, se encuentra la proteína NPR1, objeto de estudio de este trabajo, la cual se describe a continuación.

1.1.4 NPR1 (NONEXPRESSOR PR1)

En *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), la proteína “Nonexpressor of pathogenesis related genes 1” (NPR1) es una proteína reguladora positiva de la vía de señalización del SA. Esta proteína sensa y transduce la señal producida por el SA haciendo posible que se produzca la SAR. Actúa como co-activador regulando la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR, “pathogenesis related”) dependientes de SA. Esta proteína posee repetidos ricos en anquirina y un dominio BTB-POZ (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac/Pox virus y Zinc finger). Estas regiones de la proteína están involucradas en las interacciones proteína-proteína (Cao *et al.*, 1997).

El gen *NPR1* se expresa constitutivamente, los niveles de transcriptos aumentan solamente al doble luego del tratamiento con SA. Estos resultados sugieren que se regula principalmente a nivel postranscripcional (Dong, 2004). Bajo condiciones basales, NPR1 se encuentra en forma de oligómero unido por 2 cisteínas (Cys 82 y Cys 216), mediante puente disulfuro intramolecular (Figura 3). El SA activa a NPR1 y esta activación genera la reducción del puente disulfuro por un cambio en el estado redox de la célula, liberándose los monómeros. Los monómeros de NPR1 son importados al núcleo, donde interactúa con factores de transcripción TGAs (incluidos en la clase bZIP de TFs) de *Arabidopsis* (Kesarwani *et al.*, 2007). Los TGAs pueden interactuar directamente con la región promotora de los genes de defensa como PR1, promoviendo su expresión (Lebel *et al.*, 1998). El monómero de NPR1 puede sufrir degradación por el proteosoma mediada por los parálogos de NPR1, NPR3 (en presencia de SA), y NPR4 (en ausencia de SA) (Figura 3) (Mach, 2015).

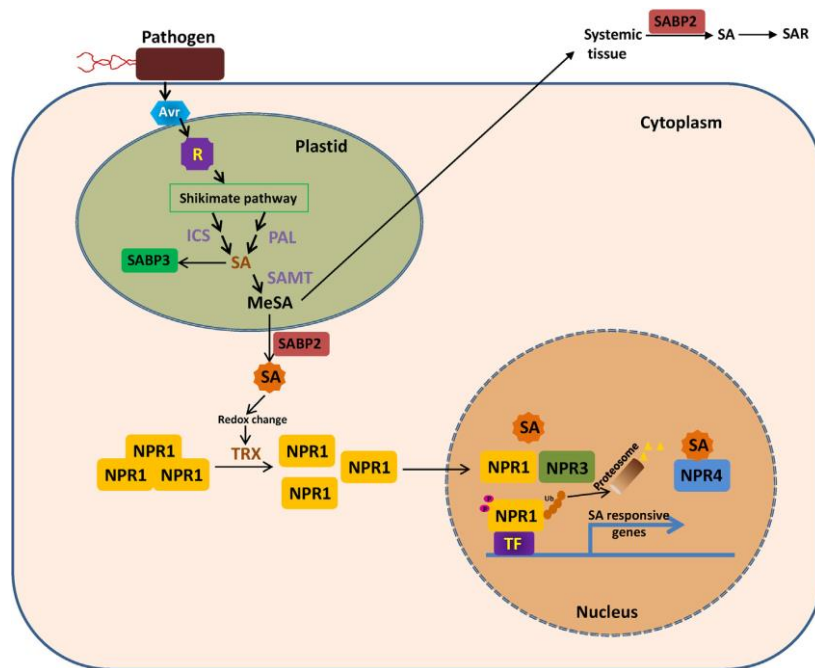


Figura 3. Activación de la señalización mediante SA en célula vegetal. El ataque por parte del patógeno resulta en un aumento en la biosíntesis del SA a través de la vía ICS/PAL. La SA metiltransferasa (SAMT) cataliza la conversión del SA a MeSA que difunde hacia el citoplasma donde es convertido nuevamente en SA mediante la actividad esterasa de SABP2. Niveles altos de SA en el citoplasma convierten al oligómero NPR1 en monómero, que luego migra al núcleo y activa genes como los PR. NPR1 es fosforilado luego de la interacción con factores de transcripción. La degradación mediado por el proteosoma del NPR1 fosforilado desencadena la expresión de los genes de respuesta de SA. (Tomado de Kumar; 2014)

El gen *NPR1* fue identificado en 1994 mediante un *screening* genético de mutantes de *Arabidopsis* en donde se seleccionaron aquellas plantas que presentaron un fenotipo que no eran capaces de inducir genes PR frente al agregado de SA (Cao *et al.*, 1994). En mutante *npr1* se denominó así por *non expressor of pr genes 1*, junto con otros alelos identificados posteriormente en otros screenings, como *nim1* (“non-inducible immunity 1”) son insensibles frente a todos los inductores de la SAR, incluidos el SA, INA, BTH y patógenos avirulentos (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996). Este gen y sus alelos, participan no sólo en la SAR, sino también en la resistencia basal, mostrando mayores síntomas cuando son infectados con patógenos virulentos.

Hasta la fecha es el único gen descrito que su mutante nulo es insensible al SA. Se demostró que NPR1 juega un rol en la señalización de otras respuestas de defensa (Dong, 2004).

Se han realizado estudios funcionales de homólogos a NPR1 en diversos organismos. En 2010 Shi *et al.*, realizaron estudios funcionales del gen *NPR1* del cacao (*Theobroma cacao*) en *Arabidopsis*. Para ello aislaron y caracterizaron el homólogo de *NPR1* en cacao (*TcNPR1*).

Demostraron que *TcNPR1* comparte funciones similares a *NPR1* de *Arabidopsis*. Es capaz de complementar parcialmente la mutación *npr1-2* en plantas de *Arabidopsis* transgénicas mediante un ensayo de infección de la hoja y se transloca al núcleo luego de la inducción por SA de la misma forma que lo hace la proteína *NPR1* endógeno de *Arabidopsis*. En 2015 Silva *et al.* evaluaron la resistencia a enfermedad frente a un amplio espectro de patógenos en frutillas (*Fragaria vesca* L.) que sobreexpresan el gen *NPR1* de *Arabidopsis* (*AtNPR1*). La caracterización de estas plantas transgénicas indica que ocurre una expresión ectópica del gen *AtNPR1* que le confiere resistencia frente a tres hongos patógenos y a una bacteria patógena.

A pesar de que los estudios realizados en plantas vasculares han generado mucha información sobre el reconocimiento del patógeno, las vías de transducción de señales y la activación de las respuestas de defensa en diferentes interacciones planta-patógeno, existe muy poca información sobre las respuestas de defensa frente a patógenos en plantas no vasculares, como es el caso de los musgos.

1.2 *Physcomitrella patens* como modelo de estudio

Las briofitas divergieron de las plantas vasculares hace 400 millones de años a partir de un ancestro común y fueron las primeras plantas en colonizar la tierra. Su distribución en el planeta en la actualidad es muy amplia (Robinson *et al.*, 2003). El musgo *Physcomitrella patens* (*P. patens*) pertenece a las briofitas y, por lo tanto, a pesar de tener millones de años de evolución independiente es un organismo modelo para estudiar la evolución de los procesos biológicos en las plantas terrestres (Knight *et al.*, 2009). La posición filogenética basal de las Briofitas entre las plantas terrestres las ubica en una situación ideal para contestar preguntas fundamentales sobre la evolución de las plantas (Schaefer, 2002). Una gran diferencia que poseen las briofitas con respecto a las plantas vasculares, es que sus estrategias adaptativas al hábitat terrestre están basadas casi exclusivamente en la tolerancia al estrés, a través de limitar o reparar el daño producido por el mismo. Esto se ve reflejado, por ejemplo, en la capacidad de estas plantas de sobrevivir frente a ciclos de deshidratación y rehidratación, o incluso sobrevivir a la desecación total. Las briofitas carecen de tejido vascular y órganos definidos. Poseen estructuras más primitivas llamadas filoides, rizoides y cauloides en lugar de hojas, raíces y tallos (Knight *et al.*, 2009).

Las briofitas, como todas las plantas, poseen alternancia de generaciones en su ciclo de vida, pero sin embargo, en estas plantas predomina la fase gametofítica haploide sobre la fase esporofítica diploide (Figura 4) (Knight *et al.*, 2009). El desarrollo de *P. patens* inicia con la germinación de una meiospora, que da lugar a una estructura filamentos, llamada protonema,

que es el gametofito juvenil. El protonema está compuesto por dos tipos de filamentos, el cloronema y el caulonema. El cloronema surge primero y luego a partir de éste surge el caulonema. El cloronema posee un mayor número de cloroplastos y el caulonema se divide más rápidamente. El crecimiento del protonema es principalmente mediante división de las células apicales que forman luego gametóforos, que representan el estado adulto de la planta. El gametóforo está formado por un vástago fotosintético, hojas, las estructuras reproductivas (arquegonias y anteridios) y los rizoides. Los gametos masculinos son móviles y flagelados, y por lo tanto necesitan humedad para poder trasladarse y fecundar los gametos femeninos. Una vez fecundado el cigoto se transforma en esporofito (fase diploide), donde van a madurar las esporas y una vez maduro el esporofito son liberadas las esporas (Reski *et al.*, 1998).

El genoma de *P. patens* (cepa Graden 2004, Schaefer *et al.*, 1991) ha sido totalmente secuenciado y es de libre acceso desde diciembre de 2007 (Rensing *et al.*, 2008, https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Ppatens). Tiene un tamaño de 473 Mb organizado en 27 cromosomas pequeños y contiene 32926 genes que codifican para proteínas.

P. patens es un buen modelo de estudio para la biología vegetal, ya que posee un ciclo de vida corto, una gran capacidad de regeneración, morfología simple y facilidad de cultivo in vitro. Gracias al ciclo predominantemente haploide de *P. patens* en su estado gametofítico y la alta eficiencia de recombinación homóloga, hace que sea beneficioso trabajar en esta planta ya que posee muchas de las ventajas que se observan en genética bacteriana (Cove *et al.*, 1997). Por lo tanto la identificación de los mutantes y los análisis fenotípicos son más sencillos que si se trabajara con especies que poseen una fase diploide dominante, siendo ampliamente utilizado para estudios de genética reversa.

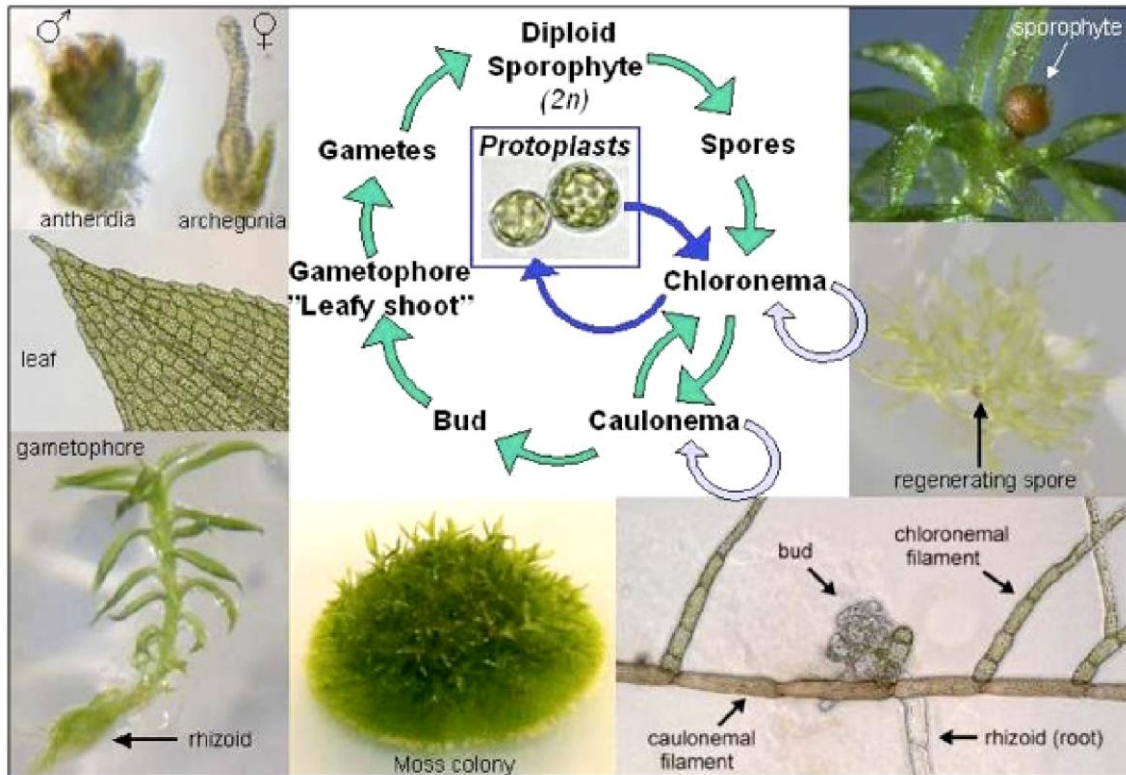


Figura 4. Ciclo de vida de *P. patens* En fase haploide el gametofito produce órganos sexuales masculinos (anteridios) y femeninos (arquegonios). Mediante mitosis se generan las células sexuales masculinas (anterozoides) y femeninas (oosfera). Luego de la fecundación se forma el esporofito, que es diploide, dependiente del gametofito. Las esporas, que son haploides, se forman en la cápsula del esporofito y son liberadas una vez alcanzada la madurez. Luego de ser liberadas germinan y forman filamentos, denominados protonema, y se forman nuevos gametofitos. (Tomada de www.cfg.uu.se/models_Physcomitrella.html)

1.3 Resultados previos de nuestro grupo

El grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular se ha centrado en el estudio de los mecanismos de defensa al estrés, tanto biótico, como abiótico en *Physcomitrella patens*. Debido que hasta el momento se desconoce qué función cumple el ácido salicílico en la defensa frente a patógenos, así como la función que cumplen genes homólogos a NPR1 en *P. patens*, hace unos años se decidió investigar la función de NPR1, en este organismo. A partir de análisis bioinformáticos se identificaron dos genes con homología a NPR1 en el genoma de *P. patens*, los cuales fueron denominados *PpNPL1* y *PpNPL2*. En estudios previos se generó un mutante *knockout* para el gen *PpNPL1* (García AV, 2005 y Castro et al datos no publicados) y estudios preliminares sugieren que este mutante (*Ppnpl1*) es más resistente a *B. cinerea* respecto al genotipo salvaje (Figura 5). A su vez, se observó que la expresión de dos genes con homología a PR1 en respuesta al tratamiento con SA se encuentra disminuida en el mutante *Ppnpl1*. Estos resultados sugieren que *PpNPL1* de *Physcomitrella* es importante para la vía señalización dependiente del SA (Castro et al., datos no publicados). Dado que en *P. patens*

existe otro gen con homología a NPR1, en este trabajo de tesis se propone anular la expresión de dicho gen en un *background* salvaje y en el mutante *Ppnp1* y evaluar la respuesta a patógenos en los mutantes simples y dobles.

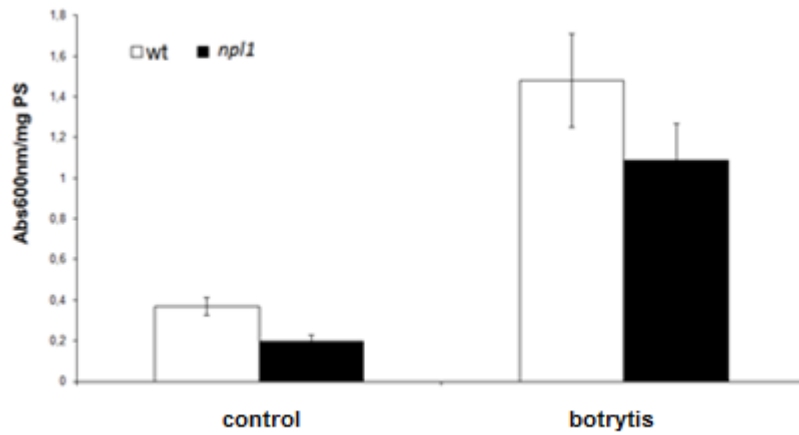


Figura 5. Evaluación de la muerte celular en plantas wt y mutante *Ppnp1* luego de 24 hs post-tratamiento con una suspensión de esporas de *B. cinerea* cuya concentración fue de 5×10^5 esporas/mL. Los tratamientos se realizaron con colonias de 3 semana crecidas en medio normal con celofán y las tinciones se realizaron como se describe en materiales y métodos. La captación de Evans Blue fue cuantificada por espectrofotometría. Para cada tratamiento se realizaron 2 ensayos independientes, se utilizaron 2 colonias por muestra y 5 medidas por tratamiento.

2. Objetivo general

Generación y caracterización de un mutante de un gen *PpNPL2* homólogo a *NPR1* en *Physcomitrella patens*.

Objetivos específicos

1. Análisis de la expresión del gen *PpNL2* en respuesta a diferentes tipos de estrés
2. Crear una construcción para anular la expresión del gen *PpNPL2*.
3. Generar mutantes de *P. patens* con expresión nula de *PpNPL2* en un genotipo salvaje y en un genotipo con expresión nula de *PpNPL1*.
4. Caracterización molecular de los mutantes generados.
5. Comparar la respuesta de defensa de las plantas mutantes y salvajes frente a la infección por diferentes patógenos.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizó el musgo *P. patens* tipo salvaje (Schaefer *et al.*, 1991) y la línea con expresión nula de *PpNPL1*, generado previamente en el laboratorio. Los cultivos vegetales, en estado de protonema y de colonia, fueron mantenidos y subcultivados *in vitro* en placas de petri con medio sólido Hoagland's [10 mL/L solución B, 10 mL/L solución C, 10 mL/L solución D, 10 mL/L tartrato de amonio 500 mM, 2mL/L CaCl₂ 500mM, 1mL/L micronutrientes, 10 g/L agar]. En algunos casos se colocó sobre el medio un celofán estéril. Toda propagación del material vegetal se realizó en flujo laminar y con material estéril. *P. patens* fue crecido a 22-24°C con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

3.1.2 Cepas y cultivos de microorganismos

Escherichia coli

Se utilizó la cepa comercial TOP10 (Invitrogen, San Diego, SA). Los cultivos de *E. coli* fueron incubados en medio Luria-Bertani (LB) [10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl] tanto líquido como sólido (15 g/L agar).

Las células de *E. coli* transformadas fueron incubadas en LB con ampicilina 100 µg/mL

3.1.3 Fitopatógenos

3.1.3.1 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Se utilizó la cepa SCC1 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (antiguamente denominada *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Rantakari, *et al.*, 2001)). Las bacterias fueron cultivadas en medio LB por 16 h a 28°C. Para obtener el filtrado de cultivo (CF) se inoculó un cultivo líquido de LB que se incubó con agitación a 28°C hasta alcanzar una densidad de 1x10⁸ ufc/mL (densidad óptica a 600 nm de 1.8-2.0). El cultivo bacteriano fue centrifugado a 3000g por 10 min, y el sobrenadante fue esterilizado por filtración (0,22 µm) y conservado en alícuotas a -20°C.

3.1.3.2 *Botrytis cinerea*

El hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) fue crecido en medio PDA (de Potato Dextrose Agar) (PDB comercial (Applichem); 1.5% agar). Las esporas se recogieron a partir de cultivos de aproximadamente 3 semanas crecidas a 22°C, resuspendidas en H₂O mQ (bidestilada) y se contaron en una cámara Improved-Neubauer. Para inocular se utilizó una concentración de 5x10⁵ esporas/mL.

3.1.3.3 *Pythium irregulare*

Pythium irregulare (*P. irregulare*) fue cultivado en PDA (Sigma) a 22°C. Plugs de agar de 0.5 cm de diámetro conteniendo micelio de *P. irregulare* fueron colocados sobre las colonias de *P. patens*.

3.2 Vectores y construcciones

Se utilizaron los siguientes vectores de clonación:

pCR2.1

Vector diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos amplificados por PCR por el sistema “TOPO TA Cloning®Kit” (Figura 6). Está diseñado para clonar productos de PCR generados por la enzima Taq polimerasa ya que posee un nucleótido de timina protruyente en posición 3´. Este vector fue utilizado para clonar las secuencias genómicas 5´ y 3´ del gen *PpNPL2*.

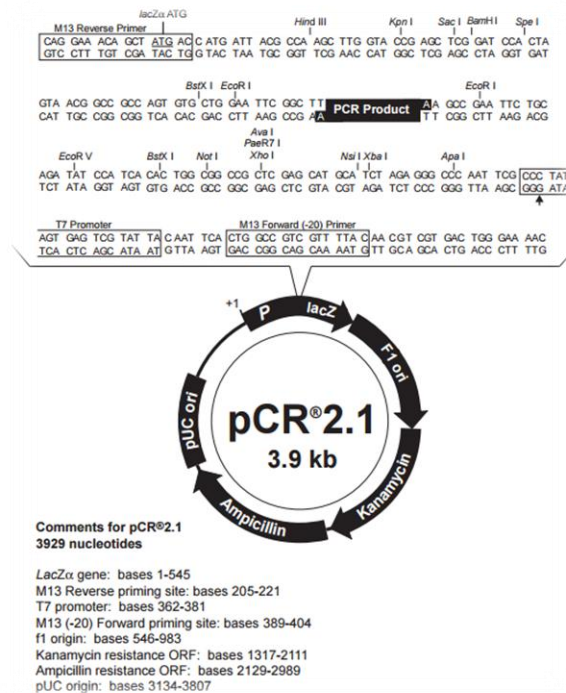


Figura 6. Mapa del vector de clonación pCR2.1 Se destacan las principales características: el promotor LacZα (bases 1-545), el sitio de hibridación del oligonucleótido M13 reverso (bases 205-221) y forward (bases 389-404), el origen de replicación F1 (bases 546-983), el promotor T7 (bases 362-381), el gen de resistencia a kanamicina (bases 1317-2111), el gen de resistencia a ampicilina (bases 2129-2989) y el origen de replicación del plásmido (bases 3134-3807). (Extraído de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>))

pMT123 vector de transformación

Se utilizó una construcción denominada pMT123, que tiene incorporada la región codificante del gen *hyg* (resistencia a higromicina) bajo el control del promotor constitutivo NOS1 (proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*) y la secuencia 3' no traducida del gen *ocs* (octopina sintetasa). Además posee dos sitios de multiclonado, uno en posición 5' respecto al gen de resistencia para higromicina y otro en posición 3' respecto a la secuencia 3' no traducida del gen *ocs* (Figura 7). El diseño de la construcción para la transformación consistió en la clonación de un fragmento 5' (941 pb) de ADN genómico de *PpNPL2* en posición 5' respecto al gen de resistencia para higromicina con las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII*, y de un fragmento 3' (963 pb) de ADN genómico de *PpNPL2* en posición 3' respecto a la secuencia 3' no traducida de *ocs* con las enzimas *XbaI* y *NotI*.

Este vector, pMT123, se utilizó para generar la construcción del mutante KO para el gen *NPL2*. El vector posee 5497 pb. Bajo la regulación del promotor NOS1 confiere resistencia a higromicina en plantas y en bacterias resistencia a ampicilina.

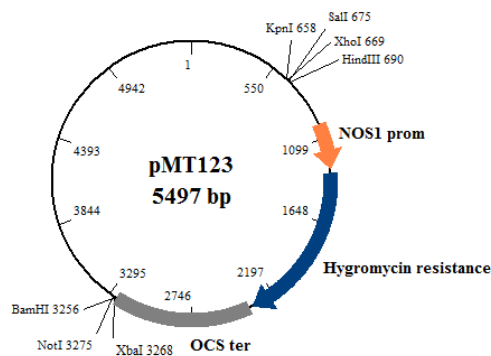


Figura 7. Mapa del vector pMT123. Se observa el promotor NOS1, el terminador OCS, la resistencia a higromicina y los sitios de corte de diferentes enzimas de restricción. (Creado con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor)

3.3 Obtención de ADN genómico a partir de tejido vegetal

La obtención de ADN genómico se realizó macerando 1-3 g de tejido vegetal en nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. Luego se resuspendió en 15 mL de buffer de extracción [100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol] y 1 mL SDS 20% con agitación suave y se incubó a 65°C por 15 min. Posteriormente se agregó 5 mL de KAc 5M, se mezcló y se incubó a 0°C durante 30 min. Luego se centrifugó a 5000 rpm durante 40 min. El sobrenadante a través de una gasa se traspasó a otro tubo que luego se le agregó 10 mL de isopropanol, se mezcló y se incubó a -20°C durante 30 min. A continuación se centrifugó 40 min a 7500 rpm en frío, lavó con 1 mL EtOH 70%, centrifugó nuevamente 5 min a 5000 rpm y se secó el pellet. Consecutivamente se resuspendió el pellet en 450 μ L buffer TE [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0] y 50 μ L NaCl 3 M e incubó a 37°C durante 30 min con 2 μ L RNasa. Posteriormente se extrajo una vez con un volumen de fenol y dos veces con un volumen de cloroformo. Luego se precipitó el ADN con 0.8 volúmenes de isopropanol, se centrifugó durante 1 min, lavó el pellet con EtOH 70% y se dejó secar. Finalmente se resuspendió el ADN en 100 μ L H₂O.

3.4 Obtención de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico se realizó mediante la utilización del kit comercial de extracción QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se realizaron a partir de cultivos bacterianos de 5 mL crecidos toda la noche a 37°C con agitación a partir de una colonia aislada.

3.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para visualizar el ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa teñidos con 0.5 µg/mL bromuro de etidio utilizando el buffer TAE 1X [40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA]. Todas las muestras se cargaron con *loading buffer* y el marcador de peso molecular utilizado para estimar el tamaño y la concentración de ADN presente fue el ADN del fago λ digerido con la enzima *Pst*I.

3.6 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa

La recuperación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR fueron realizadas en el termociclador Veriti de la casa comercial Applied Biosystems.

3.7.1 Amplificación de las regiones 5' y 3' para la generación de la construcción de reemplazo alélico en el gen *PpNPL2*

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mediante la PCR de las regiones 5' y 3' del gen *PpNPL2* de *P. patens* fueron diseñados en el laboratorio a partir de la secuencia del gen. La región 5' y 3' a amplificar del gen *NPL2* son de 941 pb y de 963 pb respectivamente. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µL utilizando 100 ng de ADN genómico de *P. patens*, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada cebador, 1.25 unidades de Taq ADN polimerasa, 1X buffer. La amplificación de la región 3' del gen *NPL2* se realizó utilizando el programa: 95°C 5 min; 40 ciclos: 95°C 1 min, 48°C 45 seg, 72°C 1 min; 72°C 7 min. La amplificación de la región 5' del gen *PpNPL2* se realizó utilizando el mismo programa y los cebadores 5'NPL2fw Y 5'NPL2rv, los cuales fueron diseñados algunas sustituciones nucleotídicas de forma de generar sitios de restricción para proporcionar una subclonación más sencilla en el vector pMT123. Para amplificar la región 3' se utilizaron los cebadores 3'NPL2fw y 3'NPL2rv con sitios de restricción para su posterior clonación. En el cebador 5NPL2fw se creó un sitio de restricción para *Xho*I, en 5NPL2rv el cebador se diseñó en un sitio de restricción para *Hind*III, en 3NPL2fw se creó un sitio de restricción para *Xba*I y 3NPL2rv se creó un sitio de restricción para *Not*I.

Los productos amplificados se analizaron y cuantificaron en geles de agarosa 1%, corroborándose los tamaños esperados para los fragmentos. Se extrajeron del gel y se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR2.1. La mezcla de ligación fue transformada en células competentes TOP10.

3.7.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo se describen a continuación (Tabla 1 y 2).

3.7.2.1 Amplificación del ADN genómico de *PpNPL2*

Para la amplificación de las regiones genómicas 5' y 3' del gen *PpNPL2* se diseñaron los oligonucleótidos que se indican a continuación. En minúscula se muestran los nucleótidos modificados para crear un sitio de restricción para las distintas enzimas.

Tabla 1. Secuencia que presentan los cebadores diseñados para la amplificación del gen *PpNPL2* de *P. patens*.

Nombre	Oligonucleótido (orientación 5'→3')
5NPL2fw	CTGATCTcGAgAACTCTCATAC
5NPL2rv	ACTGATTACAATAAAGCTTGATA
3NPL2fw	GCTTTATCTctAGAATCGAGGTC
3NPL2rv	GTCTATGgCgGCCGcATAGCATGG

3.7.2.2 Análisis de líneas mutantes del gen *PpNPL2* mediante PCR

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el fin de poder identificar fácilmente la presencia de la construcción en las líneas obtenidas. Los oligonucleótidos Hygfw e Hygrv son específicos de la construcción. Como control negativo se utilizó ADNg de plantas de genotipo salvaje. KO-NPL2fw y KO-NPL2rv corresponden a los oligonucleótidos diseñados para la región flanqueante por fuera de la inserción.

Tabla 2. Cebadores utilizados para el estudio de las líneas mutantes

Nombre	Oligonucleótido (orientación 5'→3')
Hygfw	CAAGACCTGCCTGAAACCGAAC
Hygrv	TTTGTTATTGTGGCGCTCTATCAT
KO-NPL2fw	GCTCAGATTTTCCGGAGATG
KO-NPL2rv	CCCTCTCAAATGGAGAACCA

3.8 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas y buffers utilizados pertenecen a la empresa Thermo-Fisher. Las digestiones mediante enzimas de restricción de los fragmentos de amplificados 5'NPL2, 3'NPL2 y del vector fueron realizadas según las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente se verificó que la digestión fuese correcta mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % y extraídos del gel mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.9 Construcción del vector de reemplazo alélico

Para realizar la construcción primero se clonó el fragmento 3'NPL2 en el vector pMT123 y luego el fragmento 5'NPL2. Esto se debe a las enzima de restricción *Xba*I que se utilizaron para clonar la región 3', corta en un sitio interno al fragmento 5'NPL2. Si primero se clona el fragmento 5'NPL2 en el vector pMT123, luego al realizar la digestión con *Xba*I y *Not*I para clonar el fragmento 3'NPL2 en el vector pMT123-5'NPL2 se va a observar que en vez de cortar una única vez la enzima *Xba*I en el sitio de multiclonado, va a cortar dos veces y por lo tanto se obtendría una construcción diferente.

El fragmento 3'NPL2 clonado en el vector pCR2.1 se digirió con las enzimas de restricción *Xba*I y *Not*I. También se digirió con estas enzimas el vector pMT123. Se confirmó la correcta digestión del fragmento y del vector mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y luego se realizó la extracción de la agarosa. Posteriormente se ligó el fragmento 3'NPL2 digerido con el vector pMT123 previamente digerido. Seguidamente la mezcla de ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes.

A continuación se procedió al clonado de la región 5'NPL2. Para ello, se digirió el ADN plasmídico de pMT123-3' y el pCR2.1-5'NPL2 con las enzimas *Xho*I y *Not*I. Se confirmó la correcta digestión, se procedió a su ligación y transformación de células TOP10. Las colonias

transformantes seleccionadas fueron crecidas en medio con ampicilina, se realizaron cultivos líquidos y minipreparaciones de forma de extraer el ADN plasmídico.

3.10 Ligación del ADN

La reacción de ligación se realizó utilizando una relación entre el vector y los fragmentos de 5:1. La primer ligación, entre el vector pMT123 y el fragmento 3'NPL2, se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL con 75 ng del vector, 60 ng de fragmento, buffer de ligación 5X y 1 unidad de T4 ADN ligasa (Invitrogen). Se incubó durante una hora a 24°C. La segunda ligación, entre el vector ya unido al fragmento 3'NPL2 y el fragmento sin unir 5'NPL2, se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL con 100 ng del vector+3'NPL2, 65 ng del fragmento 5', buffer T4 ligasa 5X y 0.5 unidades de T4 ligasa (Invitrogen). Se incubó una hora a 25°C.

3.11 Transformación de células competentes de *E. coli*

Las transformaciones se realizaron de acuerdo al protocolo brindado por el fabricante.

Se transformó 50 µL de células quimiocompetentes de *E. coli* Top10 con 10 µL de mezcla de ligación para cada una de las correspondientes ligaciones. Se incubó 30 min la mezcla en hielo, luego se realizó un shock térmico durante 30 seg a 42°C en un baño. A continuación se volvió a colocar en hielo y se agregó 250 µL de medio S.O.C. precalentado para luego incubarlo durante una hora a 37°C con agitación constante. Se sembró el cultivo en placas de LB/Amp que fueron incubadas a 37°C durante toda la noche (ON).

3.12 Transformación de *P. patens*

Se transformaron protoplastos de *P. patens* con la construcción correspondiente digerida con la enzima *KpnI* (Fermentas). Luego de la digestión con *KpnI* el ADN se purificó con columnas Qiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante. La transformación mediada por PEG se realizó según el protocolo descrito por Schaefer *et al.*, (1991) con algunas modificaciones puestas a punto en nuestro laboratorio. Para obtener los protoplastos se partió de 1 a 3 placas de tejido en estadio de protonema de 7 días, que habían sido subcultivadas sucesivamente por lo menos tres veces con intervalos de 7-10 días. El material vegetal fue incubado en una solución de D-manitol 8% con Driselasa (SIGMA) 0.2% a temperatura ambiente ON. La digestión fue filtrada sobre un colchón de sacarosa 0.44 M, se centrifugó a 80

g durante 10 min y se extrajo la interfase donde se encuentran los protoplastos. Se realizaron 3 lavados, uno con solución de D-manitol 8% y dos con solución CaPW (D-manitol 8%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM). Posteriormente, se contaron los protoplastos en una cámara de Neubauer, siendo la concentración ideal para la transformación 1.6×10^6 por mL. Luego se resuspendieron en solución 3M (D-manitol 0.49 M, MgCl_2 15 mM, MES 0.1% pH 5.6). En la transformación se utilizaron 300 μL de la suspensión de protoplastos a los que se le agregaron 10-30 μg de ADN. A continuación se agregaron 300 μL de la solución PEG (PEG 8000 40%, D-manitol 40%, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M, Tris-HCl 1 M pH 7.8), y se realizó el shock térmico a 45°C durante 5 min. Luego se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se realizó un lavado con la solución CaPW. Finalmente los protoplastos fueron resuspendidos en 300 μL de PRML (medio BCDAT conteniendo CaCl_2 10 mM y D-Manitol 8%) y 2.5 mL de PRMT (medio BCDAT conteniendo CaCl_2 10 mM, D-Manitol 8% y agar 0.5%), dispersados en placas de PRMB (medio BCDAT conteniendo D-Manitol 8% y agar 1%) e incubados con luz continua por 7-9 días.

Una vez llevada a cabo la transformación, los protoplastos se regeneraron en medio PRMB sin selección durante 5 días. Luego se transfirieron a medio con selección (Hoagland's con higromicina (Hyg) (SIGMA) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para realizar la primera ronda de selección que se llevó a cabo durante 12 días. A continuación se llevó a cabo un período de crecimiento sin selección (Hoagland's) durante 11 días. Finalmente los clones fueron colocados nuevamente en medio Hoagland's con selección (Higromicina) durante 14 días. Para las líneas que partieron del genotipo mutante *npl1* se utilizó también G418 en la última ronda de selección. En la primera ronda de selección se observaron diferencias en el crecimiento de los clones. Esto se debe a que los clones de crecimiento presentan una transformación inestable y los clones que presentan un crecimiento similar al que presenta el genotipo salvaje en medio sin selección poseen una transformación estable. El período siguiente a este, de crecimiento sin selección, se realiza para estimular a que los transformantes inestables pierdan la resistencia. Finalmente son nuevamente sometidos a otra ronda de selección ya que solamente van a continuar creciendo los transformantes estables.

3.13 Análisis molecular de las líneas de *P. patens* generadas

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa para verificar que las líneas generadas contuvieran la construcción. Para ello primero se realizó una PCR con cebadores que hibridan por dentro de la construcción de forma de verificar que está presente. Los cebadores diseñados para esta parte son Hygfw e Hygrv que hibridan dentro de la región que

confiere resistencia frente a higromicina. Luego se realizó una segunda PCR utilizando cebadores que hibridan por fuera de la construcción para verificar que la construcción se insertó una única vez y en el locus correcto.

La reacción de PCR para verificar inserción de la construcción se realizó en un volumen final de 25 μ L y contiene 100 ng de ADNg, 5 μ M de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa, 25 mM $MgCl_2$ y buffer taq 1 X. El programa utilizado fue: 95°C 5 min; 30 ciclos: 95°C 1 min, 60°C 30 seg, 72°C 1 min 20 seg; 72°C 7min.

Para verificar la interrupción del gen *NPL2* la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L y contiene 100 ng ADNg, 100 μ M de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (5u/ μ L) y 10X long PCR buffer. El programa utilizado fue: 94°C 5 min; 35 ciclos: 94°C 1 min, 56°C 30 seg, 68°C 4 min; 68°C 10min

3.14 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo

El método de transgénesis utilizado en *P. patens* involucra la generación de protoplastos, los cuales al regenerarse pueden llegar a fusionarse generándose variaciones en la ploidía de los mismos (Schween 2005). Para determinar el nivel de ploidía de las líneas generadas respecto a plantas salvajes de *P. patens* se realizó citometría de flujo. Para esto se tomó una colonia de cada línea vegetal crecida 3 semanas en condiciones normales y se picó con 1 mL de Woody Plant Lysis Buffer (WPB) [Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 mM; EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ 2 mM; NaCl 86 mM; Tritón 1 %; $K_2O_5S_2$ 10 mM; PVP10 1%]. La suspensión obtenida se incubó 15 min a 0°C y luego se pasó a través de un filtro de 0.45 μ m. Posteriormente se agregó 50 μ L de RNasa (concentración final: 1 mg/mL) y 50 μ L de ioduro de propidio (concentración final: 1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Esta suspensión se analizó mediante un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson, USA) del Servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. La adquisición de los datos y su posterior análisis fue efectuado con el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Se analizaron 5000 núcleos por muestra.

3.15 Detección de muerte celular

Se incubaron colonias de *P. patens*, que fueron previamente sometidas a tratamientos, en solución 0.05% Evans Blue durante 2 hs. Luego se lavaron 4 veces las colonias con H_2O mQ. Posteriormente, se colocaron en tubos las colonias de a pares en solución de destañido [1%

SDS, 50% metanol, 50% H₂O mQ] durante 30 min a 60°C, de forma de solubilizar el colorante unido a las células, y se mide la absorbancia del sobrenadante a 600 nm. Finalmente luego de haber colocado las colonias a 65°C durante 24 hs se pesaron las colonias para determinar su peso seco. Se determinó la relación densidad óptica a 600 nm/mg de peso seco (Castro *et al.*, 2009). Las gráficas se realizaron utilizando 5 puntos para cada tratamiento, donde cada punto consiste de una muestra de 2 colonias.

3.16 Análisis de la expresión génica

La información sobre el patrón de expresión de los genes de *P. patens* se obtuvo de la base de datos Genevestigator (Zimmerman *et al.*, 2004) que engloba un total de 74 experimentos de expresión génica por microarreglos de ADN en distintas situaciones. Esta base de datos permite, luego de ingresar el número de acceso del gen de estudio, hacer una compilación de todos los experimentos en los que aparece dicho gen y los clasifica según tejidos donde se exprese, o tratamientos de estrés. Esta base de datos posee herramientas para crear ese resultado en forma gráfica y resumida.

3.17 Análisis de datos

La secuenciación de los distintos clones seleccionados fue realizada en el secuenciador automático del Instituto Pasteur (Montevideo, Uruguay). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>) y con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante BLASTN (compara la secuencia nucleotídica con bases de datos nucleotídicas) y BLASTX (compara la secuencia nucleotídica traducida a todas las pautas de lectura con bases de datos proteicas). Para el alineamiento y edición de secuencias se utilizó el programa BioEdit versión 7.0.0 (Hall, 1999).

4. Resultados y discusión

4.1 Predicción de la función del gen *PpNPL2*

El gen *Phypa_31431*, denominado *PpNPL2*, se encuentra en el scaffold 234, posee 4652 pb y consta de 6 exones y 5 intrones (Figura S1). *PpNPL2* codifica para una proteína deducida de 601 aa aminoácidos con dos dominios de interacción proteína-proteína (dominio BTB y dominio anquirina) (Figura 8). Comparte un nivel de identidad del 55.1% con la *PpNPL1* y un 45.4% con la *AtNPR1* de *Arabidopsis* (Figura 9).

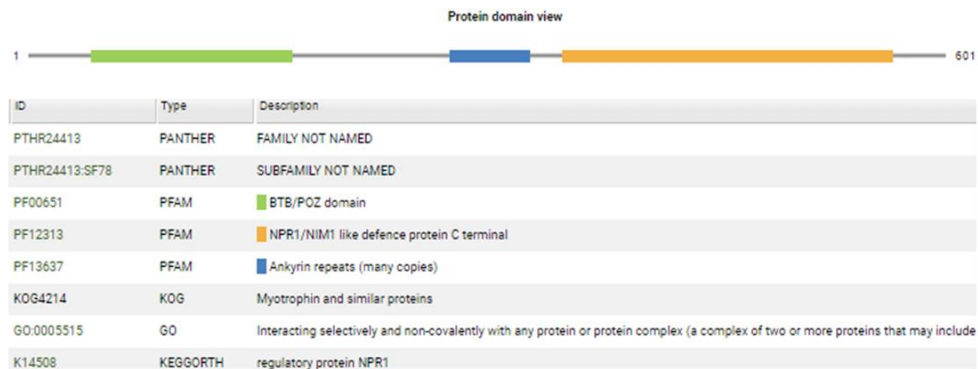


Figura 8. Estructura de la proteína *PpNPL2* obtenida del Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Se observan el dominio BTB/POZ, los repetidos de anquirina y la proteína C terminal NPR1/NIM1 like de defensa.



Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de las proteínas codificadas por los genes de *P. patens* con alta homología a NPR1 de *Arabidopsis* (AT1G64280). El sombreado oscuro muestra identidad de secuencia $\geq 95\%$ y el sombreado claro muestra elevada similitud. En los recuadros en naranja se observan las cisteínas 82 y 216 de *AtNPR1* involucradas en la formación del estado oligomérico y en verde el dominio conservado NIMIN1/NIMIN2 binding site.

4.1.1 Análisis de la expresión génica de *PpNPL2*

Se utilizó la herramienta informática GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) para extraer de las bases de datos información sobre la expresión del gen *PpNPL2* en diferentes condiciones de crecimiento y estrés, basada en el análisis de microarreglos de ADN (Figura 10).

Respecto a su expresión en los distintos estadios de desarrollo, los resultados indican que *PpNPL2* tiene un mayor nivel de expresión en la fase gametofítica (Figura 10 A). El perfil de expresión del gen *PpNPL2* frente a diferentes condiciones de estrés abiótico indica que el gen se induce en condiciones de oscuridad, deshidratación, rehidratación y en protoplastos (Figura 10 B).

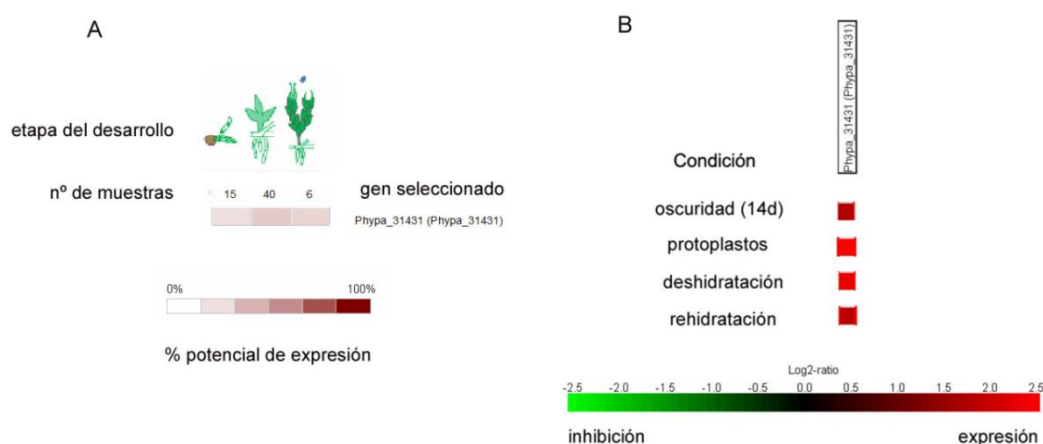


Figura 10. Expresión del gen *PpNPL2*. A) Expresión de *PpNPL2* en las diferentes etapas del ciclo de desarrollo de *P. patens*. B) Expresión de *PpNPL2* bajo diferentes condiciones de estrés. En rojo se observan las condiciones bajo las cuales el gen se expresa. (Obtenida del GENEVESTIGATOR (<http://genevestigator.com>)).

4.2 Construcción del vector de reemplazo alélico en el gen *PpNPL2*

Con el objetivo de estudiar la función del gen *PpNPL2* se construyó un vector de reemplazo alélico para generar un mutante “*knock out*” (KO). Para la construcción se utilizó el vector de reemplazo pMT123. El gen de resistencia a higromicina actúa bajo el control del promotor constitutivo del gen nopalina sintasa 1 (NOS1).

Se obtuvieron seis clones y se confirmó la presencia del inserto mediante PCR y digestión con las enzimas correspondientes (Figura 11A y B). Para los 6 clones de pMT123-3’NPL2 sólo se observó la amplificación del inserto para los clones 2, 3 y 6 (Figura 11 A). Se realizó cultivo líquido del clon 3 y se procedió al análisis de la presencia del inserto mediante análisis de restricción con las enzimas *Xba*I y *Not*I. Se observó la presencia del inserto entre las

bandas de peso molecular de 805 pb y 1159 pb. El tamaño de esta banda se corresponde con la banda encontrada en el control positivo (Figura 11 B).

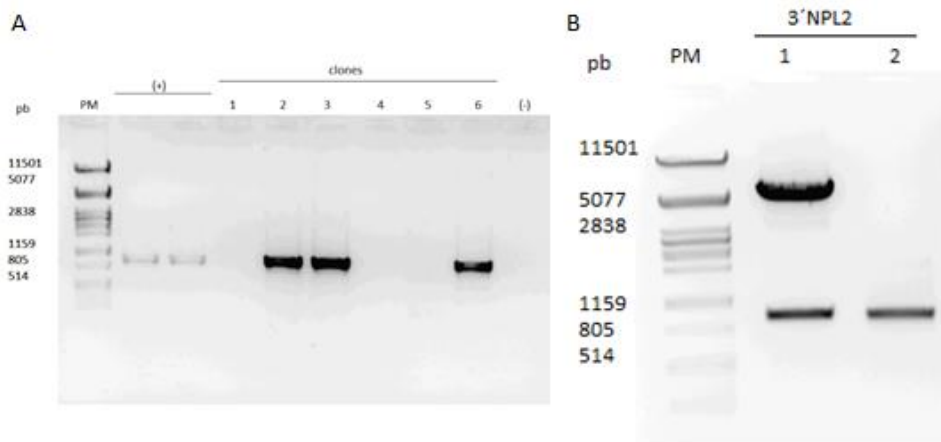


Figura 11. Geles de agarosa 1% teñidos con BrEt. Clonado del fragmento 3'NPL2 en el vector pMT123. A) Análisis de la presencia del inserto 3'NPL2 de 963 pb mediante PCR utilizando los cebadores 3'NPL2fw y 3'NPL2rv. El carril (+) corresponde al control positivo. Los carriles 1-6 corresponden a los clones y el último carril corresponde al control negativo. B) Análisis de la presencia de insertos en el vector pMT123 mediante restricción con *Xba*I y *Not*I. Carril 1: pMT123-3'NPL2. Carril 2: inserto 3'NPL2 purificado de 963 pb.

En cuanto a los clones pMT123-5'3'NPL2 solamente se observó amplificación del inserto para el clon 1 (Figura 12 A). Para el análisis del clon 1 de pMT23-5'3'NPL2 se utilizaron las enzimas *Xho*I y *Hind*III. Se observó la presencia del inserto entre las bandas de peso molecular de 805 pb y 1159 pb. El tamaño de esta banda se corresponde con la banda encontrada en el control positivo (Figura 12 B).

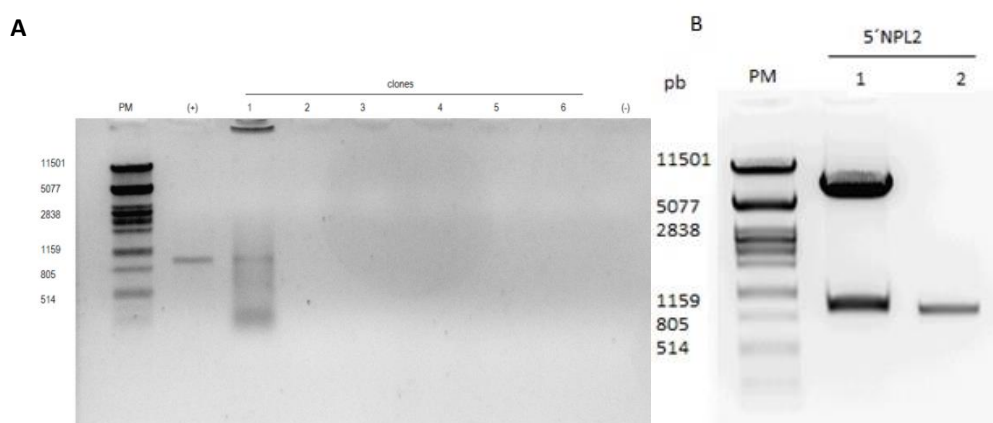


Figura 12. Geles de agarosa 1% teñidos con BrEt. Clonado del fragmento 5'NPL2 en el vector pMT123-3'NPL2. A) Análisis de la presencia del inserto 5'NPL2 de 941 pb mediante PCR utilizando los cebadores 5NPL2fw y 5NPL2rv. El carril (+) corresponde al control positivo. Los carriles 1-6 corresponden a los clones y el último carril corresponde al control negativo. B) Análisis de la presencia de insertos en el vector pMT123 mediante restricción con *Xho*I y *Hind*III. Carril 1: pMT123-5'3'NPL2. Carril 2: inserto 5'NPL2 purificado de 941 pb.

Se confirmó que los fragmentos se encuentran correctamente insertados y se obtuvo una construcción para el reemplazo alélico de *PpNPL2* para generar un mutante “*knockout*” para el gen *PpNPL2* (Figura 13).

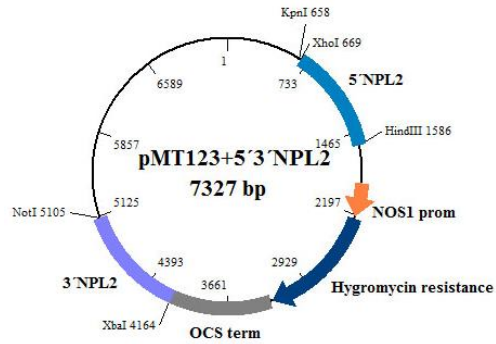


Figura 13. Mapa de la construcción pMT123-5'3'NPL2. En naranja se marca el promotor NOS1, en azul oscuro la resistencia a Hyg, en gris el terminador OCS, en celeste oscuro el fragmento 5'NPL2 y en celeste claro el fragmento 3'NPL2.

4.3 Transformación de protoplastos de *P. patens*

La transformación de *P. patens* se realizó a partir de protoplastos (Figura 14). Los protoplastos son células vegetales que carecen de pared celular haciéndolos perfectos para la transferencia de ADN. Al carecer de pared, el ADN ingresa a través de la membrana plasmática gracias al agregado de polietilenglicol (PEG).

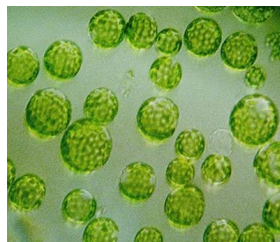


Figura 14. Fotografía de protoplastos. Se puede observar la ausencia de pared celular.

Luego de realizados los experimentos de transformación y las rondas de selección, se obtuvieron 3 clones a partir del genotipo salvaje y 7 clones a partir del mutante *Ppnpl1* (Figura 15 C y D).

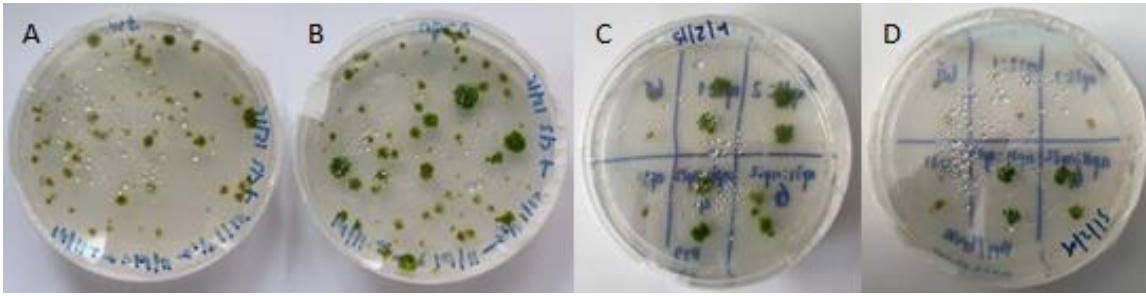


Figura 15. Crecimiento de los clones de *P. patens* que sobrevivieron a la segunda etapa de selección con higromicina. A) Clones de *npl2* durante la segunda ronda de selección con Higromicina. B) Clones de *npl1:npl2* durante la segunda ronda de selección con Higromicina. C) Clones de *npl2* y de *npl1:npl2* que sobrevivieron a la segunda ronda de selección creciendo en medio con Higromicina. D) Clones de *npl2* y de *npl1:npl2* que sobrevivieron a la segunda ronda de selección creciendo en medio con Higromicina y G418.

4.4 Análisis de los transformantes mediante PCR

A partir de los clones que sobrevivieron la segunda ronda de selección, se realizaron las extracciones de ADN genómico para poder realizar el análisis por PCR de dichos transformantes.

El análisis por PCR se realizó utilizando ADN genómico de *P. patens* con genotipo salvaje, con genotipo *npl1*, de los posibles mutantes para *npl2* y también para *npl1:npl2*. Se utilizó cebadores específicos que hibridan por dentro de la construcción (5'Hyg y 3'Hyg) y otro conjunto de cebadores que hibridan por fuera de la construcción (KO-NPL2fw y KO-NPL2rv) (Figura 16).

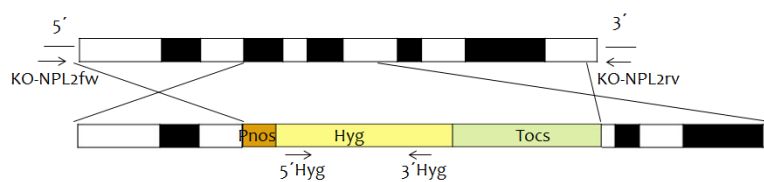


Figura 16. Representación esquemática de la secuencia genómica salvaje del gen *PpNPL2* y de la construcción génica. Los cuadrados blancos representan los exones, los cuadrados negros los intrones. La posición de los oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR de plantas salvajes y clones transformantes están indicados con flechas negras

Se utilizaron cebadores 5'Hyg y 3'Hyg que hibridan dentro de la construcción para confirmar su presencia (Figura 17 A). Se logró la amplificación con este set de cebadores para los clones 1, 2 y 3 de *npl2* y para los clones 4,5 y 6 de *npl1:npl2*, correspondiente al tamaño aproximado de 805 pb. Cuando se utilizaron cebadores que hibridan por fuera (KO-NPL2fw y KO-NPL2rv, tabla 2) para confirmar que hubo un reemplazo alélico y que la inserción fue única,

se observó amplificación para los clones 1,2 y 3 de *npl2* y los clones 4, 5 y 6 de *npl1:npl2* (Figura 17 B). Sin embargo, para el clon 3 de *npl2* y el clon 5 de *npl1:npl2* se observaron dos bandas, lo que podría indicar que un protoplasto transformado se fusionó con uno no transformado.

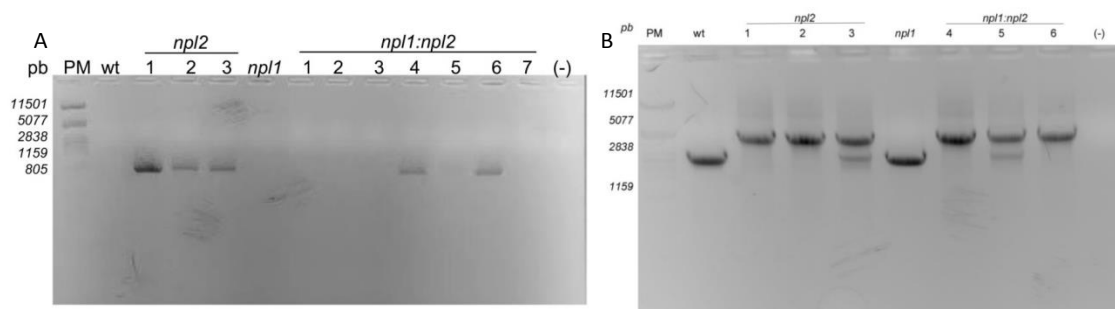


Figura 17. Geles de agarosa 1% teñidos con BrEt A) Análisis por PCR de *P. patens* salvaje, mutantes *npl2*, *npl1* y *npl1:npl2* con cebadores para Higromicina, ADN genómico wt, los clones 1, 2 y 3 del mutante *npl2*; mutante *npl1*; los clones mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del mutante *npl1:npl2*; control negativo. B) Análisis por PCR de *P. patens* salvaje y los clones 1, 2 y 3 del mutante *npl2*; mutante *npl1*; los clones mutantes 4, 5 y 6 del mutante *npl1:npl2*; control negativo con el par de cebadores que hibridan por fuera de la construcción.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo permiten demostrar que la construcción de reemplazo alélico se insertó correctamente en el genoma de *P. patens* generando la interrupción del gen. Los clones positivos 1 y 2 para el mutante simple *npl2*, fueron denominados *npl2_1* y *npl2_2*, y los clones 4 y 6 para el mutante doble *npl1:npl2*, fueron denominados *npl1:npl2_4* y *npl1:npl2_6*, respectivamente.

4.5 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo

Durante la transformación de *P. patens* se pueden generar plantas poliploides a causa de la fusión de protoplastos (Schween, 2005). Mediante citometría de flujo se puede chequear el nivel de ploidía de las plantas mutantes generadas en comparación con el de plantas salvajes. En este estudio se observó que las plantas *npl2* y *npl1:npl2* son haploides, al igual que las plantas salvajes (Figura 18).

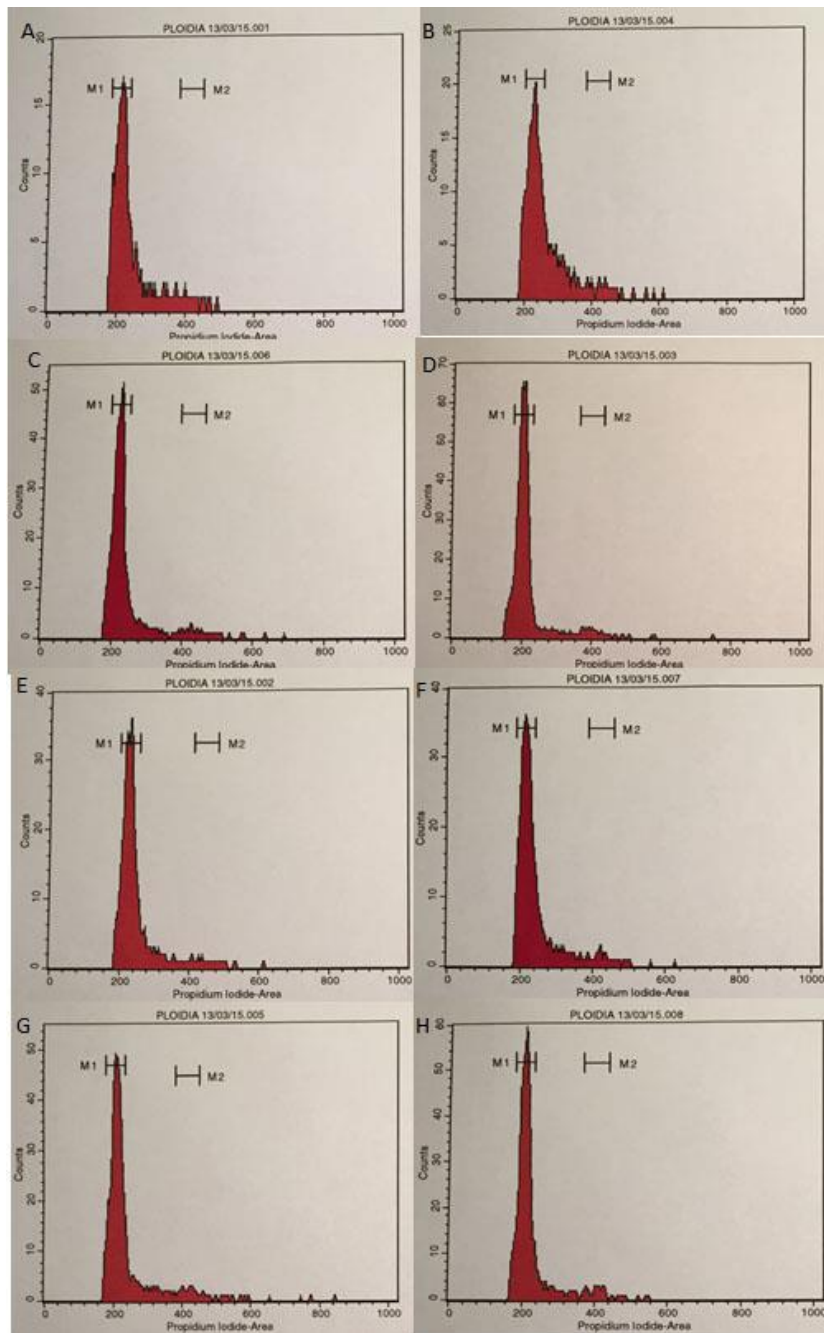


Figura 18. Gráfica obtenida por citometría de flujo. M1 corresponde a las células haploides y M2 corresponde a células diploides. A. plantas con genotipo wt, B. plantas con genotipo *np12_1*, C. plantas con genotipo *np12_2*, D. plantas con genotipo *np12_3*, E. plantas con genotipo *np11*, F. plantas con genotipo *np11:np12_4*, G. plantas con genotipo *np11:np12_5*, H. plantas con genotipo *np11:np12_6*.

4.6 Análisis de la susceptibilidad de las plantas mutantes *np12* comparado con plantas salvajes en respuesta a patógenos

La obtención de un mutante *Ppnp12* permitió comenzar con el análisis para identificar algún fenotipo asociado a la mutación generada.

Lo primero que se analizó fue el crecimiento de *P. patens* salvaje (wt) y del mutante *Ppnpl2* en condiciones óptimas de crecimiento, no encontrándose diferencias en el crecimiento de las colonias, así como tampoco en la morfología del protonema, hojas o rizoides.

Para determinar si las líneas generadas presentan una alteración en los niveles de muerte celular generados por patógenos respecto a plantas wt, se trataron colonias wt y mutantes con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*, así como para la suspensión de esporas de *B. cinerea* y los plugs conteniendo el micelio de *P. irregulare*. Se realizaron cinco experimentos independientes y las tinciones con Evans Blue se realizaron a las 24 horas post-tratamiento. Los resultados obtenidos para los tratamientos con los distintos patógenos se muestran en la Figura 19. Para el caso del tratamiento con *P. irregulare*, si bien se observa que hubo una mayor infección, parecería no haber diferencia entre los fenotipos expresados por los distintos genotipos. Sin embargo para el caso del tratamiento con *B. cinerea*, si bien no hubo una diferencia en los niveles de muerte celular, si se observaron diferencias en la proliferación del patógeno entre los genotipos.

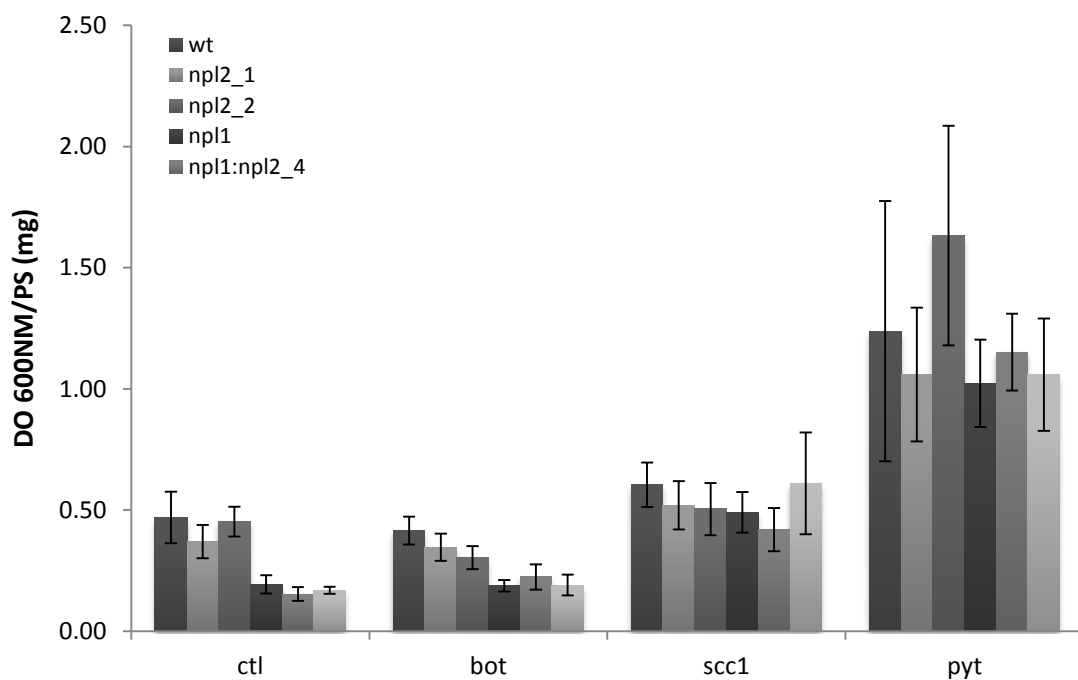


Figura 19. Evaluación de la muerte celular en plantas wt y mutante *Ppnpl2* y *Ppnpl1:Ppnpl2* luego de 24 hs post-tratamiento. Se realizaron 3 tratamientos distintos (Ctl: control, bot: *B. cinerea*, scc1: *Pcc*, pyt: *P. irregulare*). Los tratamientos se realizaron con colonias de 3 semanas crecidas en medio normal con celofán y las tinciones se realizaron como se describe en materiales y métodos. La captación de Evans Blue fue cuantificada por espectrofotometría. Mayor DO corresponde a mayor muerte celular. Para cada tratamiento se realizaron 6 ensayos independientes. En distintos tonos de gris se muestran los distintos genotipos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se realizó el experimento nuevamente, pero esta vez solo tratando colonias de *P. patens* con una suspensión de esporas de *B. cinerea* y evaluando los síntomas a las 24 y 48 hs. y los niveles de muerte celular a las 24 horas postratamiento. Después de 48 horas de la inoculación, el micelio de *B. cinerea* creció notoriamente en la parte superior de colonias de genotipo wt, siendo mucho menor el crecimiento en los mutantes (Figura 20).

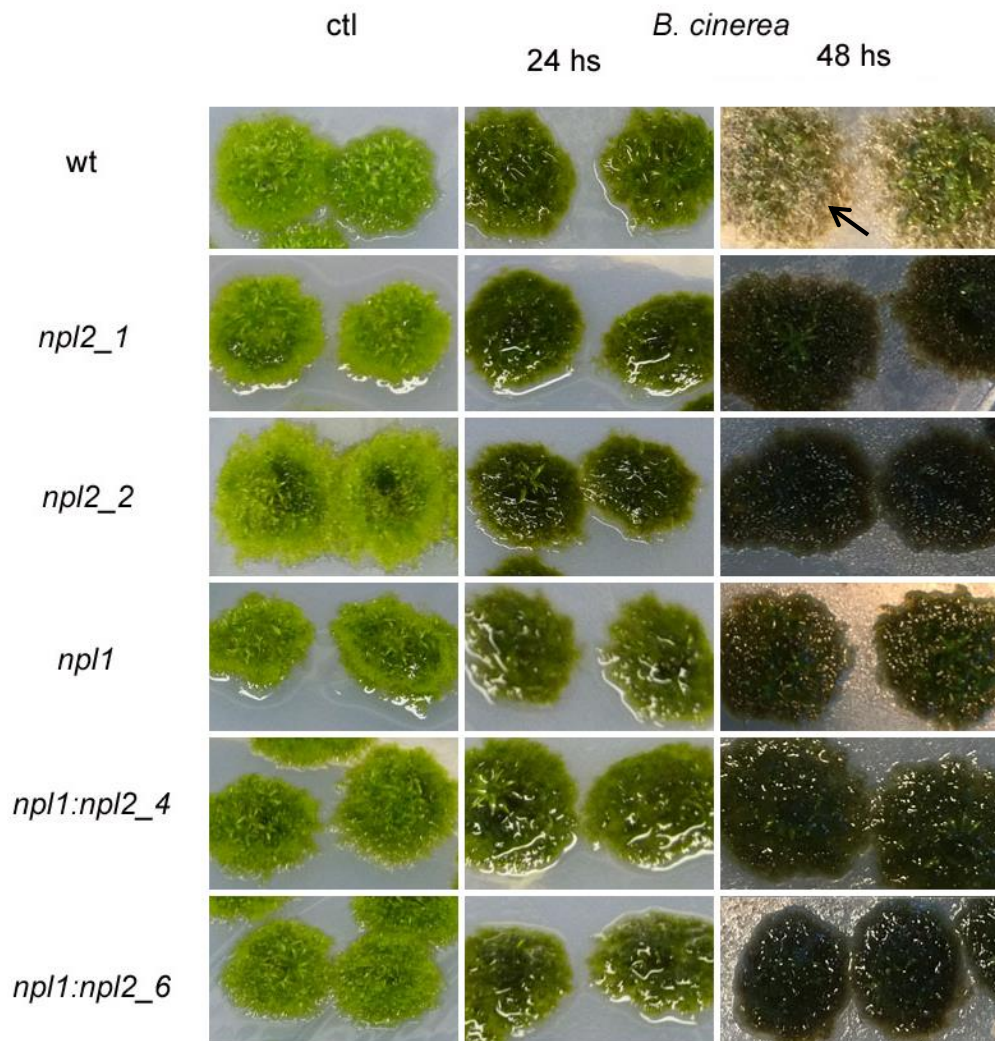


Figura 20. Colonias de 3 semanas crecidas en celofán de *P. patens* salvajes y líneas KO inoculadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea*. Se muestran los síntomas para los diferentes genotipos a 24 y 48 hs. La flecha negra indica la presencia de micelio en las colonias de genotipo wt de *P. patens* para el tratamiento a 48 hs.

Los genotipos mutantes, *npl2* y *npl1:npl2* presentarían una tendencia a poseer una mayor resistencia frente a la infección por *B. cinerea* ya que presentaron menor cantidad de síntomas y menores niveles de muerte celular en comparación con plantas wt (Figura 21).

Dentro de los genotipos mutantes también se observaron diferencias. El genotipo *npl2* parecería tender a ser menos resistente a *B. cinerea*, respecto a los genotipos *npl1* y *npl1:npl2*.

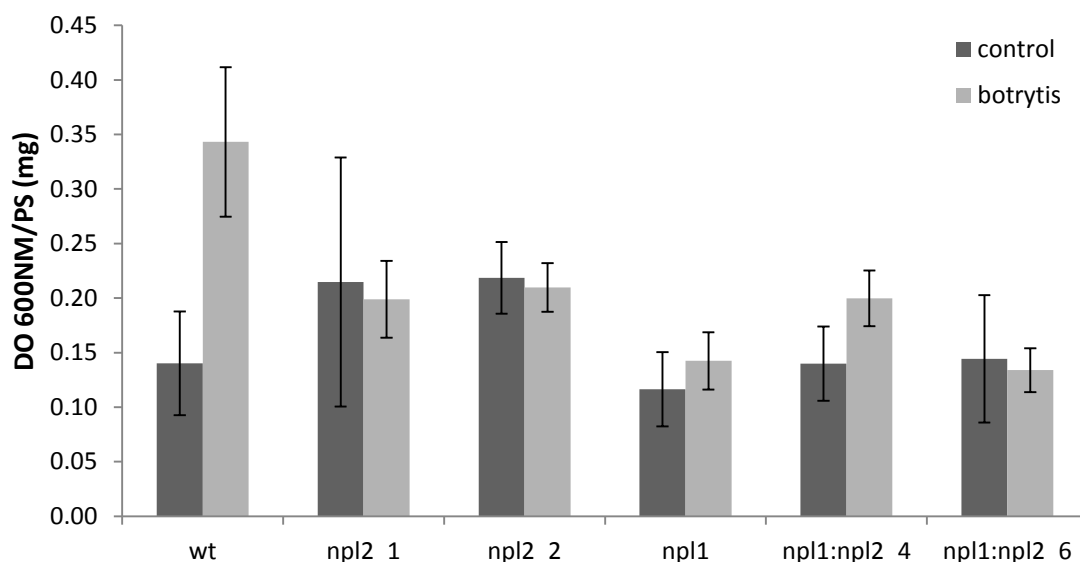


Figura 21. Evaluación de la muerte celular en plantas wt y mutante *Ppnpl2* y *Ppnpl1:Ppnpl2* luego de 24 hs post-tratamiento con una suspensión de esporas de *B. cinerea*. Los tratamientos se realizaron con colonias de 3 semana crecidas en medio normal con celofán y las tinciones se realizaron como se describe en materiales y métodos. La captación de Evans Blue fue cuantificada por espectrofotometría. Para cada tratamiento se realizaron 6 ensayos independientes.

Estos resultados sugieren que *PpPNL2* de *P. patens* podría actuar como un regulador negativo de la muerte celular que ocurre tras la inoculación con *B. cinerea*. Es importante destacar, que *B. cinerea* desencadena muerte celular en los tejidos de *P. patens* con características de PCD (Ponce de León et al., 2007; Ponce de León et al., 2012).

Sería interesante cuantificar el patógeno mediante ensayos de PCR en tiempo real y poder relacionar estos resultados con los obtenidos en los ensayos de muerte celular y observar de esta manera si *B. cinerea* se encuentra en menor concentración en plantas *Ppnpl2* en relación con plantas wt. También se podría analizar la sensibilidad de los mutantes *Ppnpl2* y *Ppnpl1:npl2* frente a la adición de SA y análogos. Finalmente, sería interesante determinar cómo participa *PpNPL2* en la vía de señalización del ácido salicílico en *P. patens*.

5. Conclusiones

El trabajo de tesis estuvo destinado a la generación de un mutante de pérdida de función para el gen *PpNPL2* de *Physcomitrella patens* y su caracterización funcional. Se observó el crecimiento del genotipo salvaje y del mutante *PpNPL2*, no hallando diferencias en las colonias, protonema, hojas ni rizoides. Los estudios fenotípicos realizados indican el que el mutante *PpNPL2* presentó mayor resistencia que el genotipo salvaje tras la inoculación con el hongo necrótrofo *B. cinerea*, por lo que se deduce que *PpNPL2* podría actuar como regulador negativo de la muerte celular.

Las actividades que se realizaron para poder llegar a esta conclusión fueron las siguientes:

- Generación de un vector de reemplazo para el gen *PpNPL2*.
- Transformación de protoplastos de *P. patens* genotipo salvaje y *Ppnpl1* con la construcción pMT123-5'3'NPL2.
- Caracterización molecular de las líneas transgénicas generadas
- Estudios fenotípicos en respuesta a patógenos de las líneas mutantes en comparación con plantas salvajes.

6. Perspectivas futuras

- Realizar estudios de *Southern blot* para determinar el número de copias de la construcción en el genoma de *P. patens*.
- Cuantificar el micelio de *B. cinerea* mediante qPCR en plantas salvajes y mutantes.
- Realizar estudios de localización subcelular para determinar si *PpNPL2* se ubica en el núcleo.
- Analizar la respuesta del mutante *Ppnp12* frente a la adición de SA.
- Analizar el perfil de expresión de genes marcadores de la vía del SA en plantas salvajes y mutantes.

7. Bibliografía

- Apel K., Hirt H. (2004) Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373–399
- Bonas U., Lahaye T. (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol.* 5(1):44-50.
- Bowling S., Guo A., Cao H., Gordon A., Klessig D., Dong X. (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell.*6:1845-57.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X. (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 6(11):1583-1592.
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J.D., Volko S., Dong X. (1997) The *Arabidopsis* NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *Cell.* 88: 57–63.
- Castro A, Oliver JP, Gaggero C, Cascón T, Schmelz EA, Castresana C, Ponce de León I. (2009) *Planta* 230, 569-579
- Clarke J., Liu Y., Klessig D., Dong X. (1998) Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis* cpr6-1 mutant. *Plant Cell.* 10:557-69.
- Cove, D. J., Knight C. D., Lamparter T (1997). "Mosses as model systems". *Trends Plant Sci* 2: 99-105.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., and Ryals, J.A. (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6602-6606.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-8.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) *Ann. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501.
- Dong X. (2004) NPR1, all thing considered. *Curr Opin Plant Biology.*7: 547-552.
- Feys B., Parker J. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16:449-55.
- Fobert P.R., Després C. (2005) Redox control of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biology.* 8:378-382.
- García AV (2005) Maestría en Biología PEDECIBA, subárea Biología Molecular y Celular.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M. (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143: 973-982.
- Heath M. C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol.* 3(4):315-9.

- Herrera-Vásquez A., Salinas P., Holuigue L. (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6:171.
- Janda M., Ruelland E. (2015) Magical mystery tour: Salicylic acid signaling. *Environmental and Experimental Botany.* 114:117-128.
- Keen N. (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet.* 24:447-63.
- Kesarwani M., Yoo J., Dong X. (2007) Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 144(1):336-46.
- Kinkema M., Fan W., Dong X. (2000) Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression. *The Plant Cell.* 12: 2339–2350.
- Knight C.D., Perroud P.F., Cove D.J. (2009) Annual plant reviews: The Moss *Physcomitrella Patens*. Oxford: Wiley-Blackwell. Vol. 36
- Kumar D. (2014) Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science.* 228:127-134.
- Lamb C., Dixon R. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:251-275.
- Le Henanff G., Farine S., Kieffer-Mazet F., Miclot A.S., Heitz T., Mestre P., Bertsch C., Chong J. (2011) *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta.* 234: 405–417.
- Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B., Chong J. (2009) Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BMC Plant Biology.* 9(54).
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J.* (1998) 16(2):223-33.
- Loake G., Grant M. (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology.* 10: 466-472.
- Mach J. (2015) Phosphorylation and Nuclear Localization of NPR1 in Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell.* 27:3291.
- Maier F., Zwicker S., Hüchelhoven A., Meissner M., Funk J., Pfitzner A.J.P., Pfitzner U.M. (2011) NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Molecular Plant Pathology.* 12(1): 73–91.
- McDowell J., Dangl J. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci.* 25:79-82.
- Métraux J.P., Raskin I. (1993). Role of phenolics in plant disease resistance. *Biotechnology in Plant Disease Control*, ed. I Chet, 11:191–209.

- Meur G., Budatha M., Srinivasan T., Kumar K.R.R., Gupta A.D., Kirti P.B. (2008) Constitutive expression of Arabidopsis NPR1 confers enhanced resistance to the early instars of *Spodoptera litura* in transgenic tobacco. *Physiologia Plantarum*. 133: 765–775.
- Peleg-Grossman S., Melamed-Book N., Cohen G., Levine A. (2010) Cytoplasmic H₂O₂ prevents translocation of NPR1 to the nucleus and inhibits the induction of PR genes in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*. 5(11): 1401-1406.
- Ponce de León I, Schmelz E, Gaggero C, Castro A, Alvarez A, Montesano M (2012) *Molecular Plant Pathology*. 13(8): 960-974.
- Ponce de León I., Oliver JP, Castro A., Gaggero C, Bentancor M., Vidal V. (2007) *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*. 7:52.
- Quilis J., Peñas G., Messeguer J., Brugidou C., San Segundo B. (2008) The Arabidopsis AtNPR1 Inversely Modulates Defense Responses Against Fungal, Bacterial, or Viral Pathogens While Conferring Hypersensitivity to Abiotic Stresses in Transgenic Rice. *The American Phytopathological Society*. 21(9): 1215–1231.
- Rangel Sánchez G., Castro Mercado E., Beltran Peña E., Reyes de la Cruz H., García Pineda E. (2010) El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. 12(2):90-95
- Rantakari A., Virtaharju O., Vähämiko S., Taira S., Palva E. T., Saarilahti H. T., Romantschuk M. (2001) Type III secretion contributes to the pathogenesis of the softrot pathogen *Erwinia carotovora*: Partial characterization of the hrp gene cluster. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 14:962-968.
- Raskin I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 43: 439-463.
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P., Lindquist E., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T., Oishi K., Shin-I T., Kuroki Y., Toyoda A., Suzuki Y., Hashimoto S., Yamaguchi K., Sugano S., Kohara Y., Fujiyama A., Anterola A., Aoki S., Ashton N., Barbazuk W.B., Barker E., Bennetzen J., Blankenship R., Cho S.H., Dutcher S.K., Estelle M., Fawcett J., Gundlach H., Hanada K., Heyl A., Hicks K.A., Hughes J., Lohr M., Mayer K., Melkozernov A., Murata T., Nelson D., Pils B., Prigge M., Reiss B., Renner T., Rombauts S., Rushton P.J., Sanderfoot A., Schween G., Shiu S.H., Stueber K., Theodoulou F., Tu H., Van de Peer Y., Verrier P.J., Waters E., Wood A., Yang L., Cove D., Cuming A., Hasebe M., Lucas S., Mishler B., Reski R., Grigoriev I., Quatrano R., Boore J. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 319:64-9.
- Reski R. (1998). Development, genetics and molecular biology of mosses. *Botanica Acta* 111, 1-15.
- Robinson SA., Wasley J. and Tobin AK. (2003) "Living on the edge-plants and global change in continental and maritime Antarctica". *Global Change Biol*. 9: 1681-1717
- Rochon A., Boyle P., Wignes T., Fobert P.R., Despres C. (2006) The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell*. 18(12): 3670-3685.

- Ross A. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-358
- Ryals J., Neuenschwander U., Willits M., Molina A., Steiner H., Hunt M. (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*. 8:1809-1819.
- Schaefer D. G. (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol* 53: 477-501.
- Schaefer D., Zryd J. P., Knight C. D., Cove, D. J. (1991) Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*. 226:418-24.
- Schween G., Egner T., Fritzowsky D., Granado J., Guitton M.C., Hartmann N., Hohe A., Holtorf H., Lang D., Lucht J.M., Reinhard C., Rensing S.A., Schlink K., Schulte J., Reski R. (2005) Large-scale analysis of 73329 gene-disrupted *Physcomitrella* mutants: production parameters and mutant phenotypes. *Plant Biology*, 7(3): 238–250.
- Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F. (1999). The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell*. 11: 191-206.
- Shi Z., Maximova S.N., Liu Y., Verica J., Gultinan M.J. (2010) Functional analysis of the *Theobroma cacao* NPR1 gene in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*. 10(248).
- Silva K. J. P., Brunings A., Peres N.A., Mou Z., Folta K.M. (2015) The Arabidopsis NPR1 gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry. *Transgenic Res*. 24:693–704
- Thordal-Christensen H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol*. 6:351-7.
- Van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J., Mur L.A.J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotosky B., Bozhkov P.V. (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ*. 18: 1241-1246.
- Verberne M.C., Verpoorte R., Bol J.F., Mercado-Blanco J., Linthorst H.J.M. (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*. 18: 779–783.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessi D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414: 562-571.
- Wu Q., Wang X.Z., Tang Y.Y., Yu H.T., Ding Y.F., De Yang C., Cui F.G., Zhang J.C., Wang C.T. (2014). Molecular cloning and characterization of NPR1 gene from *Arachis hypogaea*. *Mol Biol Rep*. 41:5247–5256
- Xia S., Zhu Z., Hao L., Chen J., Xiao L., Zhang Y., Li X. (2009) Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor C subunit3 in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 150:2009-17.

- Yan S., Dong X. (2014) Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Cur Opin Plant Biol.* 0:64-68.
- Yang Y., Shah J., Klessig D. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-39.
- Yuan Y., Zhong S., Li Q., Zhu Z., Lou Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q., Yang, D., He, Z. (2007) Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1 / NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal.* 5: 313–324.
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L., Gruissem W. (2004) GENEVESTIGATOR: Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* 136 (1): 2621-2632

8. Anexo

8.1 Figuras suplementarias

GATTGTGTGCATGATGTCATATAAATTTACATAAATTTAACGAAACAGTACCGAACGGTGTGAAAGTGGAGAAGAAGAAGCAGAAGAAGAAGGGCGCGTT
AGGAAACCAAGTTCTGAAGTTTGTTCGTTTGTGTTTTGTTTTTCTGTTGCTGTATTGTTGGAGGATAAAGGTGACGAAGCAGATGGGGTTGGGCAGGG
GTTATAAATGCAAGTGGTGAACAAGTGGTCTGGGTATTCGGGGTTTCGCTTTATTAACCAAAAATTTCTGTTTCTCACTCCTGGCTCCGCTGCTTGGCTG
CGGCCATGTCATCTCTACACGTGGGATTTGACGGGATGCTTTTGCCGACAGCCGCTTTCTGTTGGAGTATCGCCAGATTCGAATTCGGTTGCGTATCC
ACTTGAGGGATCTTAGGTTCTGTTGTTTACATGGTATACTTTCCTTTTAGTAACGGGAAATTTGGTGTCTCGTTCGGCGGAAGCTGAGTCAGAATGTTCTA
TCGTCCTTGCTATCTTGTCCAGGTTTCTGTCGCCCTGCGAGTCAATTTGCAACATGAACAGGCGCATGCGGAAGTTGTAGCTTTCCGGGGTTCGGAGTT
TGAAGATTCATTTACTTGTAGTATTTATGTTTTTCCGGTTTCAGGAGAAATCTCGTATGGGACCCGATATCTAATTTTTGCTGGGCTAGAGTTGGGGAGT
GGGGTGTGTTTTGTACTATGTTTTTTTTGCTCAGATTTTCGGGATGTTGTTGCAACTTGAGGACGGTCCCAAGGGTTCGTTTAGTGATTCCTCAATCT
CTTTGTCCTCCTGAGTTGAGGACGGTCCCAAAATTTGAAGGTTGTGAGTTGAGAGAGTTGGAAGTTCTGAAGAGTGGCATTAAATAGAAAGTGTGGCA
AAAGTACAGAAAGGATTTGAAGCATCATGTCGTTTTCTGCATCTTTTTATTTAGATTTTTCTCCATGTTGTAAGATTTTATGTTACGGATATTAG
TTTCTGGGGTACACTGGGTTGACTAAGGCACATCAGATTTGAACCATAGGAAGGTGCGAAATTTGACCAGGAGGTAATGATGTAAGCACCATTTGGGAT
TTTTGAATCGCATGTCGATGTCGATGTTTTCGAGCAAGTTTGTGCACTCAGATGGAAGTGGCGAAAGCAGATTTGGGTTACAGCTTTCCATCT
CCTCCAGAAGCTTGGTTCTGATCTcGAgAACTCTCATACGCATACCTGATCAGGAGTACAGTGACCTCACAATTTATCTAGATGGAAAGCAAGTCCCAAT
CACAGTGCATATTGGCAGCTAGGTGTCGGGTATACGAAAAGTTTTTCCGAAATGGGGTAACTGGGGAAACCCGTAACATAGAAATAGAGTTCAGTAC
TATTGTTGAGGATGGGAAATAGGCTACGATGCTTTTATGGCTGTCATGAGTTACGTTTACAGTGGGAAAGTGGAGCTCTGGCTGACTGGCATTGCGTGT
ATGATTTCCATTTCCGTCACATAACATGTCGACCAATTTGACCAGTTTTGGAGGTTCTCCAGCTTTGCTATTACTCAACCTACCAGAAGTACACACC
GTTGCTGAGGATGTTATCTTTTTAAATACAAGATTTACTGCAAAAAAATTTGAGCTTAAGGTTCTTTCACTCGAAGAGATAGGCAGTATATTTATCCATC
ATTGTTATGTTGCATATGCTCCTGTTAGCCGATTATAAATTTGATATAAATTCGAGACATATTGGCAGAACTTGGAAATACCAGCTTTCTTTGTCTCAAC
CTTGTAAGGATATCTGAATATTAATGATACGTTAACATTTTGCAGCAACATCTTATTGACCATCTAGAAAATTTCAAGTGGATGATATGCTACACGTTTA
TCGATCAACAGCTATTTCGAGTGTCTGAGTTGAAATCAATGACTTAAACCGCATTAGCATCTTCTTCACTGGATAATCTAACAGCGGAGAAGGATTTT
CTGGAGCAGCCGTTCCAGCAAGTGAAGAGGTTCCAAAAGGAGTTAAGACCAGGATGCTTACCTGTCGGCGTCCACAAGAAAAGCAACGTAACCGGATCAC
AGCAACGATCTGGTCACTTCAATATATCAAGCTTTATGTAATCAGTGTCCAGTCTGTTGACGTTTCGGAGCTTCACTTGGCCCTCTGTGTCGTA
GGACCCGAGTTGCCACCATTGTTGAAGTCTCTTCAAAACACAGTGAATGATAGTATGTTGATTTGTTATCTTAAGCTTTTATTGACGCTT
GAAGATTTGATTGAGAGAAATCTTTTTTGAACAGGCTTTAGATTCCGATGATAGAAATGGTACAGCTGTGCTAGATGAGGGGAAGTTAGATT
AATGAAGTTGCGGACTTCAATATGCTGCTGCTTACTGTCACTCGAAGTTGGCTTCTGCTGAGCTGGATATTGCAAGTAAATGTTGTTTTATAAT
TGACGTGAAATTTGGCTGCTATTTAATGATGCTACAGAAATCTTTCGCTTGAATTTGGGGGGTTAAGTTGAGGATTCAGAAAGCAACTGTTTCA
TGCACCTATTTTGTGATATTAATGACGACAAATGATAAATGATGCGGATGTTAGGACATTTATGTTAAAGTAAATTAACAATTTATGCTTCTGCAGATG
TAAACGTTCCGAAATGAGAGGGTATGACAGTCTTTCATGTAGCTGCTTGGCGGAGGACCCGCTGGCAATTCGAAAATTTGTCGAGAAGGTTGCACAGTTG
CAGGCTTTAACGTTGGATAATCAACAGCTTTCGACATCTCGAAGAGGTTGACAGGATTTCAATTTGGTTGGGGAGGAGAATTTTAAAGACAGCCCTCG
CGTAAGCATCTGCAGCAGGACAGCTCTGTGGCAGTTCCAAACGCTGCTGCCGCTATGCTAGACAACCGTGCAGTGAAGAAATCTTATGTCGAAAGC
TGCTTTATCTTGAGAAATCGAGGTCAGTGTCTGCTCAGCAGCTTTTGAACGTTGCTCTTCTGTCAGCGATCAGGAAAATGCTGGAGTAAACAACAGAAA
CATGTATAGCAAGTCTCATACTGTGTACCAGTTGGGCACCTAATCTTTACTTTATGTTTTCAGTGGCATTGGCGGATTTGCTGTATCTCCGGGAAAG
CAGATATTGTAATGGGATCTCAGATCTCGATTGCTATGCTCAGCTCCAGCTTAAAGGATTTAGGAATCTTCTGATCAGAAAATCAAGTGAAGAGGAAA
TCGTCAGTAGAACTCAACGAAGACCAACGAAGAGGTTGGCAGGTTTAGTAGGTTAACTGTTGGGATCAATCAAAAGAAAATCGTTGGAATCATTGAT
TCGGAGGTTGAAAATCTGACAGAGGCTGTTGAGTACTGTTCCCTCAGATGTTTAGAGTTTCATCTTTCAGAGGCTGTTATAAGTCTAACTTATCTTCTA
TGAATTTATCATCCCTTTTTGCTAAGGATATGATATTCGCTAAGATGATGATTTGAATGGACGATAGATTACTACTTTGGTGTGGAATAGTAGTAAG
AGTTGAAATATTGAAATGAGATAAATTTGCAAGCTGATGCTTAACTCAAGCTAAGGATTTAGGATTTCTGATCAGAAAATCAAGTGAAGAGGAAA
GTAGTATTTTTTCTACGCAATGTTTCTCTTTCCAAACATGCTTTTGTATCTAGCTAAAATTTATCAGAGGATGATGCCAGGATTTAAGTATCAAGTCTT
CCAGAGACTGATGATCACTTCGATTTAATGATTATACCTAGTCTTTTGTAACTCCATATGTTGGAAGTATCTTGTGCTTACGATGTTGCGTGTAAAT
GTATGCAGCTGAAGTTGCACGCAAAATCTTTCCATGCTATTCGGCAGTCAATAGTGTCTGATGACGACTATGTTGAGCTTATGAAAGATTGCA
GTGTTGAGGACCAAGCTTTGAAAAGGAAGCAATTTGCGAAGCTTAAAGGATATATTACAGGATTTCTCGAAAAGGCAAGGTTGAGGAGATCAAGAAGGCA
AAAAAGCCAATCGAAAAGCGATTTGAAGAGCAAAAGAAATCTCTGATACCAAAATCTTCTTCTTCTTCTTCTGTTCCATCTTCTGTTCCATCTTCT
TATGATTTGCAAGGTTTAGTCAATCTGTTAGGCGAGATTCGTTTCAATATTTTGGCAATACTACAGTGGCTTATCTCACTGGAGGCAACTGAAGATTG
GAGATATGAAGTACCGACCGAGGAAATATAGTGTGATCTTTAGGACCTTCCATGTCACGAACTGCAGTGTCTGGGAAAAGTTTGGGCTAGAGGGTGTG
GAGTCAAAAAGATTCTGGTACATTAATCAACCATAGCGTAGTGGCATCTTTTTTTGCACTAGTGGAGATTTCCAGAGGATTAAGCATGTACAATGAAT
GGCAATTTGTCAGATGTAATATATCAGTGGAACTGGTTCTCCATTTGAGAGGATAAATTTGACCACCTTAAACTCGGATGTTTATATCTGATAAATCTGT
TATATGA

key: 5' UTR CDS 3' UTR

Figura S1. Secuencia genómica del gen *PpNPL2*. Las letras rojas subrayadas representan los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos 5' y 3' de *PpNPL2* y las letras en minúscula representan las bases modificadas para crear sitios de restricción para las enzimas utilizadas para clonar. La región sombreada en verde indica, la azul la secuencia codificante la región 5' UTR, en azul la secuencia codificante, la rosada la región 3' UTR y las regiones sin sombreado indican los intrones. Las letras azules subrayadas representan los oligonucleótidos utilizados para chequear la correcta inserción de la construcción.

8.2 Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
Amp	Ampicilina
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtNPR1</i>	<i>NPR1 de Arabidopsis thaliana</i>
BrEt	bromuro de etidio
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bZIP	cremallera de leucina básica
CaCl ₂	cloruro de calcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	cloruro de calcio dihidratado
Ca(NO ₃) ₂	nitrato de calcio
cm	centímetro
cys	Cisteína
DO	densidad óptica
dNTPs	desoxinucleotidos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ET	Etileno
EtOH	Etanol
hs	horas
Hyg	Higromicina
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
ICS	isocorismato sintasa
IPL	isocorismato piruvato liasa
JA	ácido jasmónico
KAc	acetato de potasio
KO	"knock-out"
LAR	resistencia local adquirida
LB	medio Luria-Bertani
Mb	Megabase
mg	Miligramo
MgCl ₂	cloruro de magnesio

min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	cloruro de calcio
NCBI	National Center for Biotechnological Information (centro nacional de información biotecnológica)
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NO	óxido nítrico
NOS1	nopalina sintasa
<i>npr1</i>	<i>nonexpresser of patogénesis-related genes</i>
ocs	octopina sintetasa
ON	durante toda la noche
O ₂ ⁻	radical superóxido
pb	pares de bases
PAL	fenilalanina amonio liasa
PBS	buffer fosfato salino
Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCD	muerte celular programada
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	polietilenglicol
<i>PpNPL1</i>	gen de <i>Physcomitrella patens</i> con homología <i>NPR1</i>
<i>PpNPL2</i>	gen de <i>Physcomitrella patens</i> con homología <i>NPR1</i>
PR	pathogenesis related
<i>P. irregulare</i>	<i>Pythium irregulare</i>
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
RNasa	Ribonucleasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SA	ácido salicílico
SAR	resistencia sistémica adquirida
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
<i>TcNPR1</i>	<i>NPR1</i> de <i>Theobroma cacao</i>
wt	wild-type

μg	Microgramo
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	micrometros