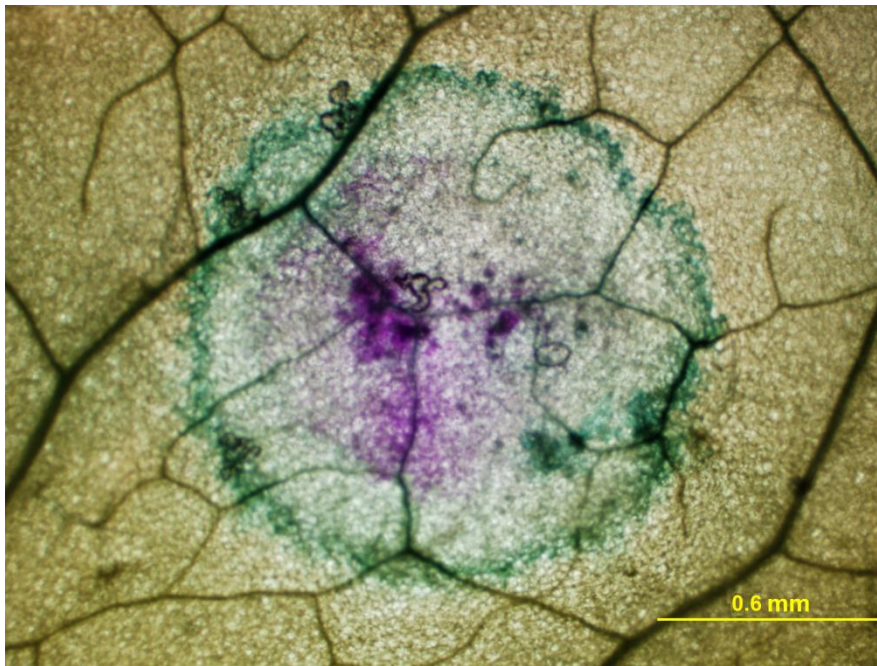


**Estudio de la función de un gen  
novedoso del musgo *Physcomitrella  
patens* en la respuesta de defensa  
vegetal de la planta *Arabidopsis  
thaliana***



**Lucía Vignale**

**Tutora: Inés Ponce de León**

**Co-tutor: Guillermo Reboledo**

Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas

Clemente Estable

Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

Diciembre 2017

## Índice

AGRADECIMIENTOS .....	4
ABREVIACIONES.....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 Interacción planta-patógeno .....	6
1.2 <i>Physcomitrella patens</i> .....	8
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
1.4 <i>Pythium irregulare</i> .....	10
1.5 <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	11
1.6 Gen de función desconocida denominado <i>Pp214</i> .....	11
2. Hipótesis .....	13
Objetivos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo .....	14
3.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> .....	14
3.1.2 Cultivo <i>ex vitro</i> .....	14
3.2 Cepas y cultivo de microorganismos .....	14
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	14
3.2.2 <i>Pythium irregulare</i> .....	15
3.2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	15
3.2.4 Filtrado acelular de cultivo de <i>P c. carotovorum</i> .....	15
3.3 Vectores .....	15
3.3.1 pENTR <sup>TM</sup> 2B .....	15
3.3.2 pMDC7.....	16
3.3.3 pUB-Dest .....	17
3.4 Preparación y análisis de ácidos nucleicos .....	17
3.4.1 Obtención de ADN plasmídico .....	17
3.4.2 Obtención de ARN a partir de tejido vegetal.....	18
3.4.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	18
3.4.4 Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante .....	19
3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	19
3.5.1 Oligonucleótidos.....	19

3.5.2 Amplificación de la secuencia <i>Pp214</i> .....	20
3.5.3 PCR semicuantitativo .....	20
3.6 Construcción para la sobreexpresión en <i>A. thaliana</i> .....	21
3.6.1 Recombinación .....	21
3.6.2 Transformación de <i>E. coli</i> .....	21
3.6.3 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	21
3.7 Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> .....	21
3.8 Ensayo de infección .....	22
3.8.1 Micelio de <i>P. irregulare</i> .....	22
3.8.2 Filtrado acelular de cultivo de <i>P. carotovorum</i> .....	23
3.9 Cuantificación de daño con el colorante azul de Evans .....	23
3.10 Cuantificación indirecta de daño con el colorante azul de Toluidina .....	23
3.11 Análisis estadístico .....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Análisis bioinformático de la secuencia del gen <i>Pp214</i> para identificar su función....	24
4.2. Expresión de <i>Pp214</i> en <i>P. patens</i> durante el desarrollo, diferentes tejidos y diferentes condiciones .....	28
4.3. Análisis de plantas transformadas de <i>A. thaliana</i> con una construcción que expresa <i>Pp214</i> bajo el control de un promotor constitutivo. ....	29
4.4. Ensayos de infección con patógenos en líneas transformadas .....	32
4.5. Generación de la construcción para sobreexpresar <i>Pp214</i> bajo el control de un promotor inducible y transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> .....	37
5. CONCLUSIONES .....	43
6. PERSPECTIVAS.....	43
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## AGRADECIMIENTOS

Inés por aconsejarme, guiarme, darme sus palabras de apoyo y la mano enorme que me dio en la redacción de esta tesis. Espero poder seguir en este laboratorio por unos añitos más.

A Guille por la paciencia infinita que me tiene y por todos los rezongos (algunos merecidos y otros no) que me dio durante este tiempo. "Anotá Lucía, anotá".

A Astrid por sus consejos, palabras de aliento y por declararme licenciada antes de serlo.

A Eyllin por las charlas de la vida y por prestarme sus cepas de *Pythium* que decidieron no infectar mis líneas.

A Leo por sus laaaaaaaargas charlas durante los experimentos.

A Pao por ser mi suministro de galletas.

A los demás integrantes del laboratorio por las charlas y recomendaciones en la práctica.

A Flavio por mandar la carta que me hizo entrar al laboratorio.

A mis padres por el apoyo y por bancarme durante estos años.

A mis hermanas por tomarme el pelo después de escuchar las explicaciones inentendibles que les daba.

A mi tía Bea por hacerme elegir la mejor carrera para mí.

A mi abuela Lydia por la paciencia que nos tiene, prestarnos el escritorio para encerrarnos a estudiar con amigos durante horas y aguantar charlas raras cuando volvía con las neuronas quemadas.

A los demás miembros de mi familia por siempre preguntarme cómo iba la tesis.

A mis amigos por bancarse mis protestas y cuentos cuando estaba trancada.

Al equipo fresimora por salvarme en los informes, compartir largas horas de laboratorio y terminar siendo grandes amigas.

A Sofi Montero y Lu González por su amistad y consejos (buenos y malos) que me vienen dando desde niñas.

A mis amigos de los clubes de ciencia, que me han mantenido en el tema desde el liceo e influido en mis gustos y entusiasmo por la investigación.

Y por último a todos aquellos que de alguna manera me acompañaron en el proceso, muchísimas gracias.

## ABREVIACIONES

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
Cb	Carbenicilina
CF	Filtrado de cultivo
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>dNTP</i>	<i>desoxirribonucleótidos</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETI	Inmunidad desencadenada por efectores
HR	Reacción hipersensible
JA	Ácido jasmónico
LB	medio Luria-Bertani
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microbios
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MS	medio Murashige & Skoog
min	minutos
mL	mililitros
ng	nanogramos
OPDA	Ácido oxofitodienoico
<i>P. carotovorum</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
<i>P. irregulare</i>	<i>Pythium irregulare</i>
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	pares de bases
<i>Pp214</i>	gen 214 de <i>Physcomitrella patens</i>
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PTI	Inmunidad desencadenada por PAMPs
rpm	revoluciones por minuto
Rif	Rifampicina
SA	Ácido salicílico
Sp	Espectinomicina
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
µg	microgramos
µL	microlitros
YEP	medio Yeast Extract Peptone

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Interacción planta-patógeno

Una planta puede verse afectada por cientos de patógenos durante su vida, incluyendo virus, viroides, bacterias, hongos y nematodos. Casi siempre las plantas sobreviven a pesar de estar en contacto con estos patógenos de naturaleza diversa y continúan con su desarrollo normal. Esto se debe a que han desarrollado una serie de barreras físicas y bioquímicas que pueden impedir la entrada, inhibir el crecimiento o producir la muerte del atacante. Este tipo de defensas se denominan defensas constitutivas y varían dependiendo de la edad de la planta, tipo de órgano y tejido, estado nutricional o condiciones climáticas. Como características estructurales encontramos aquellas preformadas, como la cantidad y calidad de la cera y cutícula que se encuentran cubriendo la superficie de las hojas, la localización, apertura, tamaño y cantidad de estomas o estructura de las paredes celulares (Agrios, 2007). Algunas plantas son capaces además de formar capas de corcho, capas de abscisión, tálides o sustancias gomosas que impiden el avance del patógeno por el tejido. Otro tipo de defensa que puede ser constitutivas es la presencia de compuestos antimicrobianos en tricomas o glándulas (Domingo et al., 2003).

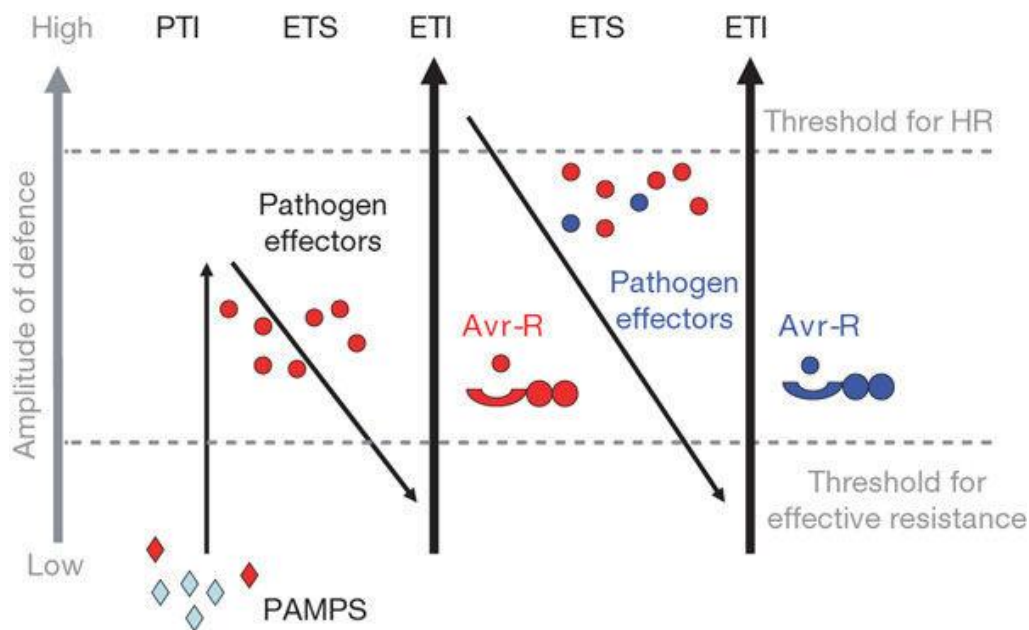
Existen a su vez mecanismos de defensa capaces de ser inducidos frente a la presencia de un potencial agente invasor. Estos mecanismos de defensa tienen cierta similitud con el sistema inmune presente en animales y está basado en diferentes etapas. En una primera etapa los "Pattern Recognition Receptors" (PRRs), son capaces de reconocer una gran variedad de moléculas pertenecientes a los organismos patógenos que se encuentran conservadas, denominados "Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns" (PAMPs o MAMPs) (Figura 1). Como ejemplos se encuentran los receptores tipo quinasa presentes en la membrana celular incluyendo "Flagellin Sensitive 2" (FLS2), el cual es capaz de reconocer específicamente la flagelina (Kunze et al, 2004; Chinchilla et al., 2006), y el receptor "chitin elicitor receptor kinase 1" (CERK1) que reconoce la quitina de hongos (Miya et al, 2007). También existen receptores que pueden reconocer "Damage Associated Molecular Patterns" (DAMPs), los cuales son compuestos propios de la planta pero liberados debido al daño causado por el patógeno (Choi y Klessig 2016). Un ejemplo son los productos liberados del corte de la quitina, que pueden inducir la producción de compuestos en otras células como las fitoalexinas, y desencadenar resistencia sistémica adquirida en el resto del tejido u organismo (Brunner et al., 1998).

Una vez que se da el reconocimiento de los PAMPs o DAMPs por el receptor PRR, se desencadenan respuestas en las células vegetales como la inducción de la expresión de genes de defensa, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), o deposición de calosa (Jones and Dangl, 2006; Zeidler D et al 2004). A esta respuesta se le llama PTI por sus siglas en inglés: "PAMP/Pattern Triggered Immunity" (Katagiri and Tsuda, 2010).

Si la PTI es superada por el patógeno, se desencadena una segunda capa de defensa llamada "Effector Triggered Immunity" (ETI) (Jones and Dangl, 2006) (Figura 1). La ETI está mediada por proteínas de resistencia o "proteínas R" que directa o indirectamente reconocen la presencia de los efectores liberados por los patógenos. Los efectores son

moléculas diversas, claves y determinantes en la infección y colonización de la planta (Badel et al., 2002). Los efectores pueden además suprimir o interferir con la PTI, alterando la fisiología de la planta para su propio beneficio. Es así que algunos efectores interfieren en el transporte vesicular, producción de fitoalexinas y desarrollo de la respuesta hipersensible (HR) (DebRoy et al, 2004; Collier et al., 2009; Nomura et al., 2011). Algunos fitopatógenos también son capaces de producir compuestos que imitan hormonas vegetales, interfiriendo en las vías de señalización y activación de los mecanismos necesarios para la defensa. Un ejemplo de estos son las cepas de *Pseudomonas syringae*, las cuales producen un compuesto llamado coronatina el cual es estructuralmente análogo al ácido jasmónico (JA) (Brooks et al., 2005). Este compuesto genera una supresión de la vía de defensa activada por el ácido salicílico (SA), no activándose los genes de respuesta necesarios para una defensa efectiva y provocando una mayor apertura de los estomas lo cual favorece la entrada de bacterias al interior de la hoja (Melotto et al., 2006). Algunos patógenos pueden perder los efectores reconocidos por las proteínas R de las células vegetales y ganar nuevos por mutación o transferencia horizontal que les ayuden a suprimir o evadir la ETI y generar enfermedad (Jones et al., 2006). Se cree que esta co-evolución planta-patógeno se lleva a cabo en ciclos dentro de cada población, entrando al sistema genes externos y nuevos de resistencia cuando existe una presión de selección muy fuerte (Frank et al., 1992). Estos genes de resistencia se dividen en mayores (resistencia total atribuida a un sólo gen R en particular) y menores, en los que la resistencia es cuantitativa y no cualitativa, atribuida a la sumatoria de genes menores de resistencia y otros factores como la característica de la planta, grosor de la cutícula o presencia de compuestos que inhiben el crecimiento del patógeno.

Se sabe que muchas veces las vías de señalización y las respuestas de defensa activadas por la PTI y la ETI son las mismas y ésta superposición de respuestas hace que sean difíciles de separar. Es muy probable que ambas capas de inmunidad funcionen como un continuo (Thomma et al., 2011), y se propone que la amplitud de la ETI es mayor que el de la PTI (Figura 1). El hecho de llegar a una respuesta de defensa efectiva ya sea mediante la PTI o la ETI le confiere a la planta la ventaja de operar contra un amplio espectro de patógenos y no tener que desarrollar mecanismos específicos para cada uno de ellos. Una de las respuestas características de la ETI es la HR en la zona donde se detectó la presencia del patógeno, la cual es un tipo de muerte celular programada (PCD) (Figura 1). Ocurre tanto en interacciones compatibles como incompatibles entre patógeno-hospedero (Greenberg and Yao, 2004). Durante la HR se desencadenan cambios fisiológicos en las células afectadas y en las que las rodean, como la pérdida de permeabilidad de las membranas celulares, el aumento de respiración, la acumulación y oxidación de compuestos fenólicos y la producción de fitoalexinas (Mao et al., 2011). Esta serie de sucesos lleva finalmente a la muerte y colapso de dichas células, las cuales son necesarias para que los patógenos biótrofos o hemibiótrofos puedan multiplicarse, disminuyendo o acotando de esta manera su expansión al resto de los tejidos (Agrios, 2007; Dodds and Rathjen, 2010).



**Figura 1: Esquema del modelo “zigzag” en el que se visualiza la sucesión de respuestas del sistema inmune de las plantas frente a ataques por patógenos.** La amplitud de la resistencia o susceptibilidad es proporcional a la [PTI – ETS + ETI]. PAMPs “Pathogen Associated Molecular Pattern”, PTI “PAMP Triggered Immunity”, ETS “Effector Triggered Susceptibility”, ETI “Effector Triggered Immunity”, HR “Hypersensitive Response”, Avr-R “Avirulence Resistance”. Imagen tomada de Jones and Dangl (2006).

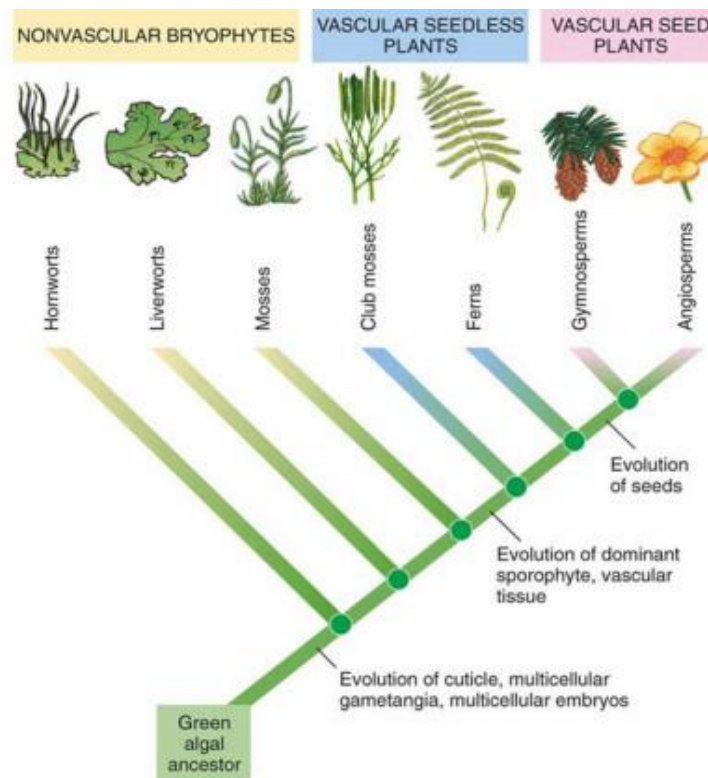
Los genes involucrados en la defensa vegetal ocupan una parte sustancial del genoma del hospedero. A partir de datos de la secuenciación del genoma, se estima que aproximadamente el 14% de los 21.000 genes presentes en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) están directamente relacionados con la defensa vegetal (Beban et al, 1998). Muchos de estos casi 3000 genes no están involucrados en la detección misma del patógeno sino en la resistencia generada en su totalidad por medio de diferentes tipos de respuestas defensivas. Existe también en el reino vegetal mecanismos de defensa a largo plazo y ante un amplio rango de patógenos, llamado Resistencia Sistémica Adquirida o SAR por sus siglas en inglés. Es indispensable para su inducción la acumulación de SA y posterior inducción de genes PR (“Pathogenesis Related”) (Glazebrook et al., 2005). Dependiendo de la naturaleza del patógeno, se activará una vía hormonal encargada de señalar su presencia. En el caso de patógenos de naturaleza biótrfica, el encargado es el SA. Para necrótrofos es un balance entre el JA y el etileno. Esta diferencia permite distinguirlos y provoca que la respuesta desencadenada sea efectiva y específica dependiendo del patógeno que infecte la planta (Glazebrook et al., 2005).

## 1.2 *Physcomitrella patens*

*Physcomitrella patens* (*P. patens*) es un musgo perteneciente al filo briofitas, las cuales son plantas no vasculares que se encuentran en una posición estratégica desde el punto de vista evolutivo, haciendo de nexo entre algas verdes y plantas vasculares (Figura 2). Se cree que los musgos divergieron de las angiospermas (plantas con flor), hace al menos 450 millones de años y fueron de las primeras plantas en colonizar la tierra (Rensing et al.,



2008). De esta manera, el estudio de su genoma aporta pistas sobre los mecanismos de adaptación que adquirieron las plantas para pasar de un medio acuático a un medio terrestre. También es un modelo muy útil para estudiar la evolución de los mecanismos de defensa en plantas frente al estrés biótico y abiótico, y como posible fuente de genes involucrados en mecanismos de resistencia a ser transferidos a cultivos (Ponce de León y Montesano, 2013). Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que *P. patens* comparte mecanismos de defensa con angiospermas, indicando que estos están conservados evolutivamente, aunque otros mecanismos difieren y son característicos de las briofitas (Ponce de León y Montesano, 2017).



**Figura 2: Posición de las briofitas en el árbol filogenético (esquema).** (Imagen tomada de Thomson Higher Education 2007).

Este musgo es fácilmente cultivado *in vitro*, posee un tamaño pequeño, ciclos de generación cortos, técnicas establecidas y confiables de cultivo y experimentación (Cove et al., 1997) Dentro de éstas cabe destacar la fácil transformación y la disrupción de genes de *P. patens* con posibles funciones en la defensa, dada la alta tasa de recombinación homóloga que tiene esta planta, comparable a la observada en levaduras (Schaefer et al, 2001). Esto lo ha hecho susceptible a la incorporación de genes a lo largo de diez millones de años de evolución por transferencia horizontal (Rensing et al., 2008).

El genoma de *P. patens* contiene cerca de 500 Mb organizados en 27 cromosomas, 36.000 genes aproximadamente y fue completamente secuenciado en el año 2006 (Rensing et al., 2008). Hoy en día el genoma de *P. patens* se encuentra disponible en diversas bases de

datos como Phytosome, Plantgdb o JGI Genome Portal, lo que ha facilitado el trabajo con genes provenientes de este nuevo modelo.

En los últimos años se han identificado patógenos que infectan *P. patens*, frente a los cuales las células vegetales activan mecanismos de defensa como forma de protección (Ponce de León et al., 2007; 2012; Oliver et al., 2009; Ponce de León 2011; Overdijk et al., 2016). Esto ha permitido identificar genes de *P. patens* con funciones en la defensa vegetal (Machado et al., 2015; Alvarez et al., 2016; Castro et al., 2016). Luego de la infección *P. patens* induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), la HR y la fortificación de la pared celular y acumula hormonas de defensa como el SA y auxinas (Ponce de León et al., 2007; 2012). Estas respuestas son similares a las que se activan tras la infección en plantas vasculares, por lo que varios de los mecanismos de defensa son comunes entre musgos y las plantas vasculares.

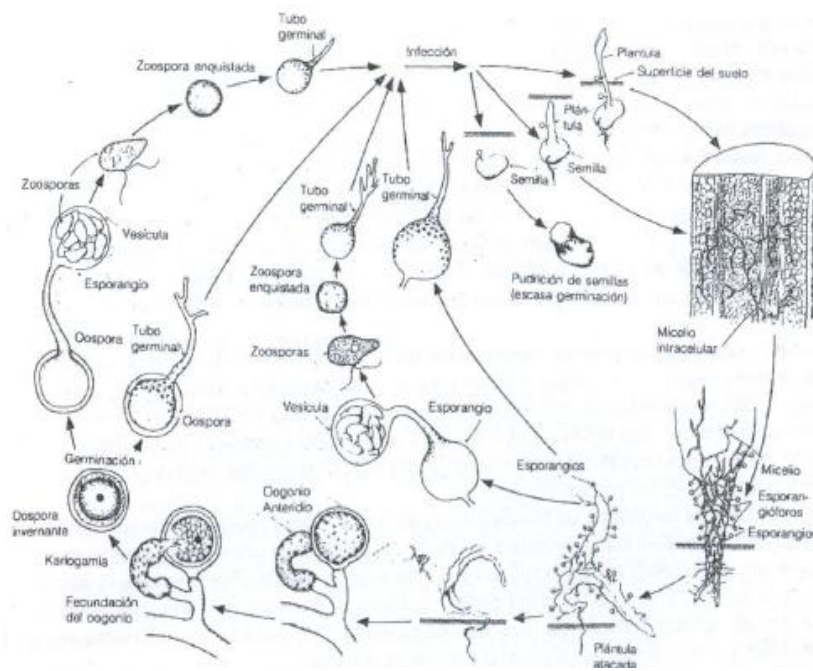
### **1.3 *Arabidopsis thaliana***

Es el modelo más utilizado para realizar estudios sobre plantas vasculares. El genoma de esta planta posee 125 Mb, en los cuales se han encontrado 29.498 genes que codifican para proteínas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Posee a su vez la ventaja de tener ciclos de generación cortos, un pequeño tamaño, generar un gran número de descendientes y ser fácil la introducción de genes exógenos debido a que las células de la línea germinal son susceptibles de ser transformadas y se encuentran accesibles para la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Desfeux et al., 2000).

### **1.4 *Pythium irregulare***

*Pythium* es un oomicete perteneciente a la clase de pseudohongos fitopatógenos que causan algunas de las enfermedades vegetales más destructivas y con mayores pérdidas económicas en el mundo (Stassen y Van den Ackerveken, 2011). Son favorecidos por el clima tropical y templado, afectando semillas, plántulas, y plantas adultas de casi todos los tipos de hortalizas, cereales, y muchos árboles frutales y forestales (Agrios, 2007). *P. irregulare* pertenece al orden de los *Peronosporales*, posee un micelio alargado, blanco, filamentoso, de rápido crecimiento, que carece de septos y su crecimiento es favorecido por una gran cantidad de agua o película acuosa. Su reproducción es mediante la generación de oosporas (reproducción sexual) y zoosporas (reproducción asexual) (Figura 3).

Los síntomas más característicos son el ahogamiento de plántulas, pudrición de raíz, semilla, frutos carnosos y otros órganos vegetales que se encuentren en contacto con el suelo (Agrios, 2007). Ataca mayoritariamente los tejidos juveniles y lo hace a través de la degradación y disgregación del tejido debido a la acción de enzimas liberadas como pectinasas, hemicelulasas, celulasas, proteinasas y toxinas (Campion et al., 1997). *P. irregulare* es capaz de infectar tanto tejidos de *A. thaliana* como de *P. patens*. En *A. thaliana* las células vegetales activan la expresión de genes de defensa y vías de señalización dependientes del JA y ácido abscísico (ABA) (Adie et al., 2007). En *P. patens*, la colonización de *P. irregulare* activa la inducción de varios genes de defensa, producción de ROS, y reforzamiento de la pared celular (Oliver et al., 2009).



**Figura 3: Ciclo patogénico de *Pythium* sp.** Se observan las diferentes formas de reproducción que posee y la manera en que coloniza los tejidos de la planta hospedera.

### 1.5 *Pectobacterium carotovorum*

Es una bacteria gram negativa de amplio rango de hospedero. Es el agente causal de la pudrición blanda de numerosos cultivos, lo cual conlleva grandes pérdidas a nivel mundial. A su vez, es capaz de producir una enorme cantidad de enzimas capaces de degradar varios compuestos de la pared celular como celulasas, pectinasas y proteasas (Perombelon y Kelman, 1980; Davis et al, 1984; Palva et al, 1993; Toth y Birch, 2005). El filtrado acelular de un cultivo (CF) de esta bacteria contiene estas enzimas y genera en *P. patens* los mismos síntomas que la infección por la bacteria, dando lugar a la inducción de genes relacionados a la defensa vegetal, incluyendo aquellos codificantes para lipoxigenasas y proteínas PR (Ponce de León et al, 2007). Además, hay una aumento del reforzamiento de la pared y producción de auxinas en *P. patens* luego del tratamiento con el CF de esta bacteria (Alvarez et al., 2016).

### 1.6 Gen de función desconocida denominado *Pp214*

En el marco de trabajos previos realizados en mecanismos de defensa de *P. patens* en el Departamento de Biología Molecular, se identificaron un conjunto de genes expresados diferencialmente en tejidos de *P. patens* tratados con el CF de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*P.c. carotovorum*; cepa SCC1) (Álvarez et al. 2016). Uno de estos genes fue denominado *Pp214*. Este gen contiene 824 pares de bases (pb), no tiene intrones y codifica para una proteína de 101 aminoácidos. Es de función desconocida, no posee dominios conservados ni homología de secuencia

nucleotídica con proteínas de otras plantas anotados en la base de datos del NCBI. Estudios del nivel de expresión de *Pp214* en colonias salvajes de *P. patens* tratadas con diferentes patógenos demuestran que este gen se induce en respuesta a la infección (Figura 4). Se observa como la expresión prácticamente no aumenta frente a la exposición de las colonias a agua, mientras que aumenta frente al contacto con el CF de la cepa SCC3193 de *Pectobacterium wasabiae* (*P. wasabiae*) y siendo la mayor expresión a las 4 hs de exposición al CF de la cepa SCC1 de *P.c carotovorum* y a las 24 después del tratamiento con esporas del hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*). Las cepas de *P. carotovorum* y *P. wasabiae* difieren entre otras cosas en que la primera posee el gen que codifica para una proteína harpin, rica en el aminoácido glicina y capaz de actuar como efector para inducir la HR en plantas (Rantakari et al, 2001; Lee et al, 2001).



**Figura 4: Estudio de la expresión del gen *Pp214* frente al CF de las bacterias fitopatógenas *P. carotovora* SCC1 y *P. wasabiae* SCC3193, y el hongo *B. cinerea* a diferentes tiempos por la técnica de Northern blot. El control fue realizado con agua y el tiempo está en horas.**

Con el objetivo de realizar un estudio funcional de *Pp214*, se intentaron transformar en el laboratorio protoplastos de *P. patens* con una construcción para sobreexpresar el gen *Pp214*, aunque no se lograron obtener transformantes en los diferentes ensayos que se realizaron. Sí se lograron transformar plantas de *A. thaliana* con el gen *Pp214* bajo el control de un promotor constitutivo (ubiquitina), observándose luego de dos semanas lesiones necróticas y generalmente simétricas en las primeras hojas verdaderas de tales plantas creciendo *in vitro* en un medio con selección (Reboledo y Ponce de León, datos no publicados). Esto sugiere que *Pp214* podría estar participando en algún proceso de muerte celular. Además, el hecho que no fue posible obtener transformantes a partir de protoplastos en *P. patens*, sugiere que la sobreexpresión constitutiva de este gen podría ser letal para el musgo.

## 2. Hipótesis

La hipótesis planteada es que el gen *Pp214* de *P. patens* de función desconocida participa en la respuesta de defensa vegetal frente a patógenos.

## Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar el posible rol del gen *Pp214* en la defensa vegetal frente a patógenos. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar si la sobreexpresión del gen *Pp214* de manera constitutiva en *A. thaliana* aumenta la resistencia a *Pythium irregulare* y *Pectobacterium carotovorum*.
- 2- Generar plantas de *A. thaliana* que sobreexpresen *Pp214* bajo el control de un promotor inducible.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo**

Se trabajó con la planta modelo *A. thaliana* comparando cuatro líneas transgénicas homocigotas (líneas 1, 2, 3 y 4) y plantas salvajes ecotipo Columbia. Estas corresponden a la segunda generación (T2) de plantas generadas en proyectos anteriores, que cuentan con el gen *Pp214* bajo el control del promotor constitutivo ubiquitina.

##### **3.1.1 Cultivo *in vitro***

Se utilizó para la selección de transformantes medio MS 0.5% (Murashige & Skoog, 1925) suplementado con el herbicida Basta o el antibiótico higromicina. El primero fue utilizado para seleccionar plantas transformadas con *Pp214* bajo el control del promotor constitutivo y el segundo para seleccionar plantas cuya expresión está controlada por un promotor inducible por  $\beta$ -estradiol (este trabajo).

##### **3.1.1.2 Esterilización superficial y siembra *in vitro* de semillas**

Para la esterilización de las semillas previa siembra *in vitro* se realizaron dos lavados sucesivos en etanol 90% e hipoclorito al 8% con Tween 20 2 $\mu$ L/ml (30-40 segundos y 15 minutos respectivamente) en agitación. Por último se realizaron varios lavados en agua mQ para quitar el Tween 20 restante. Las semillas fueron esparcidas sobre una placa con medio MS con la selección correspondiente. Las placas fueron dejadas dos días a 4°C y luego llevadas a una cámara de crecimiento con un fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad, 22°C y 60% de humedad relativa.

##### **3.1.2 Cultivo *ex vitro***

Las semillas correspondientes a cada línea fueron sembradas en macetas individuales en un sustrato turba-vermiculita en proporción 3:1, respectivamente. Primero se humedeció el sustrato, se depositaron las semillas uniformemente en la superficie y se tapó la maceta con film de nylon. Posteriormente se pasaron a condiciones normales de crecimiento (16 horas luz-8 horas oscuridad y 22°C). Luego de uno o dos días de aclimatación en condiciones normales se retiró el nylon y se dejaron creciendo hasta la aparición de las segundas hojas verdaderas (dos semanas aproximadamente) para luego trasplantar las plántulas a sus macetas definitivas.

#### **3.2 Cepas y cultivo de microorganismos**

##### **3.2.1 *Escherichia coli***

Se utilizaron bacterias en estado de quimio competencia de la cepa DH5 $\alpha$  para las transformaciones. La cepa fue crecida a 37°C en medio Luria Bertani (LB) líquido (a 150-200 rpm) o sólido con agar (en estufa) y suplementado con el antibiótico de interés según se requiera. Dicho medio está compuesto por peptona de caseína (10 g/L), cloruro de sodio (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y agar (15 o 5 g/L), con un pH 7,5. Las colonias seleccionadas con los plásmidos de interés fueron crecidas en medio LB-agar

suplementado con antibióticos y se cultivaron en medio LB líquido suplementado con la misma selección para luego conservarlas en glicerol a -80°C.

### **3.2.2 *Pythium irregulare***

Este oomicete fue crecido sobre medio “Potato Dextrose Agar” (PDA) en cámara de crecimiento a 22°C. Se utilizaron para los ensayos de infección sobre hoja de *A. thaliana*, discos de agar de 0.5 cm con micelio obtenidos de la zona de crecimiento de *P. irregulare* de cultivos de dos días de antigüedad. Los discos de agar fueron invertidos, quedando el micelio en contacto con el tejido foliar. Para la segunda repetición de los ensayos de infección se realizó un pasaje de este oomicete en tejidos de *P. patens* para asegurar que la cepa no ha perdido su virulencia.

### **3.2.3 *Agrobacterium tumefaciens***

Se utilizaron dos cepas diferentes para la transformación de *A. thaliana* crecidas en medio YEB (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y agar 20 g/L). En un principio se trabajó con la cepa C58Cl/PGV3850, resistente a los antibióticos espectinomocina (Sp, 50 µg/mL) y rifampicina (Rif, 50 µg/mL), y también se utilizó la cepa C58C1, resistente a Sp (50 µg/mL), carbenicilina (Cb, 100 µg/mL) y Rif (50 µg/mL).

### **3.2.4 Filtrado acelular de cultivo de *P. c. carotovorum***

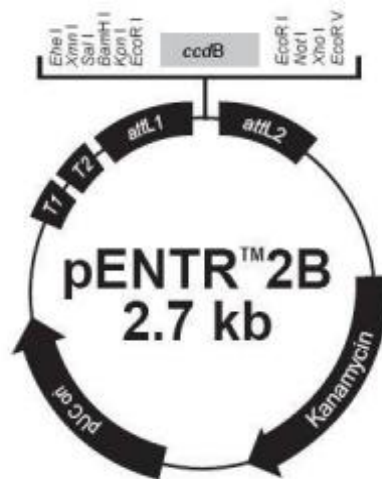
La metodología fue tomada de Ponce de León et al. (2007). Brevemente: se realizó un cultivo líquido en medio LB a 28°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó 10 minutos a 4000 g y se filtró el sobrenadante con un tamaño de poro de 0,2 µm. El CF se guardó a -20°C hasta el momento de su uso.

## **3.3 Vectores**

Para cumplir con los objetivos del proyecto fue necesario utilizar plásmidos que se repliquen tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Se utilizó para tal fin, el sistema Gateway para el pasaje del gen *Pp214* entre vectores. Esta tecnología está basada en las propiedades de recombinación sitio-específicas del fago lambda. Luego de clonado en el vector dador el DNA de interés queda flanqueado por sitios de recombinación (*att1* y *att2*), las cuales son las secuencias blanco que serán las que dirigirán la recombinación sitio-específica en el vector aceptor.

### **3.3.1 pENTR™2B**

Plásmido en el que se encontraba clonado el producto de amplificación del gen *Pp214* obtenido a partir de ADN genómico de *P. patens*. Debido a que este vector presenta tecnología Gateway, se usó para clonar directamente el gen *Pp214* en el vector final por medio del uso de la enzima LR Clonasa™. Es un vector de clonado de 2718 pares de bases (pb) con un “casette” de selección que confiere resistencia a kanamicina (Kan 30 µg/mL; figura 5).

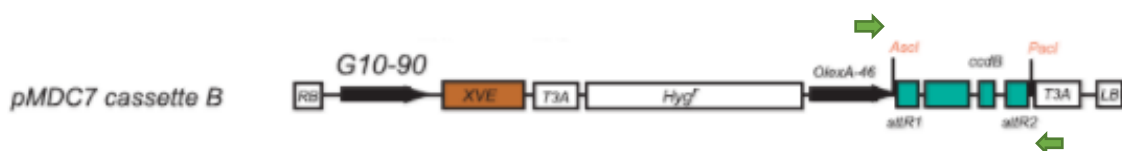


**Figura 5:** Esquema del plásmido pENTR™2B evidenciando el “cassette” de selección que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, el origen de replicación de alto número de copias (pUC ori), las secuencias de terminación de la transcripción uno y dos (T1 y T2 respectivamente) y los sitios de corte para las enzimas de restricción que posibilitan el clonado en dicho vector. Figura obtenida de <http://www.shanghaihengwu.com>

### 3.3.2 pMDC7

Es el plásmido utilizado para generar la construcción final (Figura 6). Posee 13228 pb, un promotor inducible por  $\beta$ -estradiol y sitios de recombinación compatibles con los encontrados en el vector donador pENTR. A su vez está reportada su eficiencia de transformación dentro de diversos sistemas vegetales, incluyendo *A. thaliana*.

En su secuencia contiene un gen que codifica para una enzima llamada higromicina fosfotransferasa (hpt), la cual confiere resistencia frente al antibiótico higromicina (25  $\mu$ g/mL) y se encuentra regulado transcripcionalmente bajo el promotor de la nopalina sintasa y del terminador nos (Karimi et al., 2002). En bacterias posee resistencia ante el antibiótico Sp (50  $\mu$ g/mL). Como sistema de selección negativa este vector posee el gen *ccdB* el cual resulta letal para las cepas de *E. coli* utilizadas para transformar (Figura 6) (Earley et al., 2006). Se entiende por lo tanto que aquellas células que hayan incorporado el vector vacío (sin el inserto de interés, *Pp214*) serán seleccionadas negativamente por *ccdB*. Esto aumenta la oportunidad de que las colonias que logren crecer en medio suplementado con Sp como selección, hayan pasado por una recombinación exitosa y que posean el plásmido deseado.

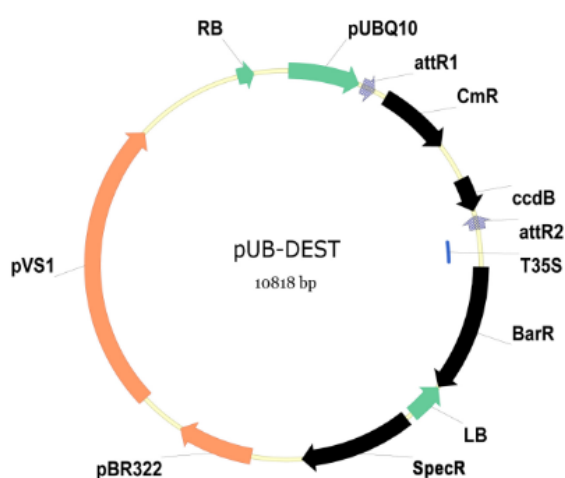


**Figura 6:** Esquema del vector receptor final pMDC7. Es posible observar los sitios de recombinación attR1 y attR2, los sitios de corte para las enzimas de restricción Ascl y PacI, los promotores  $O_{LExA}$  y XVE, el terminador transcripcional T<sub>3A</sub> y genes que confieren resistencia a antibióticos. Se marcan con flechas verdes los sitios de complementariedad de los oligonucleótidos utilizados para amplificar *Pp214* luego de generada la construcción (tamaño no proporcional). Imagen tomada de Curtis et al (2003).



### 3.3.3 pUB-Dest

Vector que se utilizó en ensayos anteriores para crear la construcción pUBI:*Pp214* con la que se transformaron plantas de *A. thaliana* en las que se realizan los ensayos de infección. La expresión del gen se encuentra bajo el control del promotor constitutivo de ubiquitina (Figura7). Éste plásmido posee sitios de recombinación compatibles con los demás vectores utilizados (attR1 y attR2), el gen phosphinothricin-*N*-acetyltransferase que confiere resistencia para el herbicida Basta, elementos regulatorios en 5' y 3' de la nopalina sintasa, secuencia de replicación pVS que permite mantener el vector en *A. tumefaciens*, el origen de replicación pBR322 que asegura un alto número de copias en *E. coli* y el gen para la aminoglycoside-3-adenyltransferase que confiere resistencia a estreptomycin y Sp (100 µg/mL para ambas) en bacterias.



**Figura 7: Vector de destino para *Pp214* en plantas cuya expresión es constitutiva.** Figura tomada de la página de la Universidad de Tübingen, equipo de biología molecular de plantas. Se esquematizan secuencias importantes como los sitios de recombinación sitio específica attR1 y attR2, gen que confiere la resistencia al antibiótico espectinomicina (SpecR, selección para bacterias), y al herbicida basta (BarR, selección para plantas).

## 3.4 Preparación y análisis de ácidos nucleicos

### 3.4.1 Obtención de ADN plasmídico

Se crecieron cultivos líquidos de 5 mL de las cepas seleccionadas en medio LB-agar suplementado con Sp al tratarse de *E. coli*, y en medio YEP con Rif, Sp y Cb al trabajar con *A. tumefaciens*. Se dejó crecer un día en agitación a 37°C y 28°C, respectivamente. Las células se obtuvieron por varios pasos de centrifugación en tubos eppendorf a 13000 rpm por uno o dos minutos hasta eliminar la turbidez en el medio líquido dada por las células en suspensión. Luego de cada paso de centrifugación se descartó el sobrenadante. La resuspensión de las células obtenidas se realizó agregando 300 µL de la solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa 100 µg/mL, vortexeando de ser necesario para que quede una suspensión homogénea. Posteriormente se agregaron 300

$\mu\text{L}$  de buffer B (NaOH 200 mM, SDS 1%), se invirtió el tubo eppendorf de cuatro a seis veces y se dejó en incubación a temperatura ambiente por cinco minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer C (acetato de potasio 3.0 M pH 5.5), se volvió a invertir suavemente el tubo eppendorf de cuatro a seis veces y se dejó incubando en hielo por cinco minutos más. Se centrifugó diez minutos a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Para precipitar el ADN plasmídico se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se invirtió el tubo de cuatro a seis veces. Se realizó una nueva centrifugación a 13000 rpm por media hora. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70%. Se volvió a centrifugar a la misma velocidad, pero cinco minutos. Se extrajo y descartó la mayor cantidad posible de etanol y se dejó secar hasta que se evaporó por completo. Una vez seco el pellet éste se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada o tris-HCl 1mM y fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.2 Obtención de ARN a partir de tejido vegetal**

Se congeló el tejido de hojas de tres plantas de *A. thaliana* salvaje y de las cuatro líneas transformadas en nitrógeno líquido, los cuales fueron guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. En un mortero se molió el tejido con nitrógeno líquido y se pasó a un tubo falcon conteniendo 2,5 mL de fenol y 5 mL de buffer NTES (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 1%). Se vortexeo por 3 minutos, se agregó 2,5 mL de cloroformo y se volvió a vortexear 20 segundos más. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego se transfirió el sobrenadante a tubos corex, agregando 0.1 volumen de NaAc 3 M, pH 5,2 (libre de ARNasa) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto 96% y se dejó incubando "overnight" a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 10000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de descartado el sobrenadante se dejó secar brevemente el pellet para luego resuspenderlo en 750  $\mu\text{L}$  de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). Para precipitar el ARN en suspensión adicionándose agregaron 750  $\mu\text{L}$  de LiCl 4M y se dejó incubando a  $4^{\circ}\text{C}$  por la noche. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300  $\mu\text{L}$  de agua DEPC. Por último se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 800  $\mu\text{L}$  de etanol 96%. Se dejaron los tubos en un freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Al momento de usarse, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante, se secó el pellet y se resuspendió en 60-100  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

Se utilizaron geles de agarosa de 0.8% a 1.2%, teñidos con bromuro de etidio (BrEt) 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , utilizando el buffer TAE 1x (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). El buffer de carga que se agregó a las muestras contiene glicerol 6%, azul de bromofenol 0.05% y xilen-cianol 0.05%. Se dejó proceder la corrida por 40 minutos aproximadamente a 80V y se visualizó el resultado en un transiluminador. Se utilizó como marcador de peso molecular el ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción PstI. Se estimó la concentración de muestras de acuerdo a la intensidad y posición de las bandas observadas en referencia a las del marcador.

### 3.4.4 Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

Se preparó un gel de agarosa al 1,5% conteniendo MOPS 10X (ácido 3-N-morfolinopropansulfónico) 1,4 % v/v y formaldehído 2,7% v/v. Para correr las muestras las mismas fueron preparadas mezclando 3 µg de ARN total con una solución conteniendo formaldehído 2.2M, formamida al 50% (v/v), 1X buffer MOPS pH 7.0 [MOPS 0.2M, NaAc 0.05M, EDTA 0.01M] y BrEt 70ng/µL. Posteriormente los ARNs se desnaturalizaron a 55°C durante 15 min antes de sembrarlos en los pocillos para la corrida. Se dejó corriendo a 80 V por 40 minutos en buffer MOPS 1X. Se tomó una foto al final de la corrida para estimar la concentración e integridad de las muestras.

### 3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un equipo Prime Thermal Cycler de Techne y se tomaron como molde ADN plasmídico o ADN genómico.

#### 3.5.1 Oligonucleótidos

Es posible encontrar dos versiones del gen *Pp214* en diferentes bases de datos (Phytozome y NCBI). La utilizada para diseñar los oligonucleótidos fue la base de datos de Phytozome versión 12.0. A continuación se detallan los oligonucleótidos utilizados durante el trabajo:

**Tabla 1:** Nombre, secuencia y temperatura de melting de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *Pp214* y la tubulina.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
214 fw	5'-GAATGCAAGGCAACGCCAATG-3'	60.0
214 rv	5'-CCGATATGCTGCACTTTATCTTG-3'	58.4
214 fwa	5'-TTCTCCTCTTGGGAAAGA-3'	56.4
214 rva	5'-ACACCCTGCAATTTGGATAC-3'	56.4
214 rvb	5'-CCTGCAAATTGGATACCAGT-3'	56.4
LexA	5'-TTTGGAGAGGACACGCTGAA-3'	58.4
Rubisco	5'-ATACGGACGAAAGCTGGGAG-3'	60.5
Tubulina fw	5'-CAACTCTGACCTCCGAAAGC-3'	60.5
Tubulina rv	5'-ATGTTGCTCTCCGCTTCTGTG-3'	61.3

Se verificó la inexistencia de complementariedad entre las combinaciones utilizadas con el programa OligoAnalyzer 3.1.

### 3.5.2 Amplificación de la secuencia *Pp214*

Se utilizaron tres combinaciones diferentes con los oligonucleótidos de la tabla 1 para amplificar esta secuencia. La primera se llevó a cabo con la combinación 214 fw/214rv la cual permite generar un fragmento de 444 pb perteneciente a la secuencia codificante de *Pp214*. La segunda y tercera combinación, LexA/214rv y 214fw/Rubisco, permitieron comprobar que el sentido en el que se insertó la secuencia en el plásmido aceptor pMDC7 luego de la recombinación es la indicada para su posterior expresión. Éstas se llevaron a cabo con los oligonucleótidos que poseen la secuencia complementaria al gen LexA presente en el promotor del vector y la complementaria reversa al terminador Rubisco también presente en el vector utilizado.

Se hicieron dos tipos de PCRs, una a partir de minipreparación de ADN plasmídico y otra a partir de colonias aisladas. Para el primer caso se utilizó como molde ADN plasmídico de una construcción previamente lograda en nuestro laboratorio. El mix de PCR por reacción contiene 5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 5  $\mu$ L de Taq buffer 10x, 0.4  $\mu$ L de dNTPs 25 mM, 2.5  $\mu$ L de cada cebador (10 $\mu$ M), 0.25  $\mu$ L de enzima Taq DNA polimerasa (5U/ $\mu$ L) y H<sub>2</sub>O mQ hasta llegar a un volumen final de 50  $\mu$ L.

Para las PCRs a partir de colonia se picó de la placa parte de una colonia y se depositó en el fondo de un tubo de 0,2 mL. Al tubo se le agregó el mix de PCR compuesto por 2  $\mu$ L de Buffer 10x, 0.16  $\mu$ L de dNTPs 25 mM, 0.9  $\mu$ L de cada cebador (10 $\mu$ M), 1.6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 13.74  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ y 0.7  $\mu$ L de enzima Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L), ocurriendo la reacción en un volumen final de 20  $\mu$ L.

Las condiciones de amplificación fueron: una primera etapa de 94°C por 5 minutos de desnaturalización, una segunda etapa correspondiente a 35 ciclos de 94°C de desnaturalización, 54°C de hibridación del cebador y 72°C de extensión por 30 segundos cada uno, y una tercera etapa de extensión de 72°C por 10 minutos.

### 3.5.3 PCR semicuantitativo

Se realizó un primer paso de eliminación de una posible contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico mezclando 2  $\mu$ g de ARN en un volumen final de 12  $\mu$ L con 1,5  $\mu$ L de Buffer de DNasa I (libre de RNAsas) 10X y 1,5  $\mu$ L de dicha enzima. Cada reacción se incubó a 37°C por 90 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregó 1  $\mu$ L de EDTA 25mM para desactivar la enzima y se incubó 10 minutos más a 65°C. En un tubo eppendorf se agregaron 2  $\mu$ L de DTT (0,1M), 4  $\mu$ L de Buffer 10X de ProtoScript II (5x), 0,4  $\mu$ L de dNTPs (25 mM) y 2  $\mu$ L de cebadores oligo dT<sub>(d(T)<sub>20</sub>)</sub> (10 $\mu$ M). Por último se añadieron 10,6  $\mu$ L de la muestra y se incubó nuevamente a 42°C por 60 minutos. El producto de la reacción de transcripción reversa se utilizó en el momento para realizar una PCR o se guardó a -80°C hasta su uso. Para amplificar el fragmento de 508 pb correspondiente a la tubulina se utilizó el mismo mix de reacción que para *Pp214*. El ciclado para la tubulina fue el siguiente: 5 minutos de extensión a 94°C, 28 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C por y finalmente 7 minutos de extensión final a 72°C. Para el *Pp214* se utilizó el mismo tipo de ciclado, incluyendo los 28 ciclos y la combinación de oligonucleótidos fue 214fwa/214rva. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1,5% y se documentó el resultado fotográficamente.

### **3.6 Construcción para la sobreexpresión en *A. thaliana***

#### **3.6.1 Recombinación**

Se partió del gen clonado en el vector pENTR 2B y mediante recombinación se transfirió el gen *Pp214* al vector de expresión inducible por  $\beta$ -estradiol (pMDC7). En ambos, la secuencia *Pp214* quedó flanqueada por sitios de recombinación que pueden ser transferidos a otros vectores con sitios compatibles si fuese necesario. Esta transferencia se llevó a cabo utilizando el LR Clonase Enzyme Mix de Invitrogen. En un tubo eppendorf se generó un mix conteniendo 1  $\mu$ L del vector aceptor (pMDC7) a una concentración de 150 ng/ $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L del vector dador en concentración 150 ng/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L Clonasa II y se dejó toda la noche a 25°C. Al día siguiente se agregó 1  $\mu$ L de Proteinasa K y se incubó 10 minutos a 37°C.

#### **3.6.2 Transformación de *E. coli***

Se utilizaron 100  $\mu$ L de células de *E. coli* electrocompetentes guardadas en glicerol a -80°C. Luego de descongeladas se le agregó el mix de recombinación, se dejaron en hielo 10 minutos y luego se transfirieron a la cuba de electroporación. Para esto se utilizó un equipo Gene Pulser II y se fijaron las condiciones de uso a 2,5 kV, 200  $\Omega$  y 25  $\mu$ F. Inmediatamente luego del pulso eléctrico se agregó 1 mL de LB líquido pre-enfriado en hielo y se dejó una hora a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo se rastrillaron en medio LB con el antibiótico Sp (100  $\mu$ L/mL), 300  $\mu$ L del cultivo y se centrifugó el resto, llegando a un volumen final de 300  $\mu$ L para trabajar con dos concentraciones diferentes. Se dejaron crecer ambas placas a 37°C uno o dos días. Se seleccionaron 8 colonias resistentes y se hicieron los correspondientes reaislamientos para llegar a colonias puras. Se creció un cultivo líquido de cada una, se extrajo el ADN plasmídico y se comprobó mediante PCR la presencia del *Pp214* en pMDC7. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa de 0,8%.

#### **3.6.3 Transformación de *A. tumefaciens***

Se utilizaron dos cepas químico competentes para ser transformadas con el plásmido pMDC7:*Pp214*. Se descongelaron en hielo 100  $\mu$ L de cada cepa, se añadió 1  $\mu$ g de ADN plasmídico previamente verificado por secuenciación. Se dejaron transcurrir cinco minutos en hielo para luego pasarlas 5 minutos más en nitrógeno líquido. Por último se incubó a 37°C por 5 minutos más y se le agregó 1 mL de medio LB frío al tubo eppendorff. Se dejó incubando en agitación (180 rpm) a 28°C por una hora. Transcurrido ese tiempo se rastrillaron 300  $\mu$ L de la suspensión en medio LB-agar suplementado con los antibióticos de selección. Los 800  $\mu$ L restantes se centrifugaron a baja rpm y por un minuto para concentrar las células en el fondo del eppendorf. Al sobrenadante así obtenido se le extrajeron 500  $\mu$ L quedando 300  $\mu$ L en los cuales se resuspendieron las células. Con dicho concentrado se rastrilló una segunda placa con medio LB-agar suplementado con Rif (50  $\mu$ g/mL) y Sp (50  $\mu$ g/mL) y Cb (100  $\mu$ g/mL).

### **3.7 Transformación de plantas de *A. thaliana***

Se crecieron cuatro plantas salvaje de *A. thaliana* por maceta en un sustrato preparado con turba negra y vermiculita en una proporción 3:1 respectivamente. Luego de que comenzaron a salir las primeras inflorescencias (cinco semanas aproximadamente), éstas fueron cortadas para asegurar una mayor sincronización de las plantas en el mismo estadio floral y

aumentar el número de brotes florales. En el momento en que presentaban la mayor cantidad de estos últimos se transformaron por el método de inmersión floral de Clough y Bent (1998). Para esto se debieron inocular 500 mL de medio YEP suplementado con Rif50 µg/mL y Sp 50 µg/mL con 5 mL de un cultivo crecido a 28°C en medio YEP líquido suplementado con antibióticos de selección para un clon de *A. tumefaciens* portador del constructo de interés (pMDC7: *Pp214*). Los 500 mL fueron incubados toda la noche a 28°C y a 200 rpm de agitación. Al día siguiente se centrifugó a 5.500 g por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el mismo volumen de buffer de infiltración (0.5X MS, 5% sacarosa, 0.05% Silwett L-77). En esta solución se sumergieron las inflorescencias de las plantas a transformar por un período de 20 segundos aproximadamente. Luego de realizada la inmersión de las inflorescencias, estas fueron colocadas con cuidado dentro de una bolsa de nylon y las macetas fueron puestas horizontalmente en una bandeja para incrementar la probabilidad de transformación de *A. thaliana*. Las plantas se dejaron en las bandejas en condiciones normales de luz y temperatura. Al día siguiente se retiran las bolsas con cuidado y las macetas se volvieron a colocar en posición vertical. Se hizo un seguimiento de las plantas en los días posteriores para detectar nuevos pimpollos florales. Cuando empezaron a aparecer nuevos botones se comenzó con el refuerzo de la transformación el cual consiste en colocar gotas de la suspensión en buffer de infiltración, del mismo clon de *A. tumefaciens* usado para la inmersión floral. El refuerzo se hizo colocando una gota de 5-10 µL de dicha suspensión directamente sobre los pimpollos, no abiertos aún, de la inflorescencia. El proceso anterior se realizó a los días 2, 4 y 6 luego de la transformación por inmersión floral, y de esta forma se espera aumentar la eficiencia de transformación (Martinez et al., 2004). Cuando las silicuas comenzaron a estar maduras, evidenciado por el secado y amarronamiento de las vainas, se colocaron recipientes recolectores de semillas. Luego de aproximadamente una semana y cuando la mayoría de las vainas se encontraban maduras, se cortan las inflorescencias y se recolectan las semillas por medio de un tamizado con gaza. Esto se hizo para separar las semillas del material vegetal seco que pudiera servir como foco de contaminación por hongos, produciendo por lo tanto pérdida de semillas viables. Las semillas cosechadas se sembraron en medio 0.5X MS pH 5.7, 0.7% agar, suplementado con el antibiótico higromicina (25 µg/mL).

### **3.8 Ensayo de infección**

A plantas de *A. thaliana* salvajes y de las cuatro líneas en estudio, de cuatro semanas de crecimiento, se le cortan hojas del mismo tamaño y estadio y se depositan de a seis sobre papel whatmann mojado en una placa de petri estéril.

#### **3.8.1 Micelio de *P. irregulare***

Sobre la superficie de cada hoja se apoyó un disco de 0.5 cm de diámetro y 0.4 cm de alto aproximadamente, con micelio del oomicete *P. irregulare*. Luego se cerró cada placa y se llevaron al cuarto de cultivo bajo condiciones normales de crecimiento por dos días durante los cuales se evaluó el avance de la infección.

### **3.8.2 Filtrado acelular de cultivo de *P. carotovorum***

Se realizaron dos lesiones con la punta de un tip (sin desprender el tejido) en el centro de cada hoja a los costados de la nervadura central, y se depositaron sobre las heridas una gota de 10  $\mu$ L del CF estéril. Se cerraron las placas correspondientes a cada línea de *A. thaliana* en estudio y se llevaron al cuarto de cultivo bajo condiciones normales de crecimiento por tres días. Transcurridos éstos se abrieron las placas y realizan las tinciones.

### **3.9 Cuantificación de daño con el colorante azul de Evans**

Transcurrido el tiempo de infección correspondiente a cada tratamiento, se abrieron las placas, se retiraron los discos de micelio cuidadosamente en el caso de *P. irregulare*, y se sumergieron de a tres hojas en 3 mL del colorante azul de Evans en placas de petri pequeñas y se dejaron media hora conectadas a una bomba de vacío. Se retiraron y se hicieron tres lavados de cinco minutos cada uno en agua destilada estéril para remover el colorante en exceso. Cuando el agua destilada salió sin colorante se procedió a observar las lesiones bajo la lupa o entre vidrios y a hacer el registro fotográfico de las mismas. Se tomaron fotos de cada hoja por separado o por triplicado, manteniendo una regla de 1 cm en cada una para usar de escala. Luego de completado el proceso se realizó el cálculo del área lesionada con el programa de dominio público ImageJ 1.48. Este análisis se hizo por línea y tratamiento por triplicado.

### **3.10 Cuantificación indirecta de daño con el colorante azul de Toluidina**

Se utilizó azul de Toluidina al 0.05% en buffer citrato 50 mM, pH 3,55 (O'Brien *et al.*, 1964). Se realizó el procedimiento descrito en el punto 3.8.1 sin someter a las hojas al vacío y dejando en reposo por 10 minutos. Es un colorante de tiazina, que se comporta como colorante ortocromático (color azul) o metalocromático (color violeta) y es capaz de unirse selectivamente a compuestos fenólicos de las paredes de células dañadas.

### **3.11 Análisis estadístico**

Se hizo un estudio estadístico de los resultados en el programa Statistica. Los datos ajustan al test no paramétrico "Kruskal Wallis", en el que los datos se toman como independientes pero provenientes de un tratamiento común.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis bioinformático de la secuencia del gen *Pp214* para identificar su función

A partir de la secuencia parcial de *Pp214* obtenida en trabajos anteriores (Álvarez et al., 2016), se hicieron búsquedas en las bases de datos para conocer la secuencia completa. El gen *Pp214* (nombre del transcripto: Pp3c2\_30370V3.1; Alias: Phypa\_69162) se encuentra en el cromosoma 2, tiene una región codificante de 306 nucleótidos y un extremo 5'UTR de 394 pb y un 3'UTR de 124 pb. Codifica para una proteína pequeña de 101 aminoácidos (Figura8), y no tiene intrones en su secuencia codificante.

**A**

```
ATACATTCACCATTGACAGCACCAAGTCGCTTTGCATCGTGTTGTTGCATTCAAGCAAAGTGA
GACCATTATCCAAACTGATAGAACACCGTGGCAGCAGCTGTTTGTGTCAGGATCGGAGTCTGT
TGCATCGTACCTCGTCAAGCGACTTGGATCACCATGGATAGAGGCATGAACAACACCAATG
TGTCTGTGAAGATCCTCATCCTAGGCTGAAATTACAGTAGCGTGCACACACACAGACACA
CACAGATTTTGTAGCTGCTAGCTAGGCAAATAGAGGAAGAGGAAGAAGCCATGGACAGGGG
AATGCAAGGCAACGCCAATGTGTCTGTAAAGATTCTCCTCTTGGGAAAGACAGGCGAGGGA
GAAATTCTCCTCGTGGGATTGAGGAATGCAAATTCGCAGCATGGCTGCATCAGGAGCGA
TCGATCTGCCTGTTTCTGTACCCATTGCATTTCGCTTTGGAAGATCTAGAACACAGGGATCTA
AGCAACAGTGATGAATCAGTAAACAACAGCAACATGCTTCCGAAGATTCTCATTCCGTGTAA
TGCAGAGCTGAGGCGAGAGCATCAGTTCACGCATTTTCAGTCCCTGCGATTTCACTGTCTA
GATGAACTGGTTTTTTGCCCAACATCGACTGGTATCCAAATTGCAGGGTGTGGGCAACGGA
ACATACGCGGAGGATTCTTCGAATAAAAATGTGGCTTATTGTAGTTTATTTACAAGATAAAGT
GCAGCATATCGGTTATTGGCTAGCTTATATCTACACTACAATAATAAAAATAAAAAACACTGCA
CATCAATGTGCAGAATTCCTCAGG
```

**B**

```
MQIRSMASGAILPVSVPFALELDLEHRDLSNSDES VNNSNMLPKILIPCNAELRREHQFTHFE
SLRFHCLDELVFCPTSTGIQIAGCGQRNIRGGFFE
```

**Figura 8: Secuencia del gen de *Pp214* obtenida de la página del Phytosome v12.0.** A. Extremo 5'UTR en verde, 3'UTR en violeta y secuencia codificante en azul. B. Secuencia aminoacídica predicha para *Pp214*.

Al estudiar la secuencia nucleotídica del gen *Pp214* no se encontraron dominios conservados ni homología con secuencias de otros organismos anotados en la base de datos del NCBI, aunque su secuencia aminoacídica sí presenta homología con fragmentos de proteínas relacionadas a los sistemas de secreción tipo IV y VI, y toxinas de bacterias patógenas (Figura 9). Al analizar los datos de la comparación de secuencias, aparece en primer lugar la proteína *Pp214* (XP\_001756406.1) con una identidad de secuencia del 97% comparado con la secuencia del *Pp214* obtenida del Phytosome. Esto probablemente se deba a diferencias de anotación de las secuencias, En segundo lugar aparece una segunda proteína de *P. patens* (*Pp214*-like; XP\_001776320.1) con una identidad de secuencia del 73% con *Pp214*.



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">predicted protein [Physcomitrella patens]</a>	177	177	88%	7e-56	97%	<a href="#">XP_001756406.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">predicted protein [Physcomitrella patens]</a>	56.2	56.2	36%	1e-07	73%	<a href="#">XP_001776320.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">type VI secretion system tip protein VgrG [Escherichia coli]</a>	37.7	37.7	51%	1.6	42%	<a href="#">WP_077778012.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">type VI secretion system tip protein VgrG [Escherichia coli]</a>	37.7	37.7	51%	1.6	42%	<a href="#">WP_001536267.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhs element Vgr protein [Klebsiella oxytoca]</a>	36.2	36.2	51%	5.6	42%	<a href="#">WP_064342542.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">type VI secretion system tip protein VgrG [Klebsiella oxytoca]</a>	36.2	36.2	51%	6.0	42%	<a href="#">WP_064411775.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">type IV secretion protein Rhs [Klebsiella michiganensis]</a>	36.2	36.2	51%	6.1	42%	<a href="#">WP_049130570.1</a>

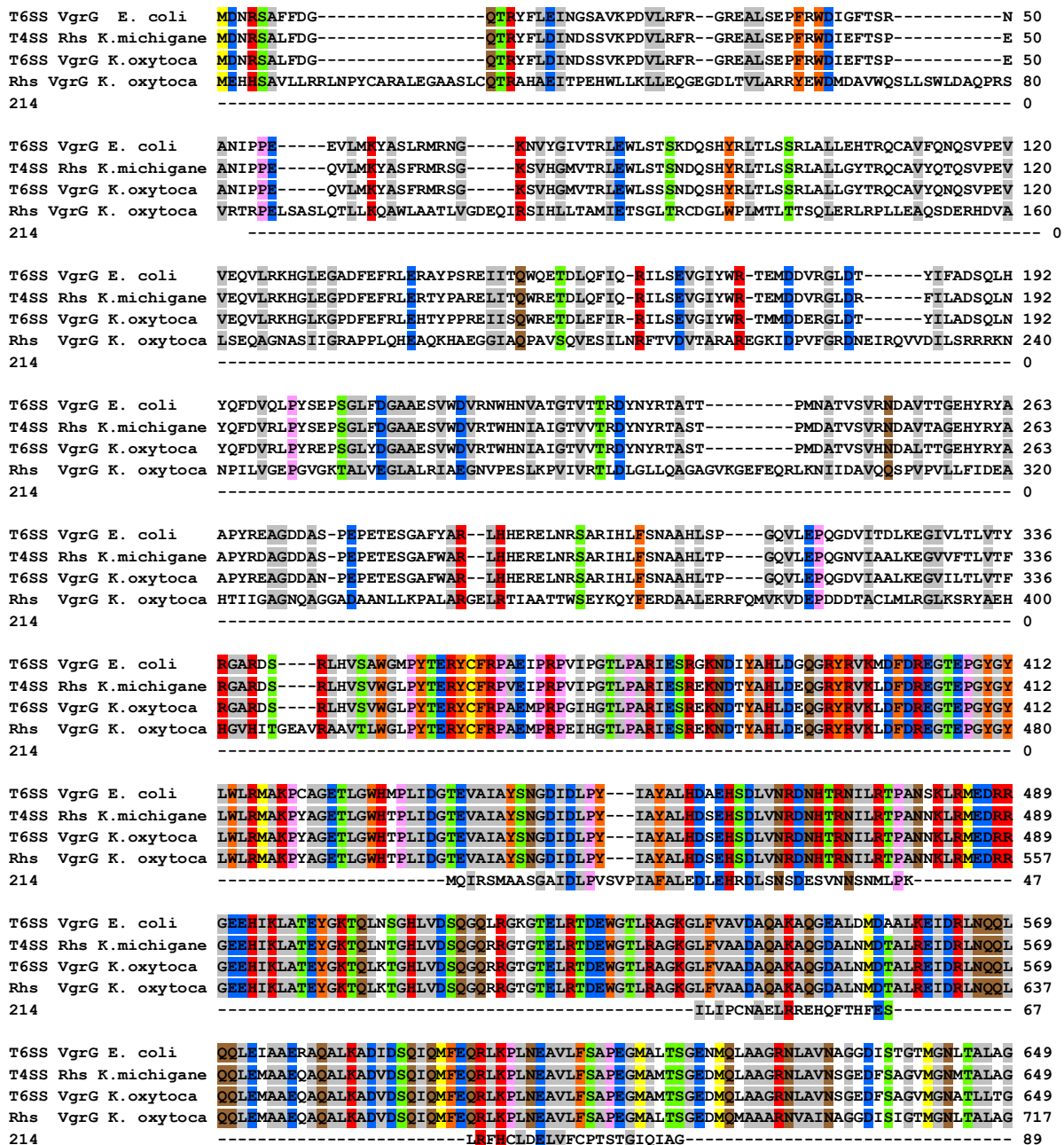
**Figura 9: Imagen obtenida de la página del NCBI donde se observa el porcentaje de identidad que posee la secuencia aminoacídica de Pp214 con otras proteínas.** La primera en la lista es una versión del mismo gen Pp214 obtenida en el NCBI, que por la manera en que fue obtenida difiere levemente de la trabajada. La segunda secuencia corresponde a Pp214-like y las siguientes corresponden a proteínas predichas de diferentes bacterias.

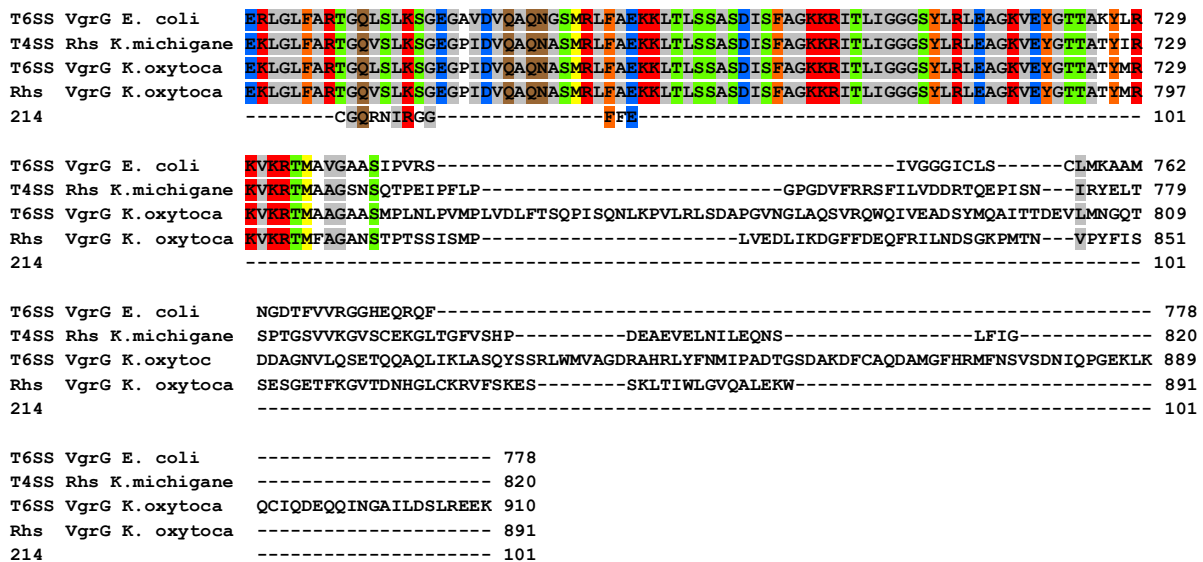
Todas las siguientes proteínas que tienen cierta identidad de secuencia con Pp214, 42% en una región, pertenecen a un conjunto de proteínas de bacterias denominadas VgrG (“valine-glycine repeat”) del tipo de secreción VI de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*). Este tipo de sistema se ha encontrado en más bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, y se sabe que está implicado y es crucial para procesos de virulencia en *Vibrio cholerae* (Pukatzki et al., 2006). Durante la patogénesis las bacterias pueden afectar las células del hospedero liberando toxinas o enzimas que alteran la función celular, o ensamblar estructuras como pili o adhesinas que promueven la adherencia a la superficie de estas células huésped. Se han estudiado varias proteínas VgrG de diversos patógenos, prediciendo mediante algoritmos la formación de una estructura trimérica “tailspike” análoga a la ensamblada por el bacteriófago T4 de *E. coli* (Pukatzki et al., 2007). Esta estructura sería capaz de penetrar membranas y servir de conducto para el pasaje de proteínas antibacterianas directamente en el periplasma de las células blanco (Russell et al., 2011). En algunos casos se han encontrado proteínas VgrGs con un dominio efector en la región C-terminal, el cual suele ser una enzima que es liberada en el citosol de la célula blanco interfiriendo con el citoesqueleto de células eucariotas y causando citotoxicidad (Pukatzki et al., 2009; Suarez et al., 2010). A modo de ejemplo, se encontró que *P. aeruginosa* es capaz de inyectar una hidrolasa de peptidoglucano en el periplasma de bacterias gram negativas, causando destrucción de la pared celular y posterior lisis (Hood et al., 2010; Hood et al., 2011).

Se encuentra también homología con dos proteínas Rhs (por “rearrangement hotspot”) del tipo VgrG, las cuales son utilizadas por el sistema de secreción tipo IV de la bacteria *Klebsiella michiganensis* (*K. michiganensis*) y *K. oxytoca*. Se cree que esta clase de proteínas están implicadas en la competencia intercelular, habiendo sido encontradas tanto en células procariontas como eucariotas. Se han encontrado a su vez, dominios C-terminales que actuarían como toxinas, las cuales en el medio extracelular inhibirían el crecimiento de las células adyacentes (Koskiniemi et al., 2013). Un claro ejemplo de la función es una proteína que posee un dominio nucleasa, capaz de degradar el ADN exógeno. Están a su

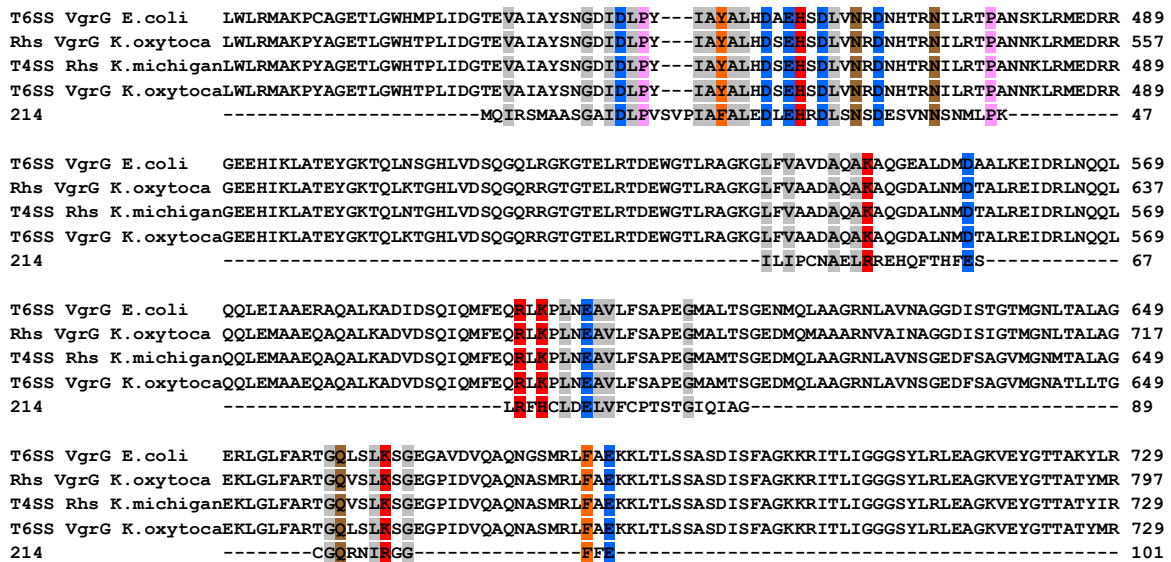
vez asociadas a diversas proteínas que neutralizan la acción de la toxina de manera de evitar una autoinhibición (modelo toxina-antitoxina; Koskiniemi et al., 2014).

Al comparar la secuencia aminoacídica de las proteínas bacterianas, se observa que varían en el largo de la secuencia, siendo la más corta de 778 aminoácidos (VgrG perteneciente a *E. coli*) y 910 aminoácidos la más larga (perteneciente a *K. oxytoca*) (Figura 10). Se observa a su vez que el porcentaje de identidad entre las proteínas correspondientes a los sistemas de secreción tipo IV y VI es menor hacia los extremos y aumenta hacia el centro, donde alinea *Pp214* (Figura 10,11). Esto lleva a pensar que los aminoácidos centrales son aquellos de mayor importancia, siendo indispensables para la correcta función de cada proteína y por lo tanto imponiendo mayor presión selectiva de conservación a lo largo de la evolución.





**Figura 10: Alineación de las secuencias de las proteínas VgrG y Rhs pertenecientes a los sistemas de secreción tipo 4 y 6 (T4/6SS) de *K. oxytoca*, *K. michiganensis* y *E. coli* con la correspondiente a *Pp214*.** Se utilizó el programa Sequence Manipulation Suite (SMS) para mejorar la visualización de los resultados obtenidos en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Los colores representan y agrupan a los diferentes aminoácidos según su naturaleza: los alifáticos en gris (glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina), los aromáticos en naranja (fenilalanina, triptófano y tirosina), polares en amarillo (cisteína y metionina), verde (serina y treonina) y marrón (asparagina y glutamina), básicos en rojo (arginina, histidina y lisina), ácidos en azul (aspártico y glutámico) y en rosa prolina. Se colorean aquellos aminoácidos que coinciden en el 80% de las secuencias y se muestran 80 de ellos por línea.



**Figura 11: Alineamiento de secuencia aminoacídica en el que sólo se resaltan los aminoácidos que se encuentran en las cinco proteínas (100% de identidad).** Se utilizó la misma referencia de colores que en la figura anterior.

La similitud encontrada entre *Pp214* y proteínas del sistema de secreción utilizados por bacterias patógenas lleva a pensar que ésta puede haber sido incorporada al genoma del

musgo por transferencia horizontal y haber sufrido modificaciones a lo largo del tiempo, adquiriendo una nueva función. Dado que *P. patens* ha adquirido por transferencia horizontal de hongos, bacterias y virus, 128 genes nucleares pertenecientes a 57 familias diferentes (Yue et al., 2012), *Pp214* podría eventualmente haber sido adquirido por estos eventos aunque se necesita mayor cantidad de estudios para confirmar esto. Es interesante además que varias de las proteínas VgrG estén asociadas a algunos procesos relacionados con la muerte celular, al igual que *Pp214*. Como se mencionó anteriormente algunas VgrG, participan en la formación de estructuras que atraviesan membranas celulares que en algunos casos liberan enzimas que causan citotoxicidad, mientras que algunas actúan como toxinas.

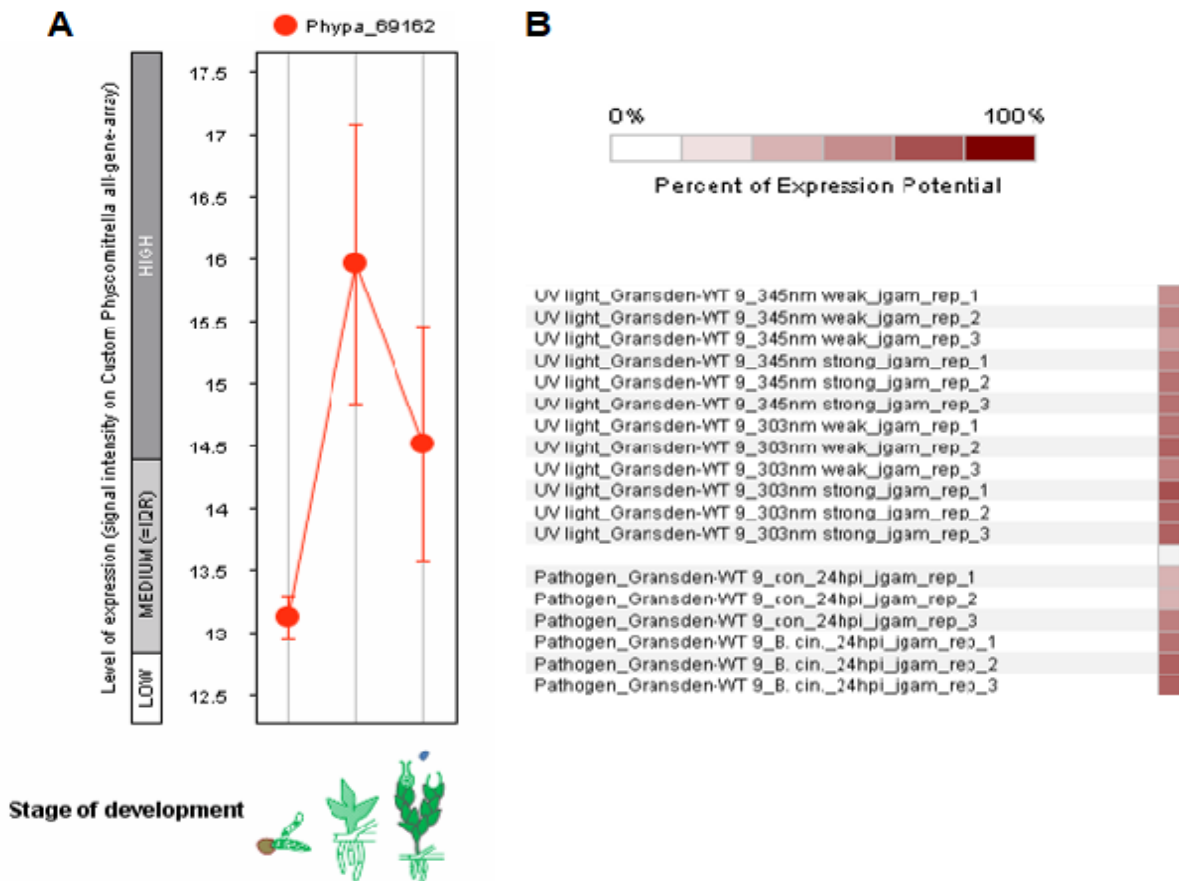
Con el objetivo de analizar la posible localización subcelular de *Pp214* que pudiera aportar información sobre su posible función, se utilizó el programa PSORT (<https://psort.hgc.jp/>). Este programa da una probabilidad del 45.0% de localización citoplasmática y del 42.8% de localización en la matriz mitocondrial. Para confirmar la localización subcelular de *Pp214* se deberán realizar estudios de expresión transitoria con *Pp214* fusionado a la Proteína Fluorescente Verde (GFP) en hojas de tabaco. Sería interesante poder confirmar la localización en la mitocondria, dado que este organelo está relacionado con la muerte celular.

#### **4.2. Expresión de *Pp214* en *P. patens* durante el desarrollo, diferentes tejidos y diferentes condiciones**

Mediante estudios in silico en el Genevestigator (<https://genevestigator.com/>) y el Phytozome se estudió el patrón de expresión de *Pp214* en diferentes condiciones. En el Genevestigator *Pp214* presenta una expresión media durante la fase de germinación de la espora, que aumenta significativamente durante el proceso de crecimiento y diferenciación del tejido en la formación de gametóforos, para luego disminuir al formarse el esporofito el cual tiene las estructuras reproductivas (Figura 12A).

En la misma base de datos también se analizaron varias condiciones y tejidos de *P. patens* en los que se ve un aumento de expresión de *Pp214*. Encontramos como condiciones de alta expresión (aumento de hasta 83,3 %), la exposición a luz UV de intensidad 303 y 345 nm durante 1 hora (Figura 12B).

Otro tratamiento que induce la expresión de *Pp214* es la infección con el patógeno *B. cinerea* (Figura 12B), aumentando a las 24 hs post infección entre un 33, 3 y 66,6% aproximadamente. Este resultado coincide con lo observado en los antecedentes del grupo de investigación en los ensayos de Northern blot (Figura 4).



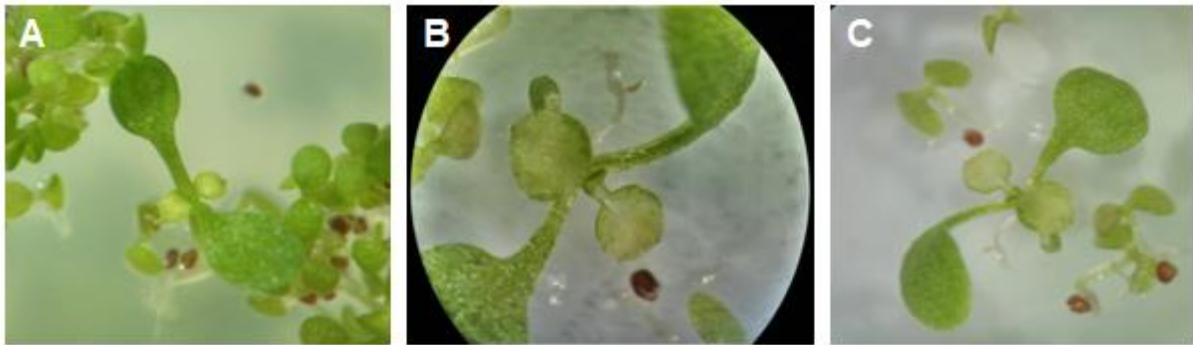
**Figura 12: Condiciones y niveles de inducción del transcripto *Pp214* en *P. patens*.** **A.** Nivel de expresión del transcripto en diferentes fases de desarrollo de *P. patens*. El círculo rojo pertenece al nivel de inducción con su respectivo error asociado. **B.** Expresión de *Pp214* en diferentes condiciones, incluyendo diferentes longitudes de onda e intensidades, e infección con *B. cinerea* (como control se utilizó agua). Se incluye una barra con diferentes intensidades de color que corresponde al porcentaje de expresión de *Pp214* encontrado en las diferentes situaciones.

En el Phytozome hay datos de expresión de *P. patens* sometidos a algunos tratamientos. Los niveles de transcripto de *Pp214* aumentan en dos condiciones; tratamiento con la hormona ABA y con el precursor del JA, el ácido oxofitodienoico (OPDA). Este resultado junto con el hecho de que *Pp214* se expresa con patógenos es interesante dado que tanto el ABA como el OPDA participan en la respuesta de defensa frente a patógenos en varias plantas (Adie et al., 2007).

#### 4.3. Análisis de plantas transformadas de *A. thaliana* con una construcción que expresa *Pp214* bajo el control de un promotor constitutivo.

Se analizaron las plantas transformantes generadas previamente en el laboratorio con el vector pUB-DEST para expresar *Pp214* bajo el control del promotor constitutivo de la ubiquitina. Anteriormente se había observado en la To que las primeras hojas verdaderas presentaban lesiones espontáneas. Los síntomas se volvieron a observar al plaquear la To

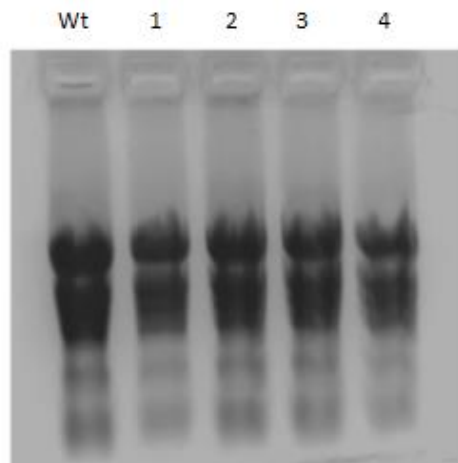
en medio con selección por tres semanas. Los síntomas observados se pueden ver en la Figura 13. Se observa una pérdida de clorofila en las primeras hojas verdaderas de la primera generación de transformantes.



**Figura 13: Fotografías tomadas de la primera generación T<sub>0</sub> de plantas de *A. thaliana* transformadas con *Pp214* bajo control del promotor constitutivo ubiquitina en medio R suplementado con el herbicida BASTA 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a los 21 días.**

Previamente se habían seleccionado varias líneas homocigotas F<sub>2</sub> que lograron sobrevivir a la selección y las cuales no presentaban lesiones espontáneas a simple vista. Se utilizaron 4 de estas líneas para ver los niveles de expresión de *Pp214* (líneas 1, 2, 3 y 4).

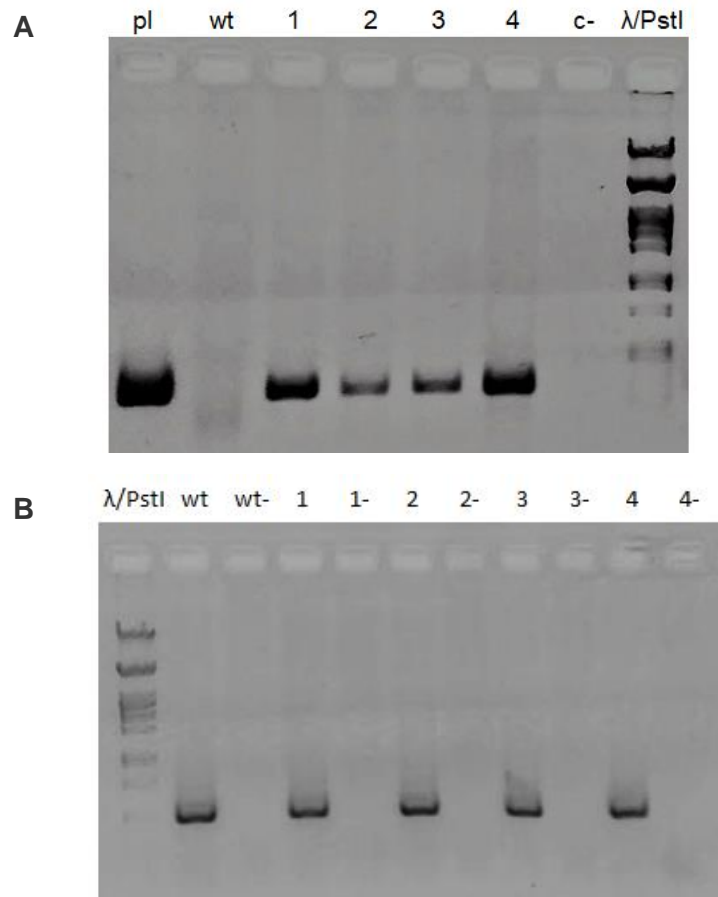
Para ello se extrajo ARN total de muestras de tejidos de hojas congeladas, se cuantificó su concentración en un Nanodrop y se comprobó la integridad de éstos en un gel desnaturizante de agarosa 1,5% (Figura 14).



**Figura 14: Comprobación de la integridad de las muestras (salvaje, líneas 1, 2, 3 y 4).** Se aprecia la presencia de los ARN ribosomales. La muestra perteneciente a las plantas salvaje presenta una mayor cantidad de ARN en el gel, lo cual se utilizó para estimar la concentración empíricamente y ajustar los valores para RT-PCR.

Luego se procedió a realizar un RT-PCR semicuantitativo. Para esto se tomaron 2  $\mu\text{g}$  de ARN total de cada muestra y se eliminó la posible presencia de ADN genómico mediante digestión con DNasa I. Posteriormente se sintetizaron los cDNAs con oligodT utilizando la enzima ProtoScript II, y se realizaron los PCRs con oligonucleótidos correspondientes a *Pp214* (*Pp214 fwa* y *Pp214 rva*) y al gen de la tubulina como control de expresión basal o

“housekeeping”. Para descartar la amplificación debido a contaminación con ADN genómico, se utilizaron como control negativo de cada amplificación las mismas muestras sin presencia de la enzima transcriptasa reversa. Se visualizaron los resultados del RT-PCR en un gel de agarosa 1,5% teñido con BrEt. (Figura 15).



**Figura 15: Análisis del nivel de expresión del ARNm de *Pp214* y *Tubulina* en hojas de *A. thaliana* que poseen el gen en estudio bajo el control de un promotor constitutivo.** Geles de agarosa 1,5% teñido con BrEt. **A.** Diferentes niveles de expresión del ARNm de *Pp214* en las diferentes líneas de estudio. **B.** Expresión del gen de la *Tubulina* (constitutivo). En B se muestran los carriles con los controles negativos sin RT.  $\lambda$ /PstI marcador de peso molecular, wt; plantas salvajes, 1-4 líneas de *A. thaliana* en estudio con sus controles negativos y pl; plásmido que posee el gen inserto (2 ng) .

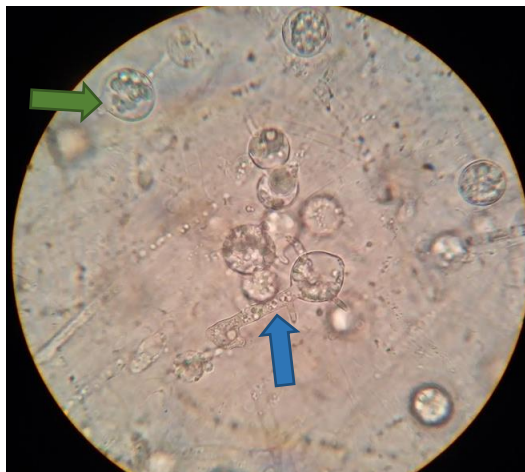
Como se aprecia en la Figura 15B, el ARNm codificante para la proteína tubulina se expresa de forma constante en todas las muestras analizadas, generando el producto de PCR de 508 pb de largo. A 28 ciclos se observa la presencia del transcritpo *Pp214* en las líneas transgénicas 1-4, mientras que en las plantas salvajes este es inexistente (Figura 15A). El tamaño del producto de amplificación obtenido es de 326 pb, lo que corresponde con el tamaño esperado. La falta de detección de *Pp214* en las plantas salvajes era esperable dado que no existen genes con similitud de secuencia a *Pp214* en el genoma de *A. thaliana*. Las líneas 1 y 4 son las que expresan en mayores cantidades el gen exógeno. Las diferencias en los niveles de expresión de *Pp214* en las diferentes líneas se puede deber a

la inserción de múltiples copias del transgen o la zona de inserción en el genoma de *A. thaliana*.

#### 4.4. Ensayos de infección con patógenos en líneas transformadas

Se procedió a infectar las plantas salvajes y las cuatro líneas transformadas con *Pythium irregulare* y se trataron también con el CF de *P.c. carotovorum*. La elección de estos patógenos se debió a que afectan un número importante de cultivos diferentes y representan patógenos que causan importantes enfermedades en Uruguay. Para las infecciones se tuvieron en cuenta la edad de la planta, temperatura ambiente, humedad relativa, cantidad de inóculo y edad de éste, la luz y la hora del día a la que se llevaron a cabo (Liu Y et al, 1998). Estos parámetros son importantes debido a que las defensas de la planta y resistencia a enfermedad dependen significativamente de la hora del día a la que el patógeno toma contacto con la planta (Carver et al 1994; Lauter et al 1993; Griebel et al, 2008).

En el caso de *P. irregulare* se procedió a infectar con micelio (disco de agar conteniendo el micelio) (Oliver et al., 2009). Se tuvo en cuenta que *P. irregulare* no perdiera la virulencia luego de varios pasajes por placa de PDA, y para ello se infectaron plantas de *P. patens* y se recuperó el micelio luego de colonizada la planta para asegurar la virulencia, También se trabajó para llegar a una fuente de inóculo diferente del micelio y si bien se llegaron a conseguir zoosporas (forma de reproducción asexual del oomicete), estas no fueron suficientes para poder infectar y tener síntomas reproducibles (Figura 16).



**Figura16:** Estructuras de reproducción asexual producidas por *P. irregulare* luego de dos semanas en agua y oscuridad. Imágenes tomadas a un aumento de 100x. Zoosporangios y micelio de *P. irregulare*. Se aprecian zoosporas esféricas dentro de los zoosporangios (flecha verde) y una vesícula saliendo de uno de éstos (flecha celeste).

Luego de la infección se observaron visualmente los síntomas y se procedió al análisis del daño celular generado por los patógenos mediante tinciones con azul de Evans. Este colorante entra en las células dañadas y el área con lesión se puede cuantificar y asociar

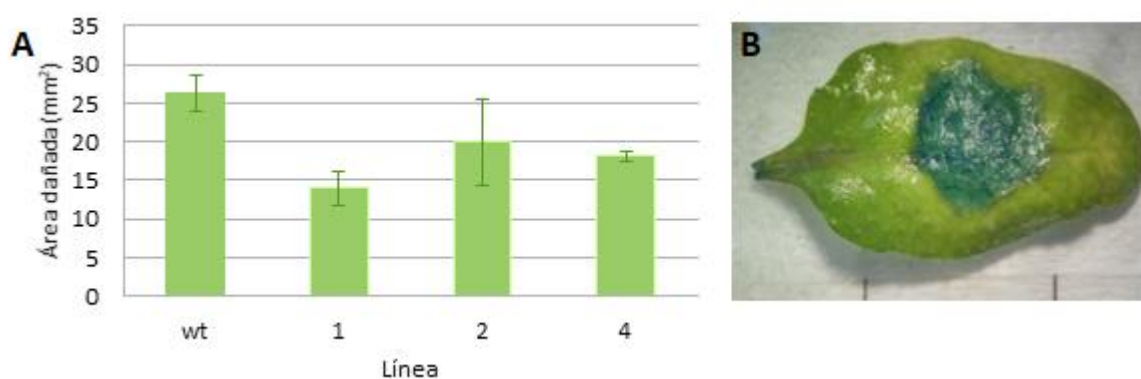


con el nivel de resistencia. Se observaron diferencias en el nivel de daño entre las diferentes líneas estudiadas, aunque si bien hay una tendencia de mayor resistencia de la línea 1 y 4, los resultados no fueron significativos dado que el número de muestras fue de 3 hojas (Figura 17). La que presentó menor lesión frente al patógeno *P. irregulare* fue la línea 1, seguida por la 4, 2 y plantas salvajes (Tabla 2). En este ensayo la línea 3 estaba estresada por lo que no se tuvieron en cuenta los datos.

**Tabla 2: Cuantificación del área foliar con muerte celular en hojas de *A. thaliana* frente al ataque del patógeno *P. irregulare*.** Los resultados son un promedio de 3 hojas por línea. Se muestra el promedio, el desvío estándar y la disminución del área dañada respecto a plantas del genotipo salvaje.

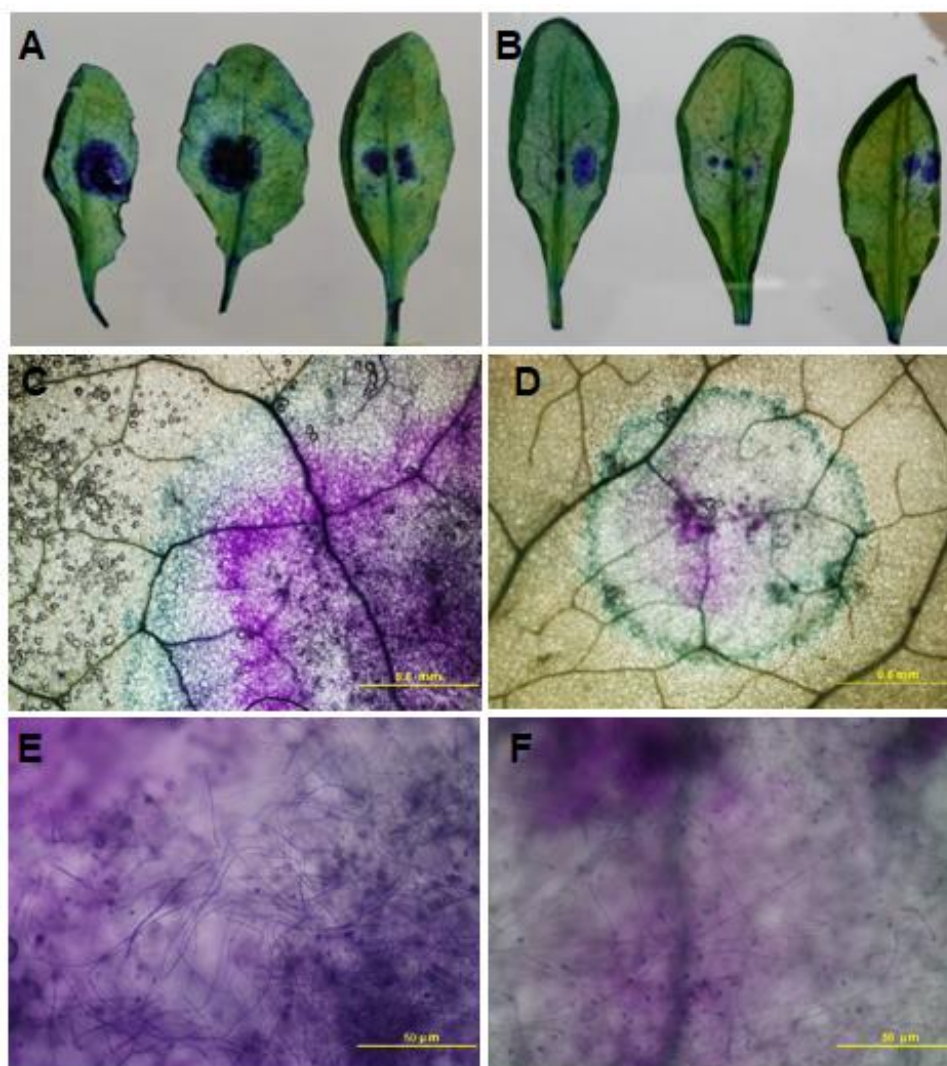
	Promedio (mm <sup>2</sup> )	Desvío estándar	Relativo al salvaje
Salvaje	26.3	2.4	1
1	14.0	2.2	0.53
2	20.0	5.6	0.76
4	18.1	0.6	0.68

Se observa en la tabla 2 y Figura 17A como el daño foliar causado por el oomicete en las líneas 1 y 4 es menor al causado en hojas de plantas salvajes de *A. thaliana*. La diferencia es de casi la mitad en la línea 1 y  $\frac{2}{3}$  en la 4.



**Figura 17: Área foliar dañada durante el ensayo de infección con *P. irregulare*.** **A.** Gráfica comparativa del daño causado por el oomicete en tres hojas de cada línea de trabajo con su respectiva desviación estándar. **B.** Fotografía de una hoja de *A. thaliana* del genotipo salvaje luego de teñir la zona de daño con el colorante azul de Evans. Se puede observar la regla utilizada para calibrar la regla del programa ImageJ.

En un segundo ensayo de infección con *P. irregulare* se hicieron tinciones con azul de Toluidina. Este colorante tiñe la incorporación de compuestos fenólicos en la pared luego del daño producido por el patógeno. En este trabajo lo tomamos como un colorante que indica indirectamente el daño generado. La tinción de las hojas infectadas con el colorante azul de Toluidina nos permite distinguir dos zonas diferentes dentro del tejido colonizado por *P. irregulare*. La región central es la que ha sufrido mayor daño celular, lo que se traduce en una mayor incorporación de compuestos fenólicos en las paredes de las células dañadas dando un color violeta intenso (Figura 18 A y B).



**Figura 18: Daño celular y crecimiento micelial del oomicete sobre hojas de *A. thaliana* teñidas con azul de Toluidina. A y B.** Comparación de tres hojas correspondiente a plantas salvajes y de la línea 1 (respectivamente) teñidas con azul de Toluidina en las que se aprecian los colores azul y violeta en el área foliar dañada por *P. irregulare*. **C y D.** Microfotografías de la zona de infección en una hoja salvaje y de la línea 1. **E y F.** Hifas de *P. irregulare* colonizando el tejido en la zona de infección teñida de violeta en plantas salvajes y línea 1.

Se observa a su vez una segunda zona más externa de un color azul claro, indicando la incorporación de compuestos fenólicos del tipo pectinas en las paredes celulares (Asselbergh et al., 2007). En esta zona azul clara se encontró una menor cantidad de micelio y el tejido muestra menores signos de daño. El halo azul claro es mayor y más definido en las hojas de las líneas transformantes para *Pp214* respecto a la zona teñida de violeta en hojas de plantas salvajes. Esto sugiere que la capacidad de reacción, fortalecimiento de la pared y contención de lesión podría ser más eficiente en las plantas transformadas que en las plantas salvajes (Figuras 18 B y C). La presencia de mayor incorporación de compuestos fenólicos del tipo pectina en las líneas transformadas es muy interesante dado que se conoce que existe una contribución importante de la cantidad y estructura de las pectinas en la respuesta de defensa de las plantas, e incluso se describieron mecanismos de virulencia utilizados por los patógenos para modificar o

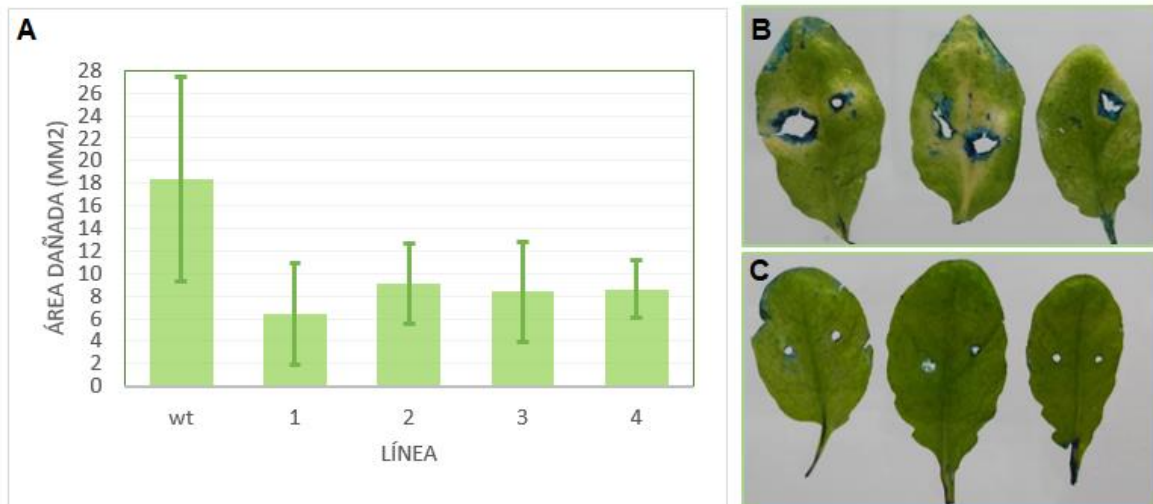
degradar las pectinas con el objetivo de colonizar los tejidos vegetales (Ferrari et al., 2012; Lionetti et al., 2012; Bellincampi et al., 2014). Por otro lado se observó la presencia del oomicete colonizando tanto tejido proveniente de plantas salvajes como de la línea 1, aunque en menor proporción en el primero (Figura 18 D y E). La presencia de mayor biomasa del patógeno en plantas salvajes en comparación con las líneas que sobreexpresan *Pp214* podrá ser corroborado mediante PCR en tiempo real (qPCR).

También se realizaron ensayos en los cuales se trataron a las diferentes plantas con el CF de *P.c. carotovorum* luego de realizado una pequeña herida con la punta de un tip. El daño observado mediante tinciones con azul de Evans es significativamente mayor en las plantas salvajes respecto a las plantas transformantes (Tabla 3 y Figura 19). Mediante el programa Statistica se pudieron comparar los datos y estudiar qué tan significativos son. Se obtienen valores P muy pequeños para las líneas 1 y 4, 0.000009 y 0.007200 respectivamente, respecto a plantas salvajes. También son estadísticamente diferentes los datos provenientes de las líneas 2 (0.018534) y 3 (0.015441), aunque presentan más desviación.

**Tabla 3: Comparación del área foliar dañada con 10 µL del CF de *P. carotovorum* entre las líneas en estudio.**

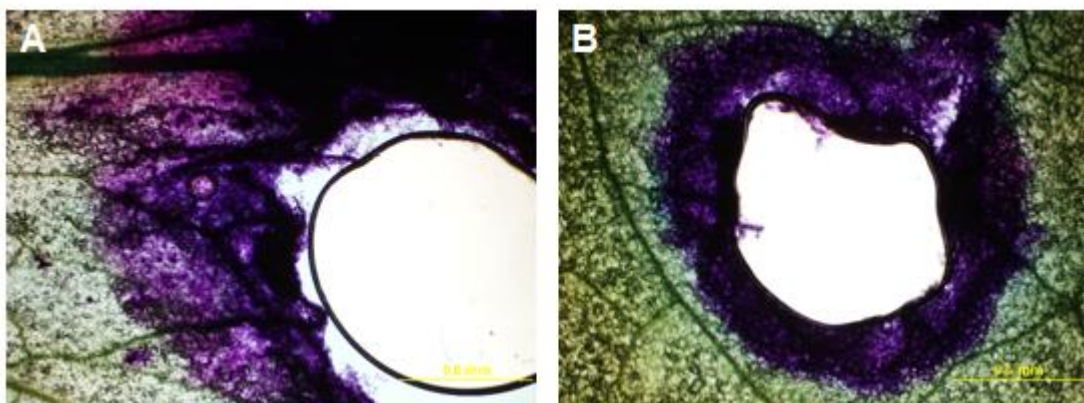
Línea	Promedio (mm <sup>2</sup> )	Desvío estándar (mm <sup>2</sup> )	Relativo al salvaje
salvaje	18.388	9.052	1
1	6.388	4.495	0.347
2	9.121	3.544	0.496
3	8.360	4.392	0.455
4	8.577	2.530	0.466

Se observa además un abundante amarillamiento en la superficie de varias hojas de plantas salvajes conferido por la degradación de clorofila, síntoma que se atribuye al entrar las células en un estado de senescencia celular. Este amarillamiento se encontró casi exclusivamente en aquellas hojas provenientes de plantas salvajes, estando las correspondientes a las líneas que poseen *Pp214* bajo el control del promotor constitutivo ubiquitina, en mejor estado y más verdes. También es mayor el área dañada y la tinción con azul de Evans alrededor de la herida en aquellas hojas de plantas de genotipo salvaje (Figura 19 B y C). Estos resultados demuestran que mientras que en las plantas salvajes las diferentes enzimas que degradan la pared celular y el harpin presentes en el CF están produciendo mayor daño, en la plantas que sobreexpresan *Pp214* las enzimas y el harpin generan un daño menor.



**Figura 19: Análisis del nivel de daño promedio por hoja y síntomas observados en la línea salvaje y 1 transcurridas 48 horas del tratamiento con el CF de *P.c. carotovorum*.** **A.** Gráfica que muestra el nivel de daño ocasionado por el CF de *P.c. carotovorum* sobre 10 a 17 hojas de las líneas de *A. thaliana* en estudio. **B y C.** Tres hojas de *A. thaliana* salvaje (arriba) y línea 1 (abajo) tratadas con 10 uL del CF de *P.c. carotovorum* luego de realizado una pequeña herida con un tip. Las lesiones fueron teñidas con azul de Evans, indicador de muerte celular.

Al hacer tinciones con azul de Toluidina de las hojas tratadas con el CF, se pudo observar que la zona teñida es toda de color violeta, indicando la incorporación de compuestos fenólicos en la pared de las células dañadas. La zona teñida fue mayor en las hojas de plantas salvajes tratadas con el CF en comparación con las hojas de plantas que sobreexpresan *Pp214* (línea 1) (Figura 20).



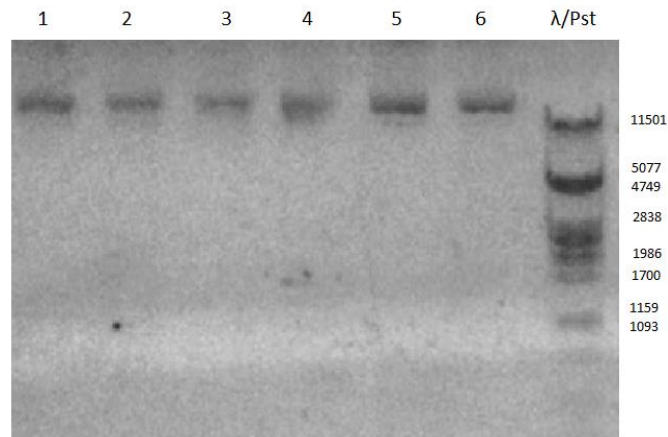
**Figura 20: Micrografía de hojas de *A. thaliana* salvaje (A) y línea 1 (B) en las que se observa la incorporación del colorante de azul de Toluidina en hojas tratadas con el CF de *P.c. carotovorum*.** Se observa en violeta aquella zona que sufrió daño celular. Ambas imágenes se encuentran al mismo aumento, pudiendo apreciar la herida realizada con el tip y la diferencia de tamaño de las zonas teñidas en plantas salvajes y la línea transgénica 1. La escala equivale a 0.6 mm.

Los resultados muestran por lo tanto que las plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan *Pp214* podrían ser más resistentes a *P. irregulare* y el daño provocado por el CF de *P.c. carotovorum* es significativamente menor que el observado en plantas salvajes. El nivel de daño observado en las plantas inoculadas con *P. irregulare* está relacionado con los niveles de transcritos, especialmente en la línea 1 y 4, las cuales son las líneas que sobreexpresan mayores niveles de *Pp214*. Estos resultados demuestran la importancia de repetir la inoculación con *P. irregulare* en un número mayor de hojas, se utilizaron 3 hojas por genotipo, para poder obtener datos más significativos. En el caso del tratamiento con el CF de *P.c. carotovorum* el número de hojas utilizadas fue mucho mayor (10 a 17). Las diferencias entre los tratamientos se pueden deber a que el CF se preparó una sola vez y todas las plantas fueron tratadas con la misma cantidad de enzimas y harpin, mientras que con el micelio de *P. irregulare* el crecimiento puede variar entre hojas y producir variaciones en el tipo de síntoma observado. Dado que se trata de un gen que se induce en *P. patens* durante una situación de defensa de sus tejidos, los datos sugieren que en otra planta como *A. thaliana*, en las cuales no hay genes con identidad de secuencia con *Pp214*, también cumple una función de defensa frente a microorganismos patógenos. Es interesante este aumento de resistencia para estos dos patógenos, los cuales son necrótrofos (organismos que matan a las células vivas de su hospedero para nutrirse de éstas) y generan enfermedad en diversos cultivos del país. Los resultados son por lo tanto alentadores y muestran que *Pp214* actúan en la defensa de *A. thaliana*. Habrá que estudiar en un futuro el modo de acción de *Pp214* y cómo protege a las células de la planta de la colonización por patógenos. Una posible explicación es que *Pp214* induce la muerte celular. Si bien falta demostrar esta teoría, varios datos sugieren esto, incluyendo el hecho que no se logren transformar protoplastos de *P. patens* que sobreexpresan *Pp214*, así como las lesiones espontáneas encontradas en algunas de las plantas de *A. thaliana* transformadas con *Pp214* bajo el control de un promotor constitutivo. Una posible explicación es que estas plantas con lesiones espontáneas presentan niveles muy altos de *Pp214*. Las cuatro líneas utilizadas no presentan lesiones a simple vista pero podrían tener inducida la muerte celular de un número reducido de células. La muerte de estas células podría desencadenar una respuesta de defensa, haciendo estas plantas más resistentes a infecciones o tratamiento con enzimas que degradan la pared celular.

#### **4.5. Generación de la construcción para sobreexpresar *Pp214* bajo el control de un promotor inducible y transformación de plantas de *A. thaliana***

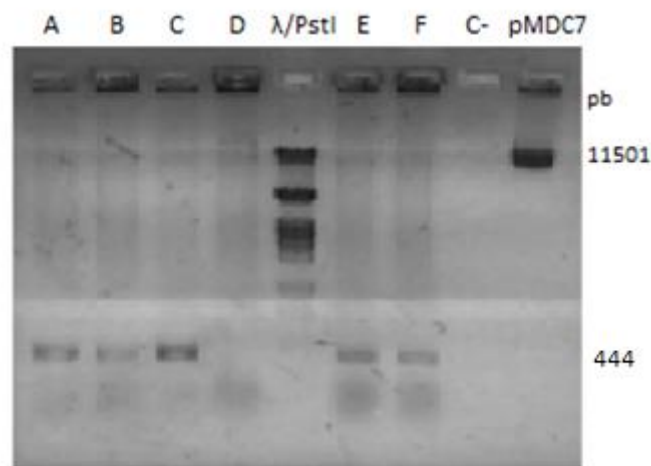
Dado que algunas plantas transformadas con *Pp214* bajo el control del promotor de la ubiquitina presentaban lesiones espontáneas, se decidió transformar plantas de *A. thaliana* con *Pp214* bajo el control de un promotor inducible. Se partió del gen *Pp214* inserto en el plásmido pENTR 2B y se realizó una recombinación específica de sitio con el fin de obtener el gen en estudio en un plásmido de expresión inducible tanto en bacterias como en plantas. Se escogió en este caso el vector pMDC7 del sistema Gateway, el cual tiene un promotor inducible por  $\beta$ -estradiol. Luego de dicha recombinación se procedió a transformar una cepa de *E. coli* quimiocompetente. Se seleccionaron varias colonias transformantes y repicaron en medio LB agar suplementado con el antibiótico Sp (50  $\mu$ g/mL). Luego del segundo repique se crecieron en el mismo medio líquido a 37°C en agitación durante toda la noche.

Se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico de la construcción pMDC7-*Pp214* y se realizó una corrida electroforética para comprobar la calidad de los plásmidos y estimar la concentración obtenida. (Figura 21)



**Figura 21: Gel de agarosa al 0.8% teñido con BrEt conteniendo las extracciones de ADN plasmídico de colonias transformantes de *E. coli*. 1-6 ADN plasmídico de colonias seleccionadas. Se observa que el tamaño de las bandas coincide con el esperado para este vector (13017 pb).**

Se llevó a cabo una PCR utilizando como molde la extracción plasmídica previa para comprobar la presencia del gen *Pp214* con los oligonucleótidos cuya secuencia es complementaria a los extremos 5' UTR y 3' UTR del gen de interés (*P214 fw* y *P214 rv*), visualizándose el resultado en un gel de agarosa 0,8%. (Figura 22).



**Figura 22: Comprobación de la presencia del gen *Pp214* inserto en el plásmido extraído. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% teñido con BrEt en el que se muestra el producto de PCR de las colonias A-F utilizando oligonucleótidos específicos para *Pp214*.**

Se detectó la presencia del producto de PCR del tamaño esperado (444 pb) en todos los plásmidos menos en el carril D. Se seleccionó la colonia A la cual fue conservada en glicerol, y se envió a secuenciar el ADN plasmídico al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo para asegurar la presencia de la secuencia íntegra, en el lugar deseado, sin ningún cambio de bases que pudiese afectar su posterior traducción. Los resultados de la secuenciación fueron curados y se corroboró que no existieran mutaciones en la secuencia codificante del gen *Pp214* (Figura 23).

```

214 pmDc7 -----NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCGAGGANAATTCTCTCCTCGTGG 51
214 cromos2 GAATGCAAGGCAACGCCAATGTGTCTGTAAAGATTCTCCTCTTGGGAAAGACAAGCGAGGAGAAATTCTCTCCTCGTGG 80

214 pmDc7 GATTGAGGAATGCAAATTCGCAGCATGGCTGCATCAGGAGCGATCGATCTGCCTGTTTCTGTACCCATTGCATTTCGCTTT 131
214 cromos2 GATTGAGGAATGCAAATTCGCAGCATGGCTGCATCAGGAGCGATCGATCTGCCTGTTTCTGTACCCATTGCATTTCGCTTT 160

214 pmDc7 GGAAGATCTAGAACACAGGGATCTAAGCAACAGTGAATCAGTAAACAACAGCAACATGCTTCCGAAGATTCTCATTC 211
214 cromos2 GGAAGATCTAGAACACAGGGATCTAAGCAACAGTGAATCAGTAAACAACAGCAACATGCTTCCGAAGATTCTCATTC 240

214 pmDc7 CGTGTAATGCAGAGCTGAGGCGAGAGCATCAGTTCACGCATTCGAGTCCCTGCGATTTCACTGTCTAGATGAACTGGTT 291
214 cromos2 CGTGTAATGCAGAGCTGAGGCGAGAGCATCAGTTCACGCATTCGAGTCCCTGCGATTTCACTGTCTAGATGAACTGGTT 320

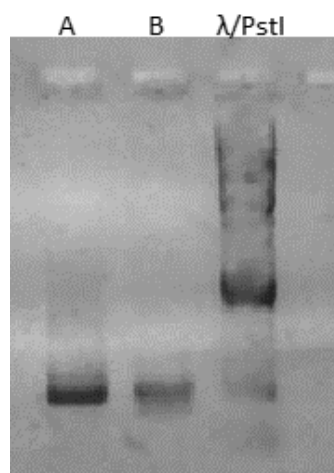
214 pmDc7 TTTTGCCCAACATCGACTGGTATCCAAATTCAGGGGTGGGCAACGGAACATACGCGGAGGATTCCTCGAATAAAAAATG 371
214 cromos2 TTTTGCCCAACATCGACTGGTATCCAAATTCAGGGGTGGGCAACGGAACATACGCGGAGGATTCCTCGAATAAAAAATG 400

214 pmDc7 TGGCTTATTGTAGTTTATTACAAGATAAAGTGCAGCATATCGGAATCACTAGTGAATTCGGGCCGCACTCGAGATATC 451
214 cromos2 TGGCTTATTGTAGTTTATTACAAGATAAAGTGCAGCATATCGG----- 444

```

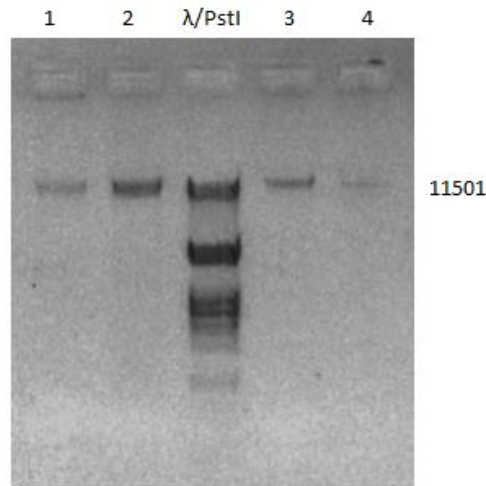
**Figura 23: Alineamiento de la secuencia perteneciente al *Pp214* (Phytozome 12.0) con la obtenida a partir de la secuenciación del plásmido seleccionado.** Se enviaron a secuenciar 5 µL del vector pMDC7:*Pp214* a una concentración de 61,8 ng/µL.

Para corroborar la correcta inserción se realizó una amplificación utilizando una combinación de oligonucleótidos que lo permitiese. Se utilizaron unos de secuencia complementaria al promotor y complementaria reversa al terminador encontrados en el plásmido (Figura 24).



**Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% con productos de amplificación por PCR para corroborar el sentido de inserción del inserto en el vector pMDC7.** A: Combinación de oligonucleótidos LexA/214rv, B: combinación de oligonucleótidos 214fw/Rubisco, λ/PstI: marcador de peso molecular utilizado. Tinción con BrEt.

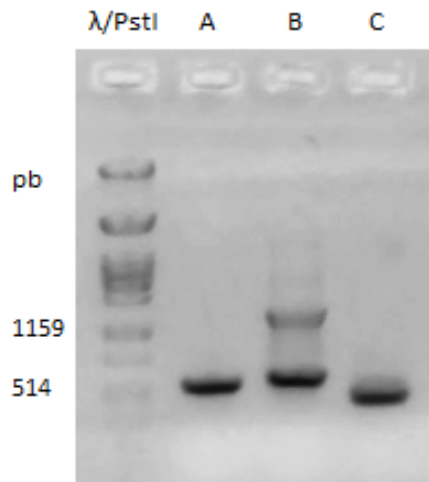
Comprobada la correcta inserción e identidad de la secuencia de *Pp214* en pMDC7, se procedió a transformar *A. tumefaciens*. Se utilizó una cepa quimiocompetente generada en el laboratorio, resistente a los antibióticos Sp y Rif (50 µg/mL). Luego de dos días de crecimiento en medio con selección se seleccionaron colonias y se hicieron los repiques correspondientes. Luego se realizó un cultivo líquido de dos días de crecimiento en agitación a 28°C y se extrajo el ADN plasmídico de éstas (Figura 25).



**Figura 25:** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% teñido con BrEt donde se cargaron muestras de ADN plasmídico de diferentes colonias en estudio (1, 2, 3 y 4) junto al marcador de peso molecular. El tamaño coincide con el esperado. A partir de la intensidad observada se hizo el cálculo de concentración del ADN extraído.

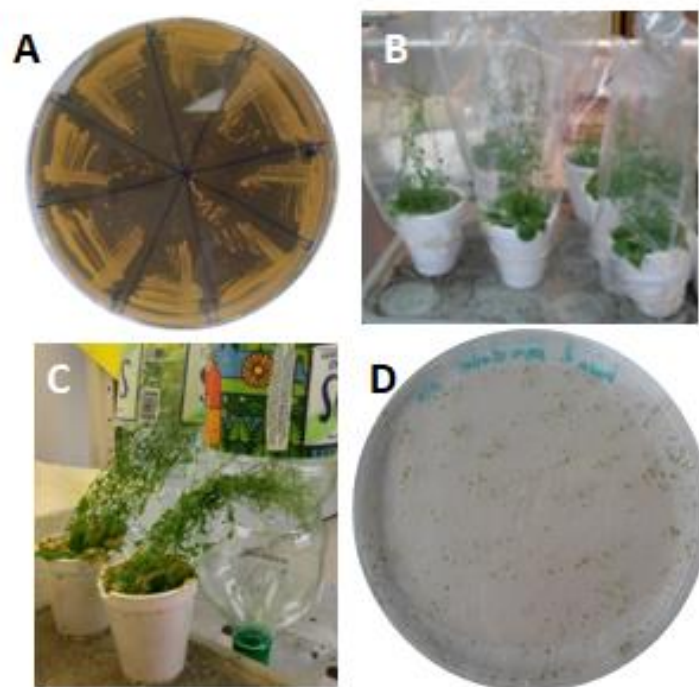
Se seleccionó el plásmido 2 y se procedió a hacer el PCR utilizando oligonucleótidos del vector y de *Pp214* utilizando los cebadores LexA/214rv (A), 214fw/rubisco (B) y 214fw/214rv (C). Los tamaños obtenidos corresponden en todos los casos a los esperados (Figura 26). En todos los casos se obtuvo un fragmento de 500 pares de bases aproximadamente. Al amplificar con 214fw/rubisco, se obtuvo además un fragmento de aproximadamente el doble de tamaño. La obtención de este fragmento puede deberse a una amplificación inespecífica dado que se utilizó una  $T_m$  de 56°C y el cebador para rubisco tiene una  $T_m$  más alta (60,5°C).





**Figura 26: Corroboración de la correcta orientación de inserción del gen *Pp214* en el plásmido pMDC7.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con BrEt que posee el producto de amplificación del gen *Pp214* a partir de una minipreparación de plásmido con cebadores dentro y fuera del gen. A, B y C: se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos LexA/214rv, 214fw/Rubisco y 214fw/214rv, respectivamente.

Habiendo comprobado la presencia del pMDC7:*Pp214* en las cepas de *A. tumefaciens*, se escogió una y se procedió a transformar plantas de *A. thaliana* en floración por el método de inmersión floral (Figura 27).



**Figura 27: Transformación de plantas de *A. thaliana*.** **A.** Aislamiento de colonias de *A. tumefaciens* que han aceptado la construcción de interés. **B.** Dispositivos montados luego de la transformación. **C.** Sistema de recolección utilizado para coleccionar todas las semillas generadas. **D.** Placa de Petri en la que se crecieron semillas obtenidas luego de la segunda transformación en medio R suplementado con higromicina (25µg/mL). Se observa luego de cuatro semanas la muerte de todas ellas.

Se realizaron tres nuevas inoculaciones sobre los nuevos pimpollos cada dos días y se esperó a que se formaran y desarrollaran las silicuas para juntar las semillas. Éstas fueron esterilizadas y crecidas en un medio suplementado con higromicina 25 µg/mL para las plantas transformadas. Se plaquearon un número alto de semillas en cuatro placas de Petri con higromicina (25 µg/mL). Al cabo de tres semanas no se lograron detectar plantas transformadas, siendo todas ellas sensibles al antibiótico (Figura 27D).

Dada la falta de éxito en las transformaciones con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* y que no se lograban obtener transformantes con otras construcciones utilizadas por otro integrante del laboratorio, se transformó otra cepa de *A. tumefaciens* C58C1 con las cuales se habían obtenido transformantes en años anteriores. Se hizo una nueva transformación y se plaquearon 4 placas grandes con semillas estériles, las cuales tampoco dieron transformantes. Se cree que la primera cepa de *A. tumefaciens* ha perdido la capacidad de transferencia de los genes en estudio y en el caso de la segunda no tenemos posibles explicaciones. Como alternativa se va a volver a transformar la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* pedida a un laboratorio colaborador.

## 5. CONCLUSIONES

Las plantas que han incorporado y expresan el gen *Pp214* bajo el control del promotor constitutivo ubiquitina son más resistentes frente al ataque por el patógeno *P. irregulare* y presentan menor daño frente al CF de la bacteria fitopatógena *P.c. carotovorum* en comparación con plantas salvajes.

La línea transformante 1 y 4 son las que presentan mayores niveles de expresión de *Pp214* y son las líneas que muestran mayor resistencia frente a *P. irregulare*. En el caso del tratamiento con el CF de *P.c. carotovorum* todas las líneas que sobreexpresan *Pp214* presentan menos daño del tejido que las plantas salvajes. El gen *Pp214* podría por lo tanto generar una ventaja adicional para la defensa vegetal de *A. thaliana* frente a patógenos, aunque se deben realizar más estudios para entender el mecanismos de acción.

Se obtuvo la construcción para generar plantas de *A. thaliana* que expresen *Pp214* bajo el control de un promotor inducible por  $\beta$ -estradiol. Si bien no se lograron obtener transformantes, se van a volver a repetir las transformaciones con otra cepa de *A. tumefaciens*.

## 6. PERSPECTIVAS

Será interesante poder analizar la susceptibilidad de plantas que sobreexpresan *Pp214* y plantas salvajes infectadas con otros fitopatógenos. Contamos en el laboratorio con otros patógenos que infectan *A. thaliana*, incluyendo *B. cinerea* y *Pseudomonas syringae*.

Se seguirá trabajando para obtener zoosporas e infectar con ellas las diferentes plantas. Este sería un método más natural y más reproducible que nos permitiría aproximarnos mejor a las respuestas que desencadenan las plantas frente a la infección.

Se podrá analizar si *Pp214* induce la muerte celular en las plantas transformadas. Dado que puede haber muerte celular de un número reducido de células, se podrán realizar tinciones para evidenciarlo, incluyendo tinciones con azul de tripano. También se podrá expresar *Pp214* en vectores de expresión y determinar si *Pp214* induce la muerte celular de protoplastos.

Se podrá generar una construcción con *Pp214* fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP) para analizar la localización subcelular mediante expresión transitoria en hojas de tabaco. La localización nos podrá dar alguna idea de la posible función. Es interesante que una posible localización obtenida por programas bioinformáticos sea la mitocondria, la cual es un organelo con funciones en la PCD.

Se volverá a transformar plantas de *A. thaliana* con *A. tumefaciens* conteniendo a construcción para sobreexpresar *Pp214* bajo el control del promotor inducible por  $\beta$ -estradiol.

También se realizará una cuantificación relativa de la cantidad de biomasa del patógeno en tejidos infectados los diferentes genotipos en comparación con plantas salvajes mediante PCR en tiempo real (qPCR).

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Adie B.A, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez M.M, Godoy M, Sánchez-Serrano J.J, Schmelz E.A, Solano R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19:1665-81.

**Agrios GN.** (2007). Fitopatología. Editorial Limusa, México, Pág 303-309.

**Alvarez A, Montesano M, Schmelz E, Ponce de León I.** (2016). Activation of shikimate, phenylpropanoid, oxilipins and auxin pathways in *Pectobacterium carotovorum* elicitors-treated moss. *Front. Plant Sci*, 7:328.

**Asselbergh B, Curvers K, Franc S.C, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Höfte M.** (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an Abscisic Acid-Deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol.*,144,1863-1877.

**Badel J.L, Charkowski A.O, Deng W.L, Collmer A.** (2002). A gene in the *Pseudomonas syringae*pv. tomato Hrp pathogenicity island conserved effector locus, hopPtoA1, contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *Mol. Plant Microbe Interact*, 15,1014-1024.

**Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V.** (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci*. 5:228.

**Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S.A, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T.M, Terryn N, Gielen J, Villarroel R, De Clerck R, Van Montagu M, Lecharny A, Auborg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian K.D, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Düsterhöft A, Moores T, Jones J.D, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes H.W, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N.** (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391:485-488.

**Brooks D.M, Bender C.L, Kunkel B.N.** (2005).The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol*, 6,629-640.

**Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M.** (1998). Substrate specificities of tobacco chitinases.*Plant J.*, 14, 225-234.

**Campion C, Massiot P, Rouxel F.** (1997). Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *Eur. J. Plant Pathol*, 103,725-735.

**Carver T.L.W, Ingerson-Morris S.M., Thomas B.J, Gay A.P.** (1994). Light-mediated delay of primary haustorium formation by *Erysiphe graminis f.sp avenae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45,59-79.

**Castro A, Vidal S, Ponce de León I** (2016). Moss Pathogenesis-Related-10 Protein Enhances Resistance to *Pythium irregulare* in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 7:580

**Chinchilla D, Bauer Z, Renegass M, Boller T, Felix G.** (2006). The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *Plant Cell*, 18, 465-476.

**Choi H.C, Klessig D.F.** (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate Immunity. *BMC Plant Biology*, 16:232.

**Clough S.J, Bent A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16,735-743.

**Collier S.M, Moffett P.** (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci*, 14:521-529.

**Cove D.J, Knight C.D, Lamparter T.** (1997). Mosses as model systems. *Trends Plant Sci.* 2,99-105.

**Curtis M.D, Grossniklaus U.** (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol.*, 133:462-469.

**Davis K.R, Lyon G.D, Darvill A.G, Albersheim P.** (1984). Host-Pathogen Interactions: XXV. Endopolygalacturonic Acid Lyase from *Erwinia carotovora* Elicits Phytoalexin Accumulation by Releasing Plant Cell Wall Fragments. *Plant Physiol.*, 74:52-60.

**DebRoy S, Thilmony R, Kwack Y-B, Nomura K, He SY.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101,9927-9932.

**Desfeux C, Clough S.J, Bent A.F.** (2000). Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the Arabidopsis Floral-Dip Method. *Plant Physiol.*, 123,895-904.

**Domingo D, Lopez-Brea M.** (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap*, 16:385-393.

**Durrant, W.E, Dong X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*, 42, 185-209.

**Earley K.W, Haag J.R, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard C.S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.*, 45,616-629.

**Ferrari S, Sella L, Janni M, Favaron F, D'Ovidio R.** (2012). Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biol.* 14:31-38.

**Frank S.A.** (1992). Models of plant-pathogen coevolution. *Trends in Genetics*, 8:213-219.

**Greenberg J.T, Yao N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6:201-211.

**Griebel T, Zeier J.** (2008). Light Regulation and Daytime Dependency of Inducible Plant Defenses in *Arabidopsis*: Phytochrome Signaling Controls Systemic Acquired Resistance Rather Than Local Defense. *Plant Physiol.*, 147:790-801.

**Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43,205-227.

**Hood R.D, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl M.A, Trinidad R.R, Silverman J.M, Ohlson B.B, Hicks K.G, Plemel R.L, Li M, Schwarz S, Wang W.Y, Merz A.J, Goodlett D.R, Mougous J.D.** (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe*, 7:25-37.

**Jones J.D.G, Dangl J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature*, 444,323-329.

**Katagiri F, Tsuda K.** (2010). Understanding the plant immune system. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 23:1531-36.

**Karimi M, Inze D, Depicker A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7:193-195.

**Koskiniemi S, Lamoureux J.G, Nikolakakis K.C, t'Kint de Roodenbeke C, Kaplan M, Low D.A, Hayes C.S.** (2013). Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:7032-7037.

**Koskiniemi S, Garza-Sánchez F, Sandegren L, Webb J.S, Braaten B.A, Poole S.J, Andersson D.I, Hayes C.S, Low D.A.** (2014). Selection of Orphan Rhs Toxin Expression in Evolved *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *PLoS Genet*, 10: e1004255.

**Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 16, 3496-3507.

**Lauter F.R, Yanofsky C.** (1993). Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci*, 90:8249-53.

**Lee J, Klessig D.F, Nurnberger T.** (2001). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*,13: 1079-1093.

**Lionetti V, Cervone F, Bellincampi D.** (2012). Methyl esterification of pectin plays a role during plant–pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J. Plant Physiol.* 169:1623-1630.

**Liu Y, Merrow M, Loros J.J, Dunlap J.C.** (1998). How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*, 281:825-9.

**Machado L, Castro A, Hamberg M, Bannenberg G, Gaggero C, Castresana C, Ponce de León, I.** (2015). The *Physcomitrella patens* unique alpha-dioxygenase participates in both developmental processes and defense responses. *BMC Plant Biol*, 15:45.

**Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S.** (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23:1639-53.

**Martinez-trujillo M, Limones-briones V, Cabrera-ponce J.L, Herrera-estrella L.** (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22:63-70.

**Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He S.** (2006), The innate immune function of plant stomata against bacterial invasion. *Cell*, 126,969-980.

**Murashige T, Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

**Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:1-6.

**Nomura K, Mecey C, Lee YN, Imboden LA, Chang JH, He SY.** (2011). Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108:10774-79.

**O'Brien T.P, Feder N, McCully M.E.** (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59:368.

**Oliver J.P, Castro A, Gaggero C, Cascón T, Schmelz E.A, Castresana C, Ponce de León I.** (2009). *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta*, 230:569-79.



**Overdijk E.J, Keijzer J, Groot D, Schoina C, Bouwmeester K, Ketelaar T, Govers F.** (2016). Interaction between the moss *Physcomitrella patens* and *Phytophthora*: a novel pathosystem for live-cell imaging of subcellular defence. *J Microsc*, 263:171-80.

**Palva T.K, Holmström K.O, Heino P, Palva E.T.** (1993). Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Mol.Plant-Microbe Interact*, 6:190-196.

**Pérombelon M.C.M, Kelman A.** (1980). Ecology of the soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol*, 12:361-387.

**Ponce de León I, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Bentancor M, Vidal S.** (2007). *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol*, 7:52.

**Ponce de León I.** (2011). The moss *Physcomitrella patens* as a model system to study interactions between plants and phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Pathogens*, 2011:719873.

**Ponce De León I, Schmelz E.A, Gaggero C, Castro A, Álvarez A, Montesano M.** (2012). *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Mol. Plant Pathol*, 13:960-974.

**Ponce de León I, Montesano M.** (2013). Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. *Int. J. Mol.*, 14:3178-200.

**Ponce de León I, Montesano M.** (2017). Adaptation mechanisms in the evolution of moss defenses to microbes. *Front Plant Sci*, 8:366.

**Pukatzki S, Ma A.T, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson W.C, Mekalanos J.J** (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:1528-1533.

**Pukatzki S, Ma A.T, Revel A.T, Sturtevant D, Mekalanos J.J.** (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104:15508-15513.

**Pukatzki S, McAuley S.B, Miyata S.T.** (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol*, 12:11-7.

**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 soft-rot pathogen *Erwinia carotovora*: partial characterization of the *hrp* gene cluster. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14:962-968.

**Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, 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 WB, Barker E, Bennetzen JL,**

**Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL** (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, 319:64-69.

**Russell A.B, Hood R.D, Bui N. K., Leroux M., Vollmer W., Mougous J. D.** (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*. 475,343-347.

**Schaefer D.G.** (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr. Opin. Plant Biol*, 4, 143-150.

**Stassen J.H, Van den Ackerveken G.** (2011). How do oomycete effectors interfere with plant life? *Curr Opin Plant Biol*, 4:407-14.

**Suarez G, Sierra J.C, Erova T.E, Sha J, Horneman A.J, Chopra A.K.** (2010). A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J. Bacteriol*, 192:155-168.

**The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815.

**Thomma B.P.H.J, Nürnberger T, Joosten M.H.A.J.** (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell*, 23:4-15.

**Toth I.K, Birch P.R.** (2005). Rotting softly and stealthily. *Curr. Opin. Plant Biol*, 8:424-429.

**Yue J, Hu X, Sun H, Yang Y, Huang J.** (2012). Widespread impact of horizontal gene transfer on plant colonization of land. *Nat. Commun.*, 3:1152.

**Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J.** (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.*, 101:15811-15816.