



Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biología Celular y Molecular

“ESTUDIO DE UN GEN DE FUNCIÓN DESCONOCIDA
DE *PHYSCOMITRIUM PATENS* Y EVALUACIÓN DE SU
PARTICIPACIÓN EN LA DEFENSA VEGETAL FRENTE A
PATÓGENOS”

Lic. Lucía Vignale Alcarraz

Orientadora: Dra. Inés Ponce de León

Departamento de Biología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal de tesis

Presidente: Dr. Omar Borsani

Vocales: Dras. Cecilia Ruibal y Mariana Sotelo

SETIEMBRE DE 2020

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Inés por permitirme llevar a cabo mis dos tesis bajo su tutela. Has recibido un millón de dudas y respondido siempre con paciencia y una sonrisa.

Quiero agradecer también a Guille que me enseñó y acompañó con mucha tranquilidad durante estos años. Soy consciente del trabajo que esto le llevó así que muchas gracias.

A Astrid por todos los consejos prácticos que me dio cada vez que me trancaba en los ensayos y por la compañía moral que significó. Junto con Guille e Inés se bancaron todas mis dudas y preguntas. Se los agradezco.

A los demás compañeros del “box joven” por todos los mates, cafés y galletas compartidos durante estos años. Lastimosamente nos agarró el covid al final de esta etapa por lo que espero no perdamos el contacto luego de estos tiempos extraños.

A las demás personas que trabajan dentro y por fuera del laboratorio de biología molecular que supieron prestarme materiales, equipos, explicarme técnicas, o que simplemente distrajeron mi mente del trabajo cuando lo necesitaba.

A mi familia, por el apoyo moral que me han dado. Por todas las horas de estudio y posterior repasos que supieron escuchar. Siempre creyeron en mi e hicieron un gran esfuerzo para que llegara hasta acá.

A Joe, my love, gracias por escucharme, aguantarme y darme ánimos cuando llego frustrada a casa. No elegiría otra forma de pasar mis días.

A mis amigos de la fcien, quienes tienen las mismas dudas e incertidumbres que yo y me ayudan a verle el lado positivo y negativo a esta carrera que elegimos. Para todos fue una elección hecha con el corazón que el tiempo nos dirá si fue la correcta.

A mis amigos por fuera del mundo académico, que a causa del covid están empezando a entender de que se trata mi trabajo y que nunca dudaron que fuese para mi. Gracias por las distracciones y apoyo a esta personita loca.

A mis abuelas, que nos apoyan en el estudio e hicieron olvidar de las muchas frustraciones que derivaron de esta tesis.

A todas las personas que me han acompañado desde los Clubes de Ciencias. Sin lugar a dudas sembraron la semillita de la curiosidad en mis primeros años del liceo y esta ha ido creciendo a través de los años. Guille, Gus, Adriana, Vir, Giancarlo, a todas muchas gracias.

A Carmen, Ana, Tomás, Bran y Giovanni que me recibieron en el CNB y ayudaron en todo lo que pudieron. Con ustedes vi una forma diferente de hacer ciencia y me ayudaron a re-amiarme con las pequeñas Arabidopsis.

A todos ustedes muchas gracias.

Índice

1	Abreviaciones.....	6
2	Resumen	10
3	Introducción.....	11
3.1	Interacción planta-patógeno.....	12
3.2	PTI	14
3.3	ETI	16
3.4	PTI y ETI.....	18
3.5	Resistencia sistémica adquirida (SAR) e Inducida (SIR)	18
3.6	Vías de señalización y hormonas vegetales.....	19
3.7	<i>Physcomitrium patens</i>	21
3.7.1	Ciclo de vida	22
3.8	Antecedentes del grupo de investigación en la identificación y caracterización del gen <i>214</i> de <i>Physcomitrium patens</i> (<i>Pp214</i>)	27
4	Hipótesis	29
5	Objetivos.....	29
5.1	General.....	29
5.2	Específicos.....	29
6	Materiales y Métodos	30
6.1	Material vegetal y condiciones de cultivo	30
6.1.1	<i>Physcomitrium patens</i>	30
6.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	30
6.1.3	<i>Nicotiana benthamiana</i>	30
6.2	Cepas y cultivo de microorganismos	30
6.2.1	<i>Escherichia coli</i>	30
6.2.2	<i>Pythium irregulare</i> y <i>Pythium debaryanum</i>	31
6.2.3	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	31
6.2.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
6.2.5	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	32
6.3	Vectores	32
6.3.1	pDONR223.....	32
6.3.2	pUB-Dest	32
6.3.3	pTHUbi	32
6.3.4	pMDC83	33
6.4	Preparación y análisis de ácidos nucleicos	33
6.4.1	Extracción de ADN plasmídico.....	33

6.4.2	Extracción de ARN a partir de tejido vegetal	33
6.4.3	Electroforesis en gel de agarosa.....	33
6.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
6.5.1	Oligonucleótidos	33
6.5.2	Amplificación para el clonado de la secuencia codificante de <i>Pp214</i>	34
6.5.3	Retrotranscripción.....	34
6.5.4	Amplificación por RT-qPCR.....	34
6.6	Modificaciones en el ADN	35
6.6.1	Recombinación con BP Clonasa II.....	35
6.6.2	Recombinación con LR Clonasa II	35
6.6.3	Corte con enzimas de restricción	35
6.7	Construcción de vectores.....	35
6.7.1	Construcción para la transformación de <i>Physcomitrium patens</i>	35
6.7.2	Construcción para la transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
6.7.3	Construcción para la transformación de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	35
6.8	Transformación de plantas.....	36
6.8.1	Procesamiento del fragmento de ADN a utilizar en la transformación	36
6.8.2	Generación de protoplastos de <i>Physcomitrium patens</i>	36
6.8.3	Transformación estable de <i>Physcomitrium patens</i>	36
6.8.4	Selección de líneas transformantes de <i>Physcomitrium patens</i>	37
6.8.5	Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
6.9	Análisis de las líneas de <i>Physcomitrium patens</i> que sobre-expresan <i>Pp214</i>	37
6.9.1	Análisis de la ploidía relativa por citometría de flujo en plantas transformantes de <i>P. patens</i>	37
6.9.2	Análisis morfológico de tejido en diferentes estados de desarrollo.....	37
6.10	Inoculación con patógenos y tratamientos generadores de estrés abiótico en plantas transformantes de <i>Physcomitrium patens</i>	38
6.10.1	Estrés biótico.....	38
6.10.2	Estrés abiótico	38
6.11	Inoculación con microorganismos patógenos en plantas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
6.11.1	Tratamiento con <i>Pst DC3000</i>	38
6.11.2	Esporas de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	38
6.12	Evaluación de las líneas sobre-expresantes de <i>Physcomitrium patens</i>	39
6.12.1	Cuantificación de daño con el colorante Azul de Evans	39
6.12.2	Tinción para visualizar el hongo <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	39

6.12.3	Visualización de cambios a nivel de pared celular.....	39
6.12.4	Evaluación de la respuesta generada frente a estrés osmótico y salino.	39
6.13	Evaluación de las líneas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
6.13.1	Recuento de colonias de <i>Pst DC3000</i>	40
6.13.2	Cuantificación del área foliar dañada por <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	40
6.14	Análisis de la localización subcelular de Pp214	40
6.14.1	Microscopía confocal	40
6.14.2	Extracción de proteínas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y análisis por Western blot	40
6.15	Análisis informático.....	41
6.15.1	Expresión espacio-temporal.....	41
6.15.2	Elementos regulatorios en cis	41
6.15.3	Estudio evolutivo de la presencia del gen <i>Pp214</i> en genomas secuenciados de otros musgos	41
6.16	Análisis estadístico	41
7	Resultados.....	42
7.1	Características del gen <i>Pp214</i> de <i>P. patens</i>	42
7.2	Búsqueda de <i>Pp214</i> en genomas de otros musgos	42
7.3	Patrón de expresión de <i>Pp214</i>	44
7.4	Elementos regulatorios en cis presentes en el promotor de <i>Pp214</i>	46
7.5	Análisis de la localización subcelular de Pp214	48
7.6	Generación de líneas de <i>Physcomitrium patens</i> que sobre-expresan <i>Pp214</i>	51
7.6.1	Caracterización de las líneas sobre-expresantes de <i>Physcomitrium patens</i>	53
7.7	Niveles de expresión de <i>Pp214</i> en líneas sobre-expresantes de <i>P. patens</i> comparado con el genotipo salvaje.....	56
7.8	Respuestas de las líneas de <i>P. patens</i> que sobre-expresan <i>Pp214</i> y plantas salvajes frente a diferentes patógenos.....	58
7.9	Comportamiento de las líneas Pp214 sobre-expresantes y salvajes frente a estrés abiótico en <i>P. patens</i>	62
7.10	Respuestas de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobre-expresan <i>Pp214</i> y plantas salvajes frente a diferentes patógenos	63
8	Discusión.....	67
8.1	Expresión de <i>Pp214</i> en diferentes tejidos de <i>Physcomitrium patens</i> y durante estrés biótico y abiótico	67
8.2	Elementos regulatorios en cis presentes en el promotor de <i>Pp214</i>	69
8.3	<i>Pp214</i> es un gen huérfano presente solo en <i>Physcomitrium patens</i>	70
8.4	La proteína Pp214 se localiza en el citosol de las células vegetales	72

8.5	La sobre-expresión de <i>Pp214</i> en <i>Physcomitrium patens</i> no genera alteraciones en la morfología de las colonias	72
8.6	Niveles de expresión de <i>Pp214</i> durante la infección con <i>B. cinerea</i> y en plantas sobre-expresantes.....	73
8.7	Las líneas de <i>Physcomitrium patens</i> con mayores niveles de sobre-expresión de <i>Pp214</i> presentan mayor resistencia que plantas salvajes a especies de <i>Pythium</i>	74
8.8	Las líneas de <i>Physcomitrium patens</i> que sobre-expresan <i>Pp214</i> no son más tolerantes al estrés osmótico y salino.....	76
8.9	Esporas de <i>Plectosphaerella cucumerina</i> son capaces de germinar y producir enfermedad en <i>Physcomitrium patens</i>	76
8.10	Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan constitutivamente <i>Pp214</i> presentan una tendencia a ser más resistentes frente a microorganismos patógenos	77
9	Conclusiones	79
10	Perspectivas	80
11	Figuras suplementarias	81
12	Referencias	83

1 Abreviaciones

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento de respuesta a ABA
ABREB/ABF	Elemento de unión a ABRE
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP2	Factor de transcripción apetala
ARN	Ácido ribonucleico
Avr	Avirulencia
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BAK1	Receptor quinasa relacionado a BRI1
BCDTA	Medio de cultivo
BIK1	Quinasa 1 inducida por <i>Botrytis</i>
Ca ²⁺	Calcio
CC	Motivo “coiled coli”
CCaMK	Quinasa dependientes de Ca ²⁺ /calmodulina
CDPK	Quinasa dependientes de calcio
CH	Chalcona sintasa
Col-0	Ecotipo Columbia-0
COI1	Proteína insensible a coronatina 1
CTR1	Proteína respuesta constitutiva triple 1
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DIR	Proteína defectiva en resistencia inducida
DO	Densidad óptica
DORN1	Receptor que no responde a nucleótidos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF-like	Parecido al factor epidérmico de crecimiento
EIN	Insensible al etileno

ERF	Elemento de respuesta a etileno
ET	Etileno
ETI	Inmunidad desencadenada por efectores
ETR	Receptor de etileno
ETS	Susceptibilidad desencadenada por efectores
FC	Fold change
FLS2	Receptor de la flagelina
GFP	Proteína verde fluorescente
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HindIII	Enzima de restricción tipo II
HR	Respuesta hipersensible
JA	Ácido jasmónico
JAZ	Receptor para jasmonato con dominio ZIM
JIN1	Insensible a jasmonato 1
λ	Lambda
LB	Medio Luria-Bertani
LOX	Lipooxigenasa
LRR	Repetido rico en leucinas
LPS	Lipo polisacárido
LysMs	Motivo de lisinas
MAMP	Patrón molecular asociado a microbio
MAPK	Quinasa activada por mitógeno
MAPKK	MAP quinasa quinasa
MAPKKK	MAP quinasa quinasa quinasa
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MYB	Factor de transcripción
MYC	Factor de transcripción
N ₂	Nitrógeno
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>

NAMP	Patrón molecular asociado nemátodo
NB	Dominio de unión a nucleótido
NLR	Receptor con dominio de unión a nucleótidos y rico en leucinas
nm	Nanómetros
NPR	Proteína no sobre-expresante de genes PR
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
$\text{O}_2^{\circ-}$	Radical superóxido
OH°	Radical hidroxilo
OPDA	Ácido oxofitodienoico
<i>P. carotovorum</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
<i>P. cucumerina</i>	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>
<i>P. debaryanum</i>	<i>Pythium debaryanum</i>
<i>P. irregulare</i>	<i>Pythium irregulare</i>
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrium patens</i>
<i>P. schreberi</i>	<i>Pleurozium schreberi</i>
<i>P. wasabiae</i>	<i>Pectobacterium wasabiae</i>
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PAL	Fenilalanil amino liasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDF	Defensina de plantas
PEP	Péptido elicitor de plantas
PGPR	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal
<i>Pp214</i>	Gen <i>Pp214</i>
PR	Proteína relacionada a la patogénesis
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTI	Inmunidad desencadenada por patógenos
<i>Pst DC3000</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato D3000</i>
PstI	Enzima de restricción tipo II
RLCK	Receptor tipo quinasa citoplasmático
RLK/P	Receptor tipo quinasa/proteína

rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especie reactiva del oxígeno
<i>S. fallax</i>	<i>Sphagnum fallax</i>
<i>S. moellendorffii</i>	<i>Selaginella moellendorffii</i>
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SIR	Resistencia sistémica inducida
Swal	Enzima de restricción
TALE	Efectores activadores de la transcripción
TF	Factor de transcripción
TIR	Domino toll/interleukina
μL	Microlitro
μm	Micromolar
UV	Luz ultravioleta
UTR	Región no traducida
WRKY	Factor de transcripción

2 Resumen

Las plantas están constantemente expuestas a condiciones ambientales que les generan estrés. El estudio de los mecanismos que éstas tienen para sobrellevarlos es importante para la comprensión y correcto manejo de cultivos de interés comercial. Para esto se suelen utilizar plantas modelo que presentan ventajas prácticas que permiten extrapolar resultados dentro del reino vegetal. Una de estas plantas es el musgo *Physcomitrium patens* (*P. patens*), el cual pertenece a las briofitas, las cuales fueron de las primeras plantas en colonizar la tierra. Su posición filogenética en el reino vegetal y el hecho que los musgos fueron de las primeras plantas que colonizaron la tierra, posicionan a *P. patens* como una planta ideal para realizar estudios evolutivos sobre los mecanismos de defensa que adquirieron las plantas. Además, dada su tolerancia a estrés abiótico y su respuesta a patógenos, *P. patens* es una planta interesante para estudiar mecanismos de respuestas al estrés en plantas.

Para este trabajo se identificó y caracterizó un gen de *P. patens* de inducción temprana frente al tratamiento con un filtrado acelular de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* (*P. carotovorum*), al que se le denominó *Pp214*. Este gen de 824 pares de bases codificaría para una proteína de 101 aminoácidos de función desconocida. *Pp214* es un gen huérfano que no está presente en otras plantas. Se observó que la expresión de *Pp214* también se induce con esporas de *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*), luz roja, y hormonas como el ácido abscísico (ABA) y el precursor del ácido jasmónico, el ácido oxofitodienoico (OPDA). Mediante la generación de una proteína de fusión *Pp214:GFP* y su expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* se demostró que *Pp214* se localiza en el citoplasma.

Se generaron plantas que sobre-expresan *Pp214* mediante la transformación de protoplastos de *P. patens* y se seleccionaron tres transformantes para su caracterización fenotípica y genotípica. Los tres clones presentan altos niveles de sobre-expresión de *Pp214* y a nivel fenotípico no evidencian diferencias con plantas salvajes. Los diferentes genotipos fueron sometidos a estrés abiótico, D-manitol y NaCl, no detectándose diferencias entre las plantas que sobre-expresan *Pp214* y plantas salvajes. Sin embargo, las plantas transformadas mostraron una tendencia hacia una mayor resistencia comparado con las plantas control cuando fueron inoculadas con dos especies del oomiceto *Pythium*, *P. debaryanum* y *P. irregulare*. También se analizó la susceptibilidad de plantas de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) que expresan *Pp214* de forma constitutiva y estable frente a tres patógenos de diferente naturaleza, como son el hongo necrótrofo *B. cinerea*, el hongo hemibiótrofo *Plectosphaerella cucumerina* (*P. cucumerina*) y la bacteria biótrofa *Pseudomonas syringae* DC3000. Al igual que en *P. patens*, las líneas de *A. thaliana* que sobre-expresan *Pp214*, presentaron una tendencia a un aumento de resistencia frente a los patógenos mencionados, aunque las diferencias entre las líneas y plantas salvajes fueron menores. Estos resultados sugieren que *Pp214* participa en la defensa de *P. patens* frente a patógenos, y sugiere que genes huérfanos pueden haber estado involucrados en la adaptación frente a patógenos.

3 Introducción

Las plantas están expuestas a todo tipo de condiciones ambientales, dentro de las cuales muchas les son desfavorables y conllevan la generación de estrés. A estos estreses los englobamos dentro de dos categorías según su naturaleza: estreses bióticos y abióticos. Dentro de los primeros encontramos a organismos herbívoros, insectos, nemátodos, hongos, oomycetes, bacterias y virus. Como generadores de estrés abiótico encontramos las altas o bajas temperaturas, la radiación UV, el exceso o falta de agua, golpes, vientos fuertes, presencia de compuestos tóxicos en el sustrato (xenobióticos, metales pesados), agua o aire, salinidad, entre otros. Frente a esta cantidad de factores dañinos y la incapacidad para poder huir de éstos, las plantas han ido desarrollado a lo largo de la evolución diversas estrategias para sobrevivir. A algunos de estos mecanismos los encontramos constitutivamente, otros son inducidos frente a la presencia de algún estrés y son tanto barreras físicas como químicas (Freeman & Beattie, 2008).

La cutícula es la primera barrera física exterior que poseen la mayoría de las plantas. Esta se encuentra cubriendo la superficie de los órganos aéreos y posee varias funciones: limita la pérdida de agua, protege contra la radiación solar, los xenobióticos, y dificulta la entrada de hongos o bacterias al interior de los tejidos. Sus principales componentes son cutina, suberina y ceras, todos ellos formados por ácidos grasos o derivados que pueden polimerizar o asociarse con diversos tipos de cadenas hidrocarbonadas (depósitos de naturaleza lipídica). La composición depende y varía según la especie y el estado de desarrollo en el que se encuentre la planta (Serrano et al., 2014).

Otras estructuras que sirven como barreras físicas son los estomas y tricomas. Ambos son células epidérmicas modificadas que poseen formas, tamaños y abundancias características de cada tejido y especie. Los estomas son estructuras que permiten normalmente el intercambio gaseoso pero que pueden ser utilizados como vías de entrada de ciertos microorganismos patógenos, por lo que la regulación de su apertura es esencial para el correcto mantenimiento de los patógenos en el exterior de las hojas y tallos (Sawinski et al., 2013). Los tricomas por otro lado actúan de manera mecánica y química. Cuando se los encuentra en alta abundancia y largo, pueden impedir la locomoción de insectos, lastimar la boca e intestino de herbívoros (Kariyat et al., 2017), o prevenir la ovoposición de huevos de polillas (Kumar, 2011). Por otro lado, los tricomas glandulares son capaces de producir y acumular sustancias tóxicas que repelen o matan a los organismos que intentan alimentarse del tejido. Además de su rol comprobado en la defensa frente al estrés biótico, se los ha asociado a la protección frente a estreses abióticos como radiación UV, heladas y transpiración excesiva (Bar & Shtein, 2019).

Otro elemento importante en la defensa es la pared celular. Esta es la primera barrera con la que se encuentran los microorganismos patógenos una vez dentro de los tejidos. Además de estar preformada, actúa tanto de manera pasiva como activa. Pasiva dado que limita el acceso de los patógenos al interior celular, y activa dado que está constantemente siendo remodelada y presenta cambios en su composición. Es en los puntos de contacto con

patógenos donde se forman las llamadas papilas, estructuras en donde se refuerza la pared celular y se acumulan compuestos antimicrobianos y otros metabolitos secundarios (Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009). Se sabe que los compuestos fenólicos son elementos esenciales en la pared que contribuyen en el entrecruzamiento de sus componentes para hacerla más rígida y por lo tanto no poder ser degradada por las enzimas liberadas por los patógenos (Underwood, 2012). La rapidez de la formación de estas deposiciones en la pared celular está correlacionada con la resistencia a patógenos fúngicos (Bayles et al., 1990). Esta barrera es tan importante que como mecanismo de virulencia algunos patógenos son capaces de interrumpir la adhesión entre la membrana y pared celular para promover la infección y suprimir de esta manera las defensas asociadas a esta última (Senchou et al., 2004).

Dentro de las barreras químicas con las que deben enfrentarse los patógenos encontramos varios compuestos sintetizados como parte del metabolismo secundario de las plantas como son alcaloides, compuestos fenólicos, fitoalexinas, fitoanticipinas, taninos, terpenos, saponinas y péptidos antimicrobianos, que pueden estar presentes tanto constitutivamente como ser inducidos frente al reconocimiento de daño (Ramawat & Mérillon, 2013).

3.1 Interacción planta-patógeno

Los microorganismos pueden interactuar con las plantas de diferentes maneras. Pueden vivir en comunidades cercanas a las raíces y comunicarse a través de señales difusibles en el suelo, vivir sobre la superficie de tallos y hojas o directamente dentro de éstas en haces vasculares, espacios intercelulares, apoplasto o mismo dentro de las células vegetales. Muchas veces la interacción es sinérgica, aunque puede ser también neutral o antagónica. Se ha estudiado durante años los factores que influyen al establecimiento de una u otra interacción, aunque aún queda mucho por descubrir (Schirawski & Perlin, 2018).

Dentro de los organismos patógenos encontramos diferentes estrategias para penetrar los tejidos. Bacterias patógenas entran ya sea por heridas, estomas o hidátides. Los nematodos o áfidos se alimentan del contenido celular insertando su estilete directamente dentro de una célula. Los hongos y oomycetes en cambio pueden penetrar células epidérmicas o extender sus hifas sobre, entre o a través de las células vegetales (Agrios, 1991). Todos estos patógenos liberan moléculas efectoras (factores de virulencia) dentro de las células vegetales.

Los microorganismos patógenos se pueden separar según la naturaleza de su interacción con el huésped en tres categorías: biótrofos, hemibiótrofos y necrótrofos. Los primeros son aquellos que se alimentan o viven dentro de células vivas del huésped causando enfermedad pero no provocando su muerte. Los hemibiótrofos son aquellos que establecen el mismo tipo de interacción que los biótrofos en las primeras etapas de colonización pero que en determinado momento cambian de estrategia para generar un daño que termina matando al huésped. Muchos de estos patógenos fúngicos u oomycetes son capaces de formar unas estructuras llamadas haustorios, las cuales les permiten penetrar en cierto punto la pared celular de una célula pero no dañar la membrana plasmática, generando una interacción con ésta que les provee nutrientes (Szabo & Bushnell, 2001). Por último, los patógenos

necrótrofos son aquellos que generan daño desde un principio, matando a las células del huésped y alimentándose del contenido celular liberado por tejidos macerados. Esto lo logran secretando enzimas hidrolíticas capaces de degradar los polímeros de la pared celular y produciendo toxinas que finalmente matan a la célula (Laluk & Mengiste, 2010).

A diferencia de los animales, las plantas no poseen células móviles encargadas de la defensa frente a patógenos como parte de su sistema inmune. En cambio cada célula cuenta con su propio arsenal de defensas que es capaz de activar, las cuales son fundamentales para su supervivencia, contando adicionalmente con algunas señales que sí se pueden transmitir a otras células desde el sitio de infección para activar una respuesta generalizada (Dempsey & Klessig, 2012). Las células vegetales responden frente a la infección activando dos capas de respuestas inmunes. La primera reconoce y responde a moléculas comunes a muchos tipos de microorganismos, donde están incluidos algunos no patógenos. La segunda respuesta se activa frente a factores de virulencia de los patógenos o de efectos causados por estos en la planta. En la primera están involucrados receptores transmembrana y citoplasmáticos (“Pattern Recognition Receptors o PRRs”) que son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño, microbios, nemátodos o patógenos (DAMPs, MAMPs, NAMPs y PAMPs) (Boutrot & Zipfel, 2017) y se llama Inmunidad Desencadenada por PAMPs (PTI, “PAMP-triggered immunity”). Esta respuesta provee protección frente a los patógenos no hospederos (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2009). Su amplitud es suficiente para detener la colonización de los tejidos aunque patógenos adaptados han desarrollado mecanismos para evadirla, generando susceptibilidad. Esto se da mediante la liberación por parte de patógenos adaptados de moléculas llamadas efectores que tienen como blanco componentes de la PTI e inhiben la defensas de la planta por lo que se llama comúnmente Susceptibilidad Desencadenada por Efectores (ETS, “Effector Triggered Susceptibility”) (Boller & Felix, 2009; Boller & He, 2009).

En la segunda capa de respuesta los efectores liberados por el patógeno son reconocidos por proteínas intracelulares denominadas proteínas de Resistencia a enfermedades (proteínas R) que detectan directa o indirectamente su presencia (Jones et al., 2016). Estos receptores poseen en su mayoría dominios de unión a nucleótidos y repetidos ricos en leucinas (NB-LRR). Cuando se da el reconocimiento de los efectores del patógeno por los receptores NB-LRR, se desencadena la llamada Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI, “Effector Triggered Immunity”). Esta respuesta es más amplia, específica, rápida y potente que la PTI, que luego de sobrepasar cierto punto puede generar una resistencia sistémica adquirida (SAR) en la planta o desencadenar una reacción hipersensible (HR) (Dodds & Rathjen, 2010; Thomma, Nu, & Joosten, 2011; Tsuda & Katagiri, 2010). La HR es una especie de muerte celular programada que mata las células en el sitio de infección, impidiendo que patógenos de naturaleza biótrofa puedan sobrevivir y colonizar el resto de los tejidos. Es una estrategia muy efectiva frente a biótrofos aunque beneficiosa para microorganismos necrótrofos como *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*), los cuales la estimulan para aumentar la susceptibilidad y colonización de los tejidos vegetales (Govrin & Levine, 2000). Durante la HR se desencadenan procesos como la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN por endonucleasas, destrucción del núcleo celular, globulación de la membrana plasmática, acumulación de ROS,

liberación del citocromo c desde las mitocondrias y activación de un gran número de enzimas hidrolíticas como son las serina y cisteína proteasas (Locato & Gara, 2018).

Incluso frente a todas estas estrategias desarrolladas por las plantas, algunos patógenos logran evadirlas, ya sea cambiando la estructura de las moléculas efectoras para no ser reconocidas, o adquiriendo nuevas que sean capaces de suprimir la ETI. Y el juego sigue ya que la planta puede generar nuevos receptores para estos efectores que le permitan activar la ETI. Estos procesos de co-evolución entre planta y patógeno se describen en la teoría del modelo zig zag propuesto por Jones and Dangl en el 2006 (figura 1).

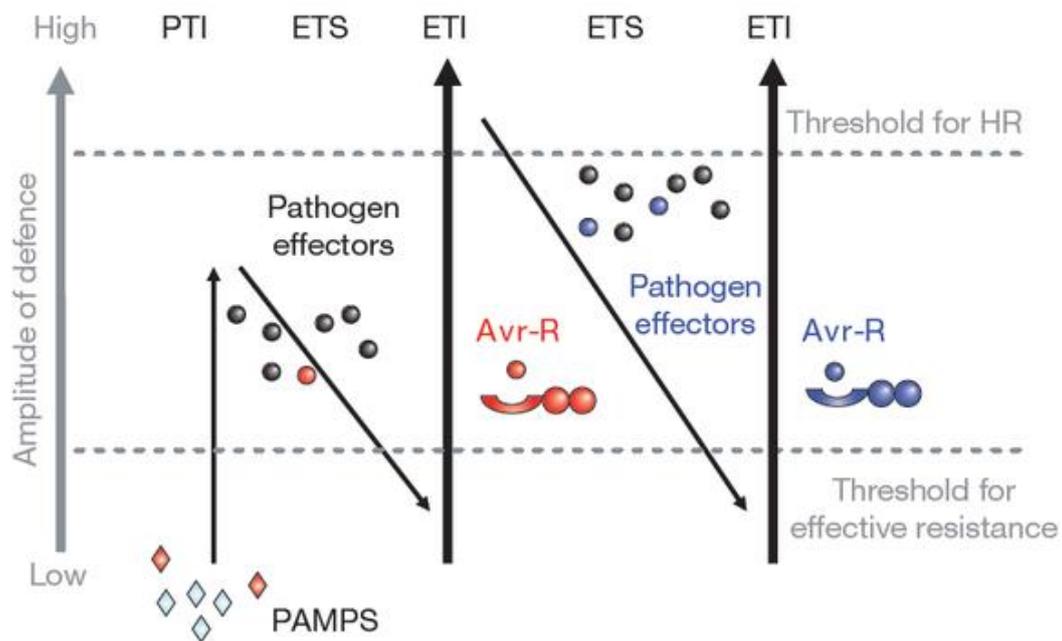


Figura 1: Modelo de inmunidad vegetal propuesto por Jones y Dangl. Diagrama de interacción entre microorganismos patógenos y las plantas huésped. Respuestas generadas en ambos sistemas. PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns), PTI (PAMP Triggered Immunity), ETS (Effector Triggered Susceptibility), ETI (Effector Triggered Immunity), Avr-R (Avirulence R), HR (Hypersensitive Response). La amplitud de respuesta es proporcional a $PTI - ETS + ETI$. (Jones & Dangl, 2006)

3.2 PTI

Este tipo de inmunidad innata basal se activa frente al reconocimiento de patógenos y permite la activación de una compleja variedad de respuestas de defensa activadas simultáneamente con el fin de detener la colonización de los patógenos en los tejidos. Dentro de estas respuestas encontramos la elevación temporal de Ca^{2+} intracelular, el cerrado de estomas (Melotto et al., 2008; Sawinski et al., 2013), la restricción de la transferencia de nutrientes al apoplasto (Wang et al., 2012), la acumulación de ROS y óxido nítrico (NO), la deposición de calosa, la producción de fitohormonas, la reprogramación transcripcional y la síntesis de metabolitos y proteínas de defensa.

Los PRRs de plantas son receptores tipo quinasas (RLKs), receptores tipo proteína (RLPs) o receptores tipo quinasas citoplasmáticas (RLCKs). Los RLKs y RPLs están compuestos por un dominio extracelular, una región transmembrana simple y un tercer dominio, el cual es un dominio quinasa para los RLKs y una región corta sin un dominio de señalización distinguible para los RLPs (Monaghan & Zipfel, 2012). El dominio extracelular es el encargado de detectar los PAMPs y puede constar de motivos LRR, de lisinas (LysMs), o motivos parecidos al factor epidérmico de crecimiento (EGF-like). Los RLCKs son proteínas intracelulares con un dominio quinasa que interactúan con los anteriores para traducir las señales. Las tres clases son capaces de activar una o más vías de señalización y usualmente necesitan co-receptores para ser activados (Bohm et al., 2014). Un ejemplo muy estudiado en *A. thaliana* es el de las quinasas BAK1 (RLK, “BRI1-associated receptor kinase 1”) y BIK1 (RLCK, “*Botrytis*-induced kinase 1”). Estas trabajan en conjunto con múltiples PRRs incluido FLS2 (LRR-RLK), el cual es capaz de reconocer 22 aminoácidos presentes en la flagelina bacteriana. BIK1 se encuentra constitutivamente unido a FLS2 y otras proteínas formando un complejo. Ante el reconocimiento de su ligando éstos forman casi inmediatamente un heterómero con BAK1, el cual fosforila a BIK1 y éste, luego de activarse, fosforila a BAK1 y FLS2 para luego disociarse del complejo y transmitir la señal para activar la PTI (Schulze et al., 2010; Lu et al., 2010).

Un grupo de moléculas reconocidas por los PRRs son los MAMPs y PAMPs. Éstas son estructuras específicas de microbios o patógenos que no están presentes en las células del huésped y están sometidas tanto a una presión selectiva negativa como positiva. Negativa dado que suelen ser indispensables para los microbios y positiva dado que mutaciones claves en las regiones reconocidas por los PRRs pueden hacer que no sean reconocidos por el huésped y por lo tanto que no se activen los mecanismos de defensa para eliminarlo. Algunos ejemplos muy estudiados son el lipopolisacárido bacteriano (LPS), la flagelina, el factor de elongación Ef-Tu, proteínas harpin, ADN microbiano, lipoproteínas, péptidoglicanos, glucanos y mananos derivados de la pared celular de hongos y la quitina, la cual es el componente principal de éstas (Choi & Klessig, 2016).

Otro tipo de moléculas reconocidas por los PRRs son los DAMPs. Estos son compuestos (o partes de éstos) que están tanto en el interior de las células como formando parte de la pared celular pero que son liberadas debido a un cierto daño, provocado por algún estrés biótico o abiótico. Un ejemplo son los fragmentos de componentes de la pared celular o cutícula que son liberados al ser degradados por enzimas hidrolíticas sintetizadas por patógenos (Decreux & Messiaen, 2005). Otro compuesto considerado como DAMP es el ATP extracelular (eATP), el cual es reconocido por su receptor DORN1 (Tanaka et al., 2014) y es capaz de inducir respuestas típicas de la PTI. Entre éstas están incluidos genes involucrados en la síntesis de las hormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) (Tanaka et al., 2014; Jeter et al., 2004; Song et al., 2006). Otros DAMPs son los “plant elicitor peptides” o PEPs (Ma et al., 2012) encontrados en la mayoría de angiospermas secuenciadas (Lori et al., 2015) y la proteína extracelular de alta movilidad del grupo caja 3 (HMGB3), cuya utilización como tratamiento induce un aumento de resistencia a *B. cinerea* (Choi et al., 2016).

Por último encontramos a los NAMPs, los cuales han sido menos estudiados que los anteriores. Uno de los NAMPs conocidos son unos glicósidos que están unidos a una cadena

lipofílica llamados ascarosidos. Se ha observado que tratamientos con estas moléculas aumenta la resistencia posterior a diversos patógenos tanto en plantas mono como dicotiledóneas (Manosalva et al., 2015).

3.3 ETI

Esta segunda capa de protección se desencadena cuando proteínas efectoras del patógeno son liberadas dentro de las células huésped para suprimir la PTI. Estos efectores son muy diversos e incluyen funciones como la inhibición de enzimas líticas liberadas por el huésped, interferencia en el sistema de ubiquitinación de la planta (Bos et al., 2010), en el transporte vesicular, autofagia (Dagdas et al., 2016), supresión de la HR, producción de ROS, producción de fitoalexinas y bloqueo del reconocimiento de la quitina como PAMP (Jonge et al., 2010; Terauchi et al., 2012). Muchos de estos efectores son adquiridos por los patógenos por transferencia horizontal (Sánchez-Vallet et al., 2018). A aquellos conservados dentro de una especie se les llama “efectores core”, los cuales se cree que juegan un papel importante y común para la adaptación a los huéspedes y generación de virulencia (Irieda et al., 2019). Un ejemplo de estos “efectores core” es la proteína secretada inducida por necrosis 1 (NIS1), la cual está altamente conservado en patógenos fúngicos filamentosos como en varias especies de *Colletotrichum* y *Magnaporthe oryzae*. Este efector es capaz de suprimir la HR provocada por un PAMP específico de oomycetes INF1, y la producción de ROS generada por el reconocimiento de flg22 y quitina en *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). Esto es posible dado que sus blancos de acción son el RLK BAK1 y el RLCK BIK1, ambos claves para desencadenar la PTI (Irieda et al., 2019).

Por otro lado, las bacterias fitopatógenas suprimen el sistema inmune innato de las plantas mediante la inyección de proteínas llamadas Efectores tipo III dentro de las células vegetales utilizando su sistema de secreción tipo III (Buttner & He, 2009). Se conocen al menos tres estrategias principales utilizadas para alterar las respuestas del huésped. Éstas incluyen la alteración de la degradación de sus proteínas (protein turnover) por clivado o modulación del sistema de ubiquitinación y direccionamiento hacia el proteasoma 26S, alteración del metabolismo del RNA por activación transcripcional de ADP-ribosilación de proteínas de unión al RNA, e inhibición de las quinasas involucradas en la transmisión de las señales de defensa (Block et al., 2008). Un efector muy estudiado es la coronatina, un compuesto sintetizado por *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst* DC3000) estructuralmente similar a la hormona vegetal JA, la cual inhibe la reducción de la apertura de estomas provocada frente a su reconocimiento (Melotto et al., 2006). Esta cepa también sintetiza otro factor de virulencia de bajo peso molecular llamado siringolina, el cual actúa como potente inhibidor del proteosoma (Bachmann et al., 2008).

Las plantas poseen genes de resistencia que codifican para proteínas que reconocen estos efectores (proteínas R) (Dodds & Rathjen, 2010; Jones & Dangl, 2006). La clase principal de proteínas R son receptores que poseen dominios de unión a nucleótidos (NB) y son ricos en repetidos de leucina (LRR) (NLRs). Estos poseen regiones N-terminales variables, con

dominios coiled coil (CC) o parecidos a toll/interleukina1 (TIR), siendo los primeros encontrados tanto en di como monocotiledóneas y los últimos solo en diocotiledóneas. Interesantemente, la briofita *Physcomitrium patens* (*P. patens*) y la licofita *Selaginella moellendorffii* (*S. moellendorffii*), dos representantes de linajes ancestrales de plantas, tienen un repertorio de NLRs escaso con 25 y 2 NLRs respectivamente. Esto sugiere que la expansión de estos genes ocurrió mayoritariamente en angiospermas, dado que en *A. thaliana* y *Oryza sativa* (arroz) se encontraron 151 y 458 NLRs, respectivamente (Jacob et al., 2013).

La ETI se desencadena cuando los NLRs reconocen las moléculas efectoras directa o indirectamente (Jacob et al., 2013; Yue et al., 2012). El reconocimiento directo constituye la unión física del ligando a su correspondiente NLR. Este suele involucrar múltiples puntos de contacto con la región LRR, la cual aporta especificidad en la unión, siendo asistidos por el dominio TIR en el extremo N- terminal (Krasileva et al., 2010; Ravensdale et al., 2012). Este tipo de reconocimiento requiere una gran cantidad y diversidad de receptores, lo que refleja la presión evolutiva de reconocer aminoácidos particulares en efectores que están en constante cambio (Dodds et al., 2006; Kanzaki et al., 2012). El reconocimiento indirecto ocurre cuando el NLR reconoce la acción de un efector en el hospedero. Para esto se conocen distintas estrategias en las que están implicadas menos proteínas que en el reconocimiento directo. Esto le permite a las plantas seguir reconociendo y generando resistencia ante patógenos que están constantemente generando variabilidad. Una posibilidad de reconocimiento indirecto es la activación del NLR cuando un efector modifica un factor del huésped que está unido a éste o que está monitoreado constantemente. Otra es la “plant decoy strategy”, en la cual el factor del huésped monitoreado no tiene ninguna función conocida en la resistencia pero actúa como carnada para efectores cuyo blanco son componentes estructurales de la defensa basal (Collier & Moffett, 2009; Hoorn & Kamoun, 2008). Otro tipo de genes R ha evolucionado para contrarrestar la acción de efectores que tienen como blanco el DNA de su huésped. Un ejemplo de estos efectores son los TALE (“Transcription activator-like effectors”) de *Xanthomonas* que son liberados en el núcleo de la planta donde se unen específicamente a secuencias de promotores de genes que causan susceptibilidad para activar su expresión e inducir la infección (Boch & Bonas, 2010; Schornack et al., 2013). Algunas plantas han aprovechado estas secuencias para modificar los sitios y reproducirlos en promotores de genes R que al ser inducidos detienen el crecimiento del patógeno generalmente mediante la inducción de la HR (Strauß et al., 2012).

Existe una estrecha relación entre las plantas y los microorganismos, entre los cuales la posibilidad de generar variabilidad genética es crucial para ambos. Entre los mecanismos que utilizan los patógenos para no ser reconocidos por el huésped encontramos mutaciones no sinónimas en epítopes reconocidos por la planta, generación de alelos diversos con deleciones completas o parciales, rearrreglos provocados por elementos transponibles, entre otros, generando gran redundancia (Kanzaki et al., 2012; Seidl & Thomma, 2017). Estas mutaciones pueden ser beneficiosas pero también pueden provocar una disminución en el fitness o virulencia del patógeno. Esta denominada “carrera armamentística” entre plantas y patógenos genera como resultados altos niveles de polimorfismos tanto en el genoma del huésped como en el del patógeno.

3.4 PTI y ETI

Se suele realizar una distinción entre estas dos respuestas aunque existe cierta controversia al respecto. Ambas comparten componentes en las vías de señalización que utilizan, tales como la liberación de Ca^{2+} intracelular o la activación de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Tsuda et al., 2013; Yu, Feng, He, & Shan, 2017). También comparten las respuestas inmunes que desencadenan, tales como la reprogramación transcripcional, generación de ROS y lípidos, la producción de compuestos del metabolismo secundario, metabolitos y proteínas con actividades antimicrobianas y hormonas vegetales (Peng et al., 2018). Se sabe que uno de los mecanismos más utilizados como método de regulación es la fosforilación y desfosforilación de proteínas, indispensables para la correcta ejecución de la respuesta. Se encontraron varias proteínas clave cuya activación se da tanto por PTI como ETI, en las cuales se identificaron diferentes sitios de fosforilación que influyen en la duración de la respuesta. La complejidad y solapamiento de estas respuestas genera una evidencia clara de que están estrechamente relacionadas y actúan como un continuo (Kadota et al., 2019). Sin embargo, existen diferencias entre la estructura y localización subcelular de los receptores que utilizan, la dinámica, duración en el tiempo y fuerza de las respuestas. Mientras que los PRRs, RLKs y PRPs se encuentran anclados a la membrana plasmática con su dominio de reconocimiento hacia el exterior, los NLRs se encuentran en el interior celular y son capaces de unirse directamente al ADN. A su vez, las respuestas generadas por la ETI son varias veces más intensas que las desencadenadas por la PTI.

3.5 Resistencia sistémica adquirida (SAR) e Inducida (ISR)

Las plantas han generado mecanismos para transmitir señales desde los puntos de contacto con patógenos al resto de las células del organismo. Estas señales que se transmiten a largas distancias por los haces vasculares (generalmente por el floema) son muy diversas. Dentro de las encontradas hasta el momento se incluyen al metil-salicilato y JA como hormona o derivado, al ácido acelaico, glicerol-3-fosfato, ácido piperónico, dehidroabietinal, sistemina y la proteína de transferencia de lípidos DIR1 (“DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1”) (Dempsey & Klessig, 2012; Shah et al., 2013). Se cree que la contribución de estos factores en la señalización a distancia es influenciada por las condiciones ambientales, como por ejemplo la exposición a la luz. A esta respuesta sistémica que se genera se la puede dividir en dos: respuesta sistémica adquirida (SAR) y respuesta sistémica inducida (ISR)

En la SAR, la respuesta se da en forma de necrosis localizada, activando la vía de la hormona vegetal SA y mediante la expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRs). Estos tejidos quedan sometidos a una especie de “priming”, provocando respuestas más rápidas y fuertes frente a futuras infecciones (Conrath, 2011). La ISR en cambio es inducida por la colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) (Walters et al., 2013). Esta vía involucra a las hormonas JA, ET, y no está asociada a

necrosis. La respuesta generada frente a esta interacción promueve la resistencia en las hojas frente a patógenos (D. Walters & Heil, 2007). Se sabe que SAR y ISR involucran diferentes mecanismos que las lleva a tener un efecto aditivo en la resistencia a frente a patógenos foliares y que ambos requieren a la proteína reguladora no-expresante de genes PR (NPR1) como componente clave (van Wees et al., 2000).

3.6 Vías de señalización y hormonas vegetales

El sensado de estreses bióticos y abióticos desencadena varios y diversos mecanismos de defensa en plantas. La liberación de Ca^{2+} intracelular es detectada por proteínas de unión a Ca^{2+} que actúan como sensores (Kudla et al., 2010). Estos sensores pueden unirse a elementos en cis en promotores de genes de respuesta o pueden interactuar con proteínas de unión al DNA que controlen a estos genes, generando tanto la activación como represión de éstos. Los niveles elevados de Ca^{2+} citosólicos pueden activar a su vez proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPKs) o de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKs) y fosfatasa que pueden fosforilar o defosforilar factores de transcripción específicos como mecanismo de regulación génica (Reddy et al., 2011).

El Ca^{2+} actúa en conjunto con otros segundos mensajeros como son las ROS. Como mecanismo de señalización se produce un rápido incremento en la producción de estas moléculas al que se le llama estallido oxidativo (Miller et al., 2008). Éstos son principalmente sintetizados en aquellos organelos con mayor actividad metabólica oxidante como son las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas (Mittler et al., 2004). Se le denomina ROS a un conjunto de moléculas como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxilo (OH^\bullet) y radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Gadjev et al., 2006). Cada uno de estos compuestos tiene funciones definidas, dentro de las cuales se encuentra la activación de las MAPKs por el H_2O_2 (Kovtun et al., 1999), inhibición de fosfatasa y la activación de factores de transcripción (TFs) sensibles al estado redox (Miller & Mittler, 2006). Estos a su vez funcionan corriente arriba para activar otros TFs dentro de los que se encuentran algunos de la familia WRKY (Miller et al., 2008).

Otro de los mecanismos de señalización activados tempranamente en eucariotas y que juegan un papel fundamental en la respuesta de defensa vegetal frente a patógenos son las cascadas de MAPKs. Éstas están sumamente conservadas y se activan tanto frente a la detección de MAMPs/PAMPs como de efectores (continuo de respuestas PTI y ETI). La activación de las MAPKs es llevada a cabo por proteínas MAPK quinasas (MAPKKs) luego de que éstas fosforilan residuos de tirosina y treonina en un motivo específico de activación de las MAPKs. Las MAPKKs están reguladas a su vez por las MAPKK quinasas (MAPKKKs), activándose cuando las MAPKKKs fosforilan dos residuos de serina o treonina en un loop de activación. Este conjunto de tres quinasas: MAPKs, MAPKKs y MAPKKKs son de suma importancia para la transducción de señales intracelulares, tanto que se han encontrado familias extendidas en varios genomas de plantas. Solo en *A. thaliana* hay 20, 10 y 60 MAPKs, MAPKKs y MAPKKKs respectivamente. Son las encargadas de la activación de varias respuestas como la biosíntesis y regulación de

hormonas de defensa, generación de ROS, cerrado de estomas, activación de genes de defensa, síntesis de fitoalexinas, reforzamiento de pared e inducción de HR. Frente a tal repertorio de funciones es que los patógenos especializados han generado efectores capaces de suprimir su activación para promover la patogénesis (Meng & Zhang, 2013).

En estos mecanismos complejos de señalización intervienen más de nueve hormonas vegetales. Éstas, además de participar en la defensa vegetal, son las encargadas de controlar otros procesos fisiológicos en las plantas. De esta manera su regulación y homeostasis es crucial para una respuesta estable y coordinada. Las hormonas más importantes producidas por las plantas son las auxinas, giberelinas, brasinoesteroides, citoquininas, ABA, ET, SA y JA. Dentro de éstas son las últimas cuatro a las que se les confiere mayor importancia en la respuesta inmune frente a patógenos y estreses abióticos (Bari & Jones, 2009).

El ABA es una hormona a la que se la relaciona con la respuesta a estrés abiótico dado por condiciones ambientales como sequía, salinidad, frío o calor, y a la regulación en el crecimiento y desarrollo como la germinación de las semillas, maduración de embriones, senescencia de hojas y apertura estomática (Wasilewska et al., 2008). Se ha observado que frente a condiciones de estrés osmótico como son una alta salinidad o sequía, el ABA es la hormona encargada de desencadenar tanto respuestas a corto como largo plazo. Un ejemplo dentro de las primeras es el cerrado de estomas para mantener el balance hídrico dentro de tallos y hojas, y a largo plazo en la regulación de la expresión de genes de defensa. A su vez, se han estudiado en detalle los elementos en cis encontrados dentro de promotores de los genes de respuesta a ABA (ABRE) y de respuesta a la deshidratación (DRE), los cuales poseen secuencias que son reconocidas por familias de TFs conocidas como son ABREBs y ABFs (proteínas y factor de unión a ABRE), MYB, MYC y NAC (Verma et al., 2016). Se ha visto que el ABA cumple también un rol importante en la defensa contra microorganismos patógenos. Tratamientos con esta hormona en *A. thaliana* protegen a las plantas frente a la infección por patógenos como *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*) y *Plectosphaerella cucumerina* (*P. cucumerina*) (Ton & Mauch-Mani, 2004). Se cree que contribuye a la defensa vegetal a través de un “priming” de calosa y regulación de la expresión génica por activación de la síntesis de JA (Adie et al., 2007).

Respecto a la respuesta frente a estreses bióticos, se ha estudiado principalmente el rol que juegan el SA, JA y ET y el “cross-talk” que se genera para desencadenar respuestas coordinadas. Las respuestas inducidas por la vía del SA son críticas para la resistencia contra patógenos bióticos y hemibiótrofos además de desencadenar la SAR (Grant & Lamb, 2006). En los tejidos con altos niveles de SA se induce la expresión de genes PR mediante la deoligomerización de su receptor NPR1 en un dímero activo, el cual interactúa en el núcleo de las células con TFs como TGA y WRKY, los cuales inducen la expresión de los genes de defensa (Eulgem & Somssich, 2007; Wu et al., 2012).

La hormona responsable de activar las defensas contra patógenos necrótrofos y la ISR es el JA, la cual suele actuar en conjunto con ET. Esta hormona cumple también un rol importante en la defensa contra varios herbívoros como son orugas y trips. (Wasternack & Hause, 2013). Hasta el momento se han encontrado varios TFs involucrados en esta vía de señalización como son el TF insensible al jasmonato 1 (JIN1/MYC2) y miembros de la familia apetala 2 y

elemento de respuesta a etileno (AP2/ERF) (Mizoi et al., 2012). El JA debe estar unido al aminoácido isoleucina para encontrarse activo (Fonseca et al., 2009), por lo que en estado de reposo la proteína represora JAZ interactúa con JIN/MYC2 inhibiendo la regulación transcripcional de los genes de respuesta a JA. Cuando se encuentra JA-ile en las células se une a su receptor, la proteína insensible a coronatina 1 (COI1), provocando la degradación de JAZ mediada por el proteasoma 26S. De esta manera MYC2 puede inducir la expresión de los genes de respuesta a JA (Chini et al., 2007).

El ET es una hormona que además de tener un rol a nivel del crecimiento y desarrollo de los organismos vegetales, cumple un papel importante en la defensa vegetal. Al igual que para las hormonas previamente mencionadas, se han descubierto varias proteínas reguladoras, incluyendo los FT que se unen a elementos de respuesta al ET (ERFs), las proteínas EIN (insensibles al etileno) que actúan como reguladores positivos y pueden estar reprimidos por proteínas como CTR1 (respuesta constitutiva triple 1) (Ju et al., 2012). Se conocen a su vez varios receptores para esta hormona gaseosa que actúan en sistemas de dos componentes y están localizados en la membrana del retículo endoplasmático. Las tres familias de receptores más estudiadas son las de los receptores de etileno (ETR), los sensores de respuesta a etileno (ERS) y EINs (Schaller et al., 2008). Se ha descubierto que el ET puede “cross-talk” tanto con las vías del SA como del JA, generando una interacción tanto antagónica como sinérgica entre ellas (Verma et al., 2016). El SA y JA suelen actuar de manera antagónica (Bari & Jones, 2009). Varios estudios han demostrado que NPR1 y WRKY70 son dos factores clave en esta interacción, facilitando la supresión de genes de respuesta a JA como son los de la enzima lipooxigenasa 2 (LOX2) implicada en su síntesis, y la defensina de plantas 1.2 (PDF1.2) con actividad antimicrobiana (Li et al., 2004; Spoel et al., 2003). Aunque se han observado más casos de interacciones antagónicas que sinérgicas entre estas hormonas, se ha visto que ante la presencia de bajos niveles de ambas y mediante la inducción de las dos vías en simultáneo, es posible llegar a respuestas en conjunto (Mur et al., 2006).

3.7 *Physcomitrium patens*

Los musgos son plantas no vasculares que junto con los antoceros y hepáticas fueron de las primeras plantas en colonizar la tierra hace 500 millones de años (Lang et al., 2010). Divergieron de las plantas con flor (angiospermas) hace 480 millones de años, lo que los deja en una posición ideal desde el punto de vista evolutivo. Durante esta transición del agua a la tierra, estas plantas debieron desarrollar adaptaciones o estrategias para hacer frente a las nuevas condiciones y estreses tanto bióticos como abióticos que no existían o eran diferentes en el agua (Frank et al., 2005; Ponce de León & Montesano, 2013; Rensing et al., 2008). Dentro de los primeros encontramos patógenos aéreos y terrestres, insectos y herbívoros. Como factores abióticos de estrés encontramos la exposición directa a la radiación UV, sequía, variaciones bruscas de temperatura, desecación, viento y una concentración de dióxido de carbono y oxígeno diferente. Se ha hecho un gran énfasis en el estudio de estos nuevos mecanismos que debieron desarrollar para superar la transición de un ambiente acuático a uno terrestre (Renault et al., 2017) y en el establecimiento de un crecimiento tridimensional

en plantas (Harrison, 2017). Se han identificado una gran cantidad de genes que permitieron el proceso de terrestreización, y se cree que las interacciones benéficas con hongos y bacterias jugaron un rol fundamental. Estas asociaciones probablemente facilitaron la colonización de nuevos ambientes permitiendo la captura de nutrientes del suelo (Delaux et al., 2015; Strullu-Derrien et al., 2014).

En este proyecto se trabajó con el musgo modelo *Physcomitrium patens* (*P. patens*), antiguamente denominado *Physcomitrella patens* (Rensing et al., 2020). Dentro de las ventajas que presenta su utilización encontramos la alta tasa de recombinación homóloga, similar a la encontrada en levaduras (Schaefer, 2002), y por lo tanto, es muy eficiente su modificación genética facilitando los estudios de genética comparativa (Schaefer & Zryd, 1997). A su vez, la secuenciación y liberación de la primera versión de su genoma por Rensing y colaboradores en el año 2008 contribuyó a que *P. patens* se convirtiera en la primera briofita secuenciada y en un modelo de referencia para plantas sin semillas (Rensing et al., 2008).

El tamaño estimado del genoma de *P. patens* por citometría de flujo es de 511 Mb (Schween et al., 2003). Este presenta secuencias altamente repetidas, donde el 57% del ensamblado está compuesto por elementos transponibles, repeticiones en tándems y segmentos de genes adquiridos desde otros organismos. Se ha llegado al acuerdo de que posee 27 cromosomas monocentroméricos. Se hipotetiza que el cariotipo ancestral era de 7 cromosomas, sugiriendo dos duplicaciones del genoma hace 27-35 y 40-48 millones de años. En la primera se habrían duplicado 7 cromosomas, seguidos de una pérdida de un cromosoma y fusión de otros dos. En la segunda duplicación los 12 cromosomas se transformaron en 24, seguidos de 5 roturas y dos fusiones, llegando al número de cromosomas que se encuentran actualmente (Lang et al., 2018).

En el año 2019 se unificó la información existente que estaba distribuida en tres bases de datos diferentes (eFP Browser, Geneinvestigator, y Phytozome) y se creó el *Physcomitrella* Expression Atlas Tool o PEATmoss. Este es un compendio de 109 experimentos con los dos ecotipos de *P. patens* con los que se comúnmente se trabaja: Gransden y Reute, en 17 tipos de tejidos (Perroud et al. 2018). También cuenta con la ventaja de que se encuentran disponible información genómica y transcriptómica (Fernandez-Pozo et al., 2020).

3.7.1 Ciclo de vida

P. patens posee un ciclo de vida en el cual predomina la fase haploide con alternancia de generaciones ante el desarrollo de un esporofito diploide, hecho que presenta una gran ventaja a la hora de realizar modificaciones en su genoma. Como todos los musgos, *P. patens* no posee tejidos vasculares ni flores, semillas, o raíces, tallos u hojas verdaderas (figura 2)

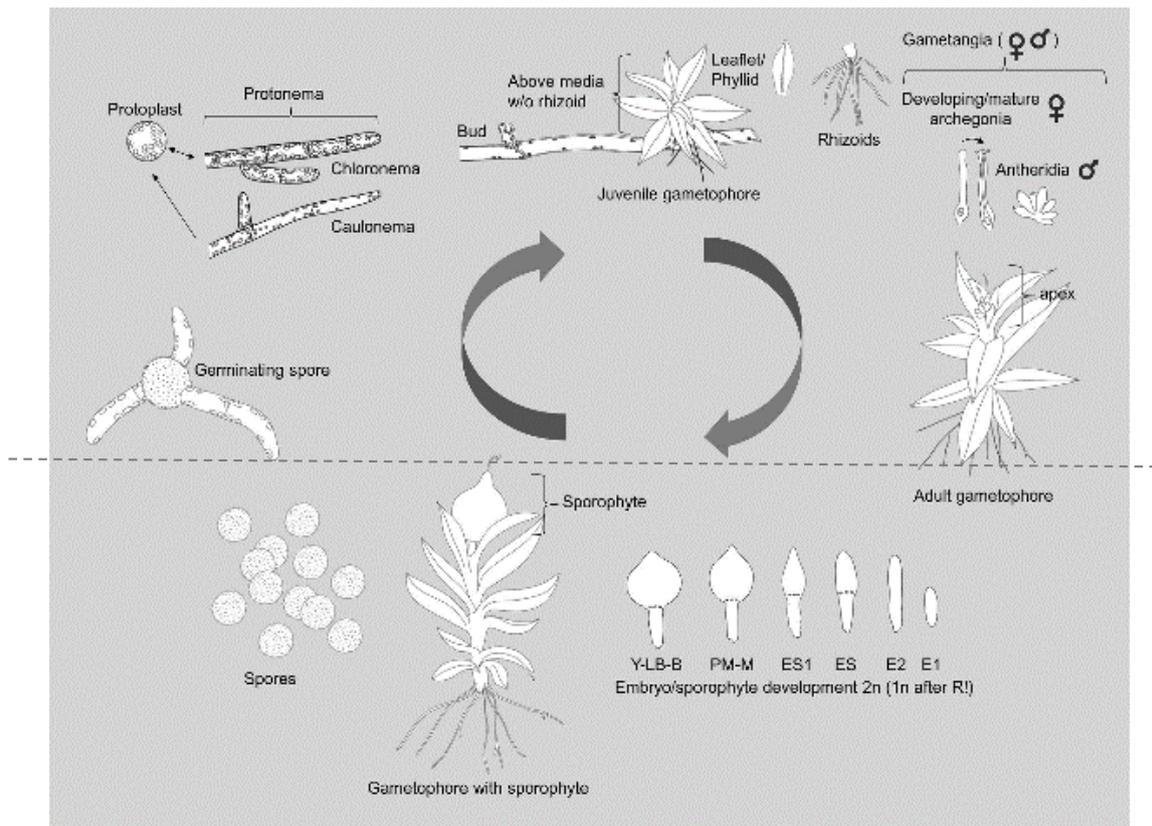


Figura 2: Ciclo de vida de *P. patens*. Esquema de los diferentes estadios del desarrollo del musgo y sus tejidos. Se muestran las diferentes etapas por las que transcurre el crecimiento del tejido, desde la germinación de las esporas, desarrollo de tejidos más simples como caulonema y cloronema (al que en su conjunto se le denomina protonema), generación de gametóforos, del esporofito, maduración de éste y liberación de esporas nuevamente. Imagen tomada de (Fernandez-Pozo et al., 2020).

Las esporas del musgo germinan para producir un tejido denominado protonema. Este tejido está compuesto inicialmente por células del cloronema, las cuales tienen un gran número de cloroplastos. Estas células se expanden por divisiones seriadas de las células apicales y forman ramificaciones en células sub-apicales, generando luego el tejido caulonema. Los filamentos de este tejido contienen menor cantidad de cloroplastos, pero se extienden con una rapidez mayor que el tejido cloronema. Las células sub-apicales de estos filamentos forman los tallos con hojas llamados gametóforos, los cuales al madurar generan los gametos tanto masculinos como femeninos. La auto fertilización es común y los cigotos generados maduran y se convierten en los esporofitos, los cuales permanecen unidos a los gametóforos hasta que se abren y liberan las esporas, comenzando nuevamente el ciclo (Fernandez-Pozo et al., 2020).

Los medios más utilizados para su cultivo *in vitro* son Knop (Reski & Abel, 1985) y BCD (Ashton & Cove, 1977). Este último es un medio sin azúcares u otros compuestos orgánicos, con agregado de nitrato o amonio como fuente de nitrógeno y pH alrededor de 6,5. El crecimiento del tejido se suele realizar sobre un film de celofán para prevenir que el tejido penetre en el medio y sea más sencilla su cosecha (Cove et al., 2009), generalmente creciendo 16 colonias

por placa de Petri. En el laboratorio no se suele trabajar con todos los estadios del desarrollo que se esquematizan en la figura 2 sino con los representados en la parte superior.

La temperatura óptima de crecimiento es entre 24 y 26°C aunque solo comienza a crecer más lentamente bajo los 20°C. No requiere un fotoperiodo específico para el desarrollo normal de tejido aunque la iluminación continua es la que propicia un desarrollo más rápido. Trozos pequeños de tejido pueden regenerarse para producir protonema, procedimiento que se convierte en un método de rutina para el mantenimiento del tejido. Se han descubierto varias condiciones que permiten conservar gran cantidad de clones por un periodo de al menos dos años sin ocupar gran cantidad de espacio. A su vez, la digestión enzimática del tejido protonema joven puede generar grandes cantidades de protoplastos necesarias para aumentar los eventos de transformación, lo que facilita un cuello de botella experimental que presentan muchas otras especies vegetales. Éstos se regeneran en una alta frecuencia (50 a 90%) (D. Cove, 2005). Como método sencillo de transformación genética se suele utilizar la generación de protoplastos y exposición de éstos a una secuencia de interés con ciertas particularidades, aunque las técnicas de modificación genética que se han utilizado van desde mutagénesis química y exposición a radiación UV, la inserción de T-DNAs, biobalística, a la utilización hoy en día de otras técnicas descubiertas más recientemente como CRISPR-Cas9 (D. Cove, 2005; Lopez-Obando et al., 2016)

Dada la simplicidad de condiciones necesarias para su cultivo, es muy sencilla la modificación de variables independientes como pueden ser las condiciones de luz, pH, hidratación y deshidratación, estrés biótico, osmótico, salino o tratamientos con diferentes hormonas (Busch et al., 2013; Hiss et al., 2014). Estas sencillas modificaciones han permitido realizar diversos estudios de tolerancia a estreses abióticos, identificando a *P. patens* como un organismo altamente tolerable a condiciones como deshidratación y altas concentraciones de sales y osmolitos (Frank et al., 2005).

Dentro de los estudios de estrés biótico, se ha observado que las briofitas son colonizadas por patógenos bacterianos, fúngicos, oomycetes y virus, los cuales causan enfermedad evidenciada por necrosis y maceración de sus tejidos (Ponce de León, 2011). A su vez, *P. patens* es capaz de generar respuestas encontradas en angiospermas como son la HR, fortificación de la pared celular por acumulación de compuestos fenólicos y calosa, y la reorientación de los cloroplastos en el sitio de infección de un patógeno. También se ha detectado la acumulación de ROS, cambio en los patrones de expresión de genes relacionados a defensa y niveles de ciertas hormonas vegetales en tejidos de *P. patens* infectados con patógenos como se muestra en la figura 3 (Ponce de León et al., 2007, 2012; Ponce de León & Montesano, 2013).

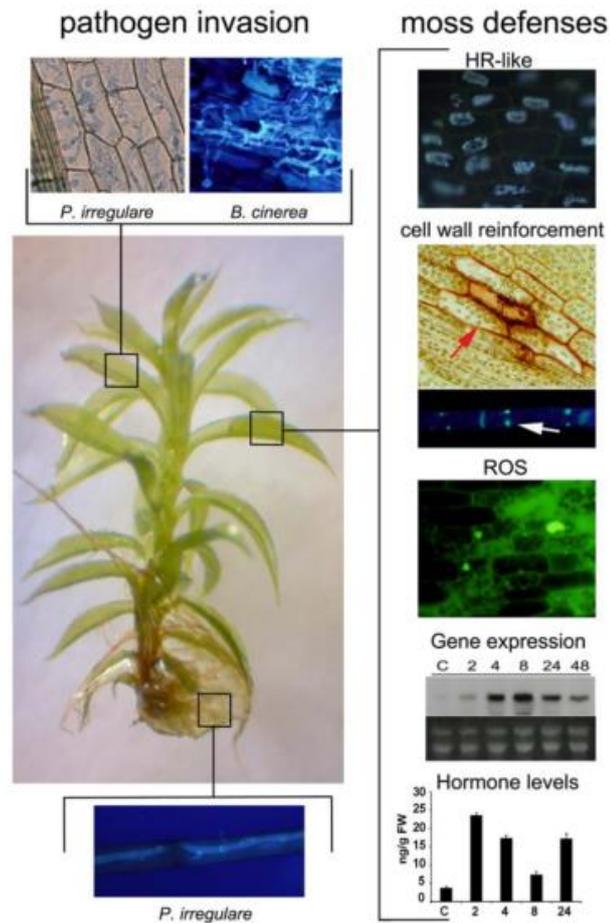


Figura 3: Defensas activadas por *P. patens* frente a la infección por microorganismos patógenos. Colonización de los tejidos de *P. patens* por el hongo *B. cinerea* y el oomycete *P. irregulare*. Activación de mecanismos de defensa como son el reforzamiento de la pared celular, acumulación de ROS, modificación de la expresión génica, niveles de hormonas y generación de una especie de HR. Figura tomada de Ponce de León y Montesano (2017).

Otra de las ventajas que presenta *P. patens* como modelo para el estudio de las interacciones planta-patógeno es que la mayoría de tejidos poseen una sola capa de células, característica estructural que facilita la visualización de las respuestas desencadenadas por éstos mediante microscopía (Ponce de León, 2011).

La síntesis de lignina en los puntos de infección de un patógeno es uno de los mecanismos utilizados para detener su avance en angiospermas. El genoma de *P. patens* contiene ortólogos para casi todas las enzimas necesarias para sintetizar este compuesto, a excepción de la ferulato-5 hidroxilasa (F5H), la cual es la última de la vía (Xu et al., 2009). Es por esta razón que la presencia de lignina es controversial en este musgo, aunque sí se ha demostrado que sustituye su falta con otros compuestos fenólicos capaces de reforzar su pared celular que poseen una estructura similar (Weng & Chapple, 2010). Estudios previos en el laboratorio han demostrado que *P. patens* es capaz de inducir la expresión de genes que codifican para varias proteínas dirigidas (DIR) a las 2 horas post infección con esporas de *B. cinerea*, las cuales son las encargadas de mediar el acoplamiento de monolignoles en la pared vegetal contribuyendo a su reforzamiento (Alvarez et al, 2016; Ponce de León et al., 2012).

Otra de las respuestas generadas en las primeras etapas de infección de un patógeno es la producción exacerbada de ROS. Estas moléculas participan tanto en la fortificación de la pared por la generación de un entrecruzamiento mayor de sus componentes, como señal de defensa e inducción de la HR (Locato & Gara, 2018). Se ha detectado este estallido oxidativo en los tejidos de *P. patens* frente a la infección por patógenos como *B. cinerea* y los oomycetes *P. debaryanum* y *P. irregulare* (Oliver et al., 2009; Ponce de León et al., 2012) o ante el contacto directo con quitina y quitosano (PAMPs) (Lehtonen et al, 2012). *P. patens* también es capaz de activar una respuesta HR-like al enfrentarse a patógenos como *B. cinerea*, donde se evidencia una contracción del citoplasma, acumulación de compuestos fluorescentes, ruptura de cloroplastos, condensación de núcleos, fragmentación del DNA y formación de vacuolas citoplasmáticas (Lawton & Sadasan, 2009; Ponce de León et al., 2007, 2012).

Se ha estudiado la reprogramación transcripcional que genera el reconocimiento de los microorganismos patógenos en *P. patens*. Entre los genes que se inducen encontramos aquellos que codifican para las enzimas fenilalanina amino liasa (PAL), chalcona sintasa (CH), lipooxigenasa-1 (LOX1), y PR-1 (Ponce de León et al., 2007, 2012). Estas enzimas son las encargadas de sintetizar fenilpropanoides, (dentro de los que se incluyen monómeros de lignina, fitoalexinas y flavonoides), SA y ácidos grasos oxigenados u oxilipinas, en los que se encuentran el JA y aldehídos. Todos estos compuestos son de suma importancia para desencadenar una respuesta efectiva de defensa. Interesantemente, LOX1 es capaz de usar ácido araquidónico como sustrato para la producción de oxilipinas, las cuales no están presentes en angiospermas y podrían estar actuando en la defensa contra patógenos (Anterola et al., 2009; Kift et al., 2005).

En el genoma de *P. patens* se han encontrado varias proteínas homólogas a componentes de la vía de síntesis del ET y los receptores que permiten percibirlo (Rensing et al., 2008). Respecto al JA y SA, se han encontrado varios genes homólogos a los requeridos en sus vías de síntesis. El SA aumenta tras la infección con *B. cinerea*, sugiriendo que esta hormona participa en la defensa de *P. patens* (Ponce de León et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que el JA no se sintetiza ni en la hepática *M. polymorpha* ni en *P. patens*. En su lugar la hormona encargada de la señalización es su precursor, el dinor-ácido oxofitodienoico (dinor-OPDA). Se descubrió recientemente como una sustitución de un aminoácido en el receptor COI1 es la responsable de este cambio en el reconocimiento y especificidad de unión con su ligando (Monte et al., 2018). El OPDA se acumula en tejidos de *P. patens* expuestos a patógenos como *B. cinerea* y *Pythium* (Adie et al, 2007; Oliver et al., 2009; Ponce de León et al., 2012). Tratamientos realizados con ambas hormonas en tejidos de *P. patens* generan una reducción del largo de rizoides, tamaño de las colonias e inducción de la expresión de varias PAL.

P. patens también es un modelo muy utilizado para estudios de estrés abiótico. La hormona ABA es de las más estudiadas, de la que se sabe que genera un aumento en sus niveles endógenos frente a estreses osmóticos (Minami et al., 2003). La aplicación exógena de esta hormona tiene efectos en el crecimiento y diferenciación de sus tejidos de *P. patens* (Takezawa & Komatsu, 2011). Se ha descubierto que luego de un pre-tratamiento, *P. patens* se vuelve más tolerante al congelamiento, hiperosmosis y deshidratación (Oldenhof et al.,

2006). Se cree que esta tolerancia a la desecación está regulada por vías de señalización que están aún conservadas en angiospermas (Khandelwal et al., 2010; Richardt et al., 2010). En conclusión, esta hormona junto con ET y SA parecen haber estado presentes desde las primeras etapas de la terrestreización, mientras que el JA surgió posterior a la divergencia entre plantas vasculares y briofitas.

3.8 Antecedentes del grupo de investigación en la identificación y caracterización del gen 214 de *Physcomitrium patens* (*Pp214*)

En estudios previos del grupo de investigación se generó una biblioteca de expresión diferencial con ARN proveniente de colonias de *P. patens* tratadas con un cultivo acelular de *P. carotovorum*, la cual permitió la identificación del gen *Pp214* (Alvarez et al., 2016).

Este es un gen de función desconocida, sin homólogos en otras plantas y por eso es considerado un gen huérfano. Se analizó el patrón de expresión de *Pp214* en colonias de *P. patens* sometidas a tratamientos con dos filtrados de cultivo (CF) acelular, uno de *P. carotovorum* (SCC1) y el otro de *P. wasabiae* (SCC3193), y esporas del hongo fitopatógeno *B. cinerea* con su control con agua a las 4 y 24 horas (figura 4).

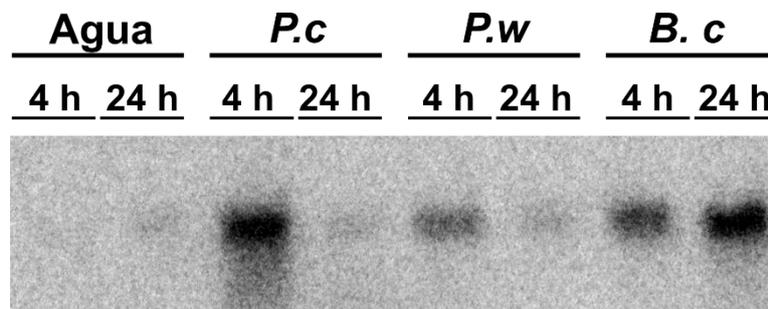


Figura 4: Expresión del gen *Pp214* frente a diferentes tratamientos. Niveles de expresión de *Pp214* frente al CF de bacterias fitopatógenas y esporas de *B. cinerea* a las 4 y 24 horas analizados por Northern blot. Control realizado con agua, el tiempo está en horas, SCC1 y SCC3193 corresponden a CFs de *P. carotovorum* y *P. wasabiae* y B.c a esporas de *B. cinerea*.

Se observaron dos tendencias de expresión diferentes: la primera provocada por los dos filtrados de cultivo y la segunda dada por la infección con esporas de *B. cinerea*. En la primera se observa como la inducción de *Pp214* se produce rápidamente, siendo mayor a las 4 que a las 24 horas. El filtrado de cultivo de *P. carotovorum* SCC1 está compuesto por diversas enzimas degradadoras de pared y la proteína Harpin, las cuales son ricas en el aminoácido glicina y capaces de actuar como efectoras para inducir la HR en plantas (Rantakari et al, 2001; Lee et al, 2001). Se observó anteriormente que las células de *P. patens* bajo este tratamiento mostraron señales de HR, dentro de las que se incluyen la contracción del citoplasma, acumulación de compuestos autofluorescentes y rotura de cloroplastos, aunque no así bajo el tratamiento con un filtrado de *P. carotovorum* SCC1393 (Ponce de León et al., 2007). La

cepa SCC1393 no es capaz de producir las proteínas harpin, por lo que la amplitud de la respuesta generada es menor que para la cepa SCC1. En el segundo caso, para las esporas de *B. cinerea* deben darse las condiciones de humedad y temperatura para que al entrar en contacto con el tejido del musgo éstas empiecen a germinar, formen micelio y luego generen toda su batería de enzimas degradadoras de pared. De esta manera la inducción del gen se ve retrasada y se encuentra mayor cantidad de su ARNm a las 24 horas (figura 4).

Confirmada la expresión del gen como respuesta al daño por microorganismos patógenos, se realizó una construcción para sobre-expresar *Pp214* en *P. patens*, aunque no se lograron obtener transformantes luego de varios intentos de transformación de protoplastos. Debido a este resultado negativo se creyó que la sobre-expresión de este gen era letal para las células.

Se procedió a transformar plantas de *A. thaliana* que sobre-expresaran *Pp214* de manera constitutiva y se seleccionaron varios transformantes que pasaron la selección (F2 y F3). A estas plantas transformantes se les estimaron sus niveles de sobre-expresión por RT-PCR semicuantitativa (figura 5A) y se utilizaron para realizar ensayos de infección con microorganismos patógenos durante mi tesis de grado, mostrando una tendencia hacia una mayor resistencia (tesis de grado de Lucía Vignale, figura 5B).

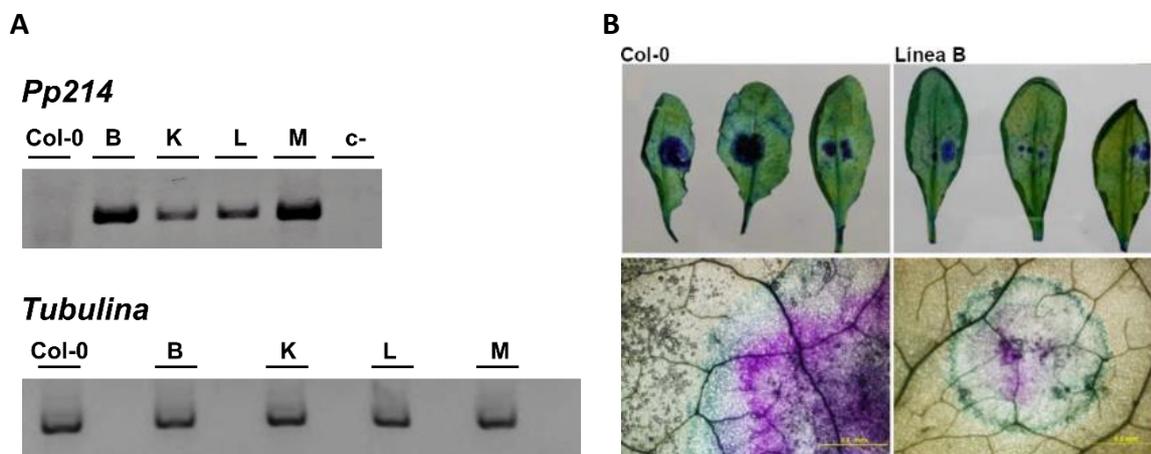


Figura 5: Expresión de *Pp214* en líneas transformantes de *A. thaliana* y niveles de daño observados en hojas expuestas a micelio de *P. irregulare*. A- Expresión de *Pp214* en las diferentes líneas de *A. thaliana* analizadas (Wt, B, K, L y M) luego de 28 ciclos de amplificación por PCR. Los controles corresponden a un plásmido de clonado que posee la secuencia codificante para *Pp214* y a la reacción de PCR con H₂O. En la región inferior se incluyen los productos de PCR al amplificar el gen de *tubulina* como control uniforme de carga. B- Daño provocado por el patógeno *P. irregulare* en hojas desprendidas de *A. thaliana* de genotipo salvaje (Col-0) y hojas provenientes de plantas de la línea B, el colorante utilizado para la tinción fue azul de toluidina.

Se determinó que las líneas con mayores niveles de expresión de *Pp214* eran la B y M (figura 5 A) y que la línea B presentaba menores niveles de daño frente a *P. irregulare* que hojas de genotipo salvaje (figura 5 B). En base a estos estudios previos, decidimos continuar trabajando con *Pp214* y evaluar su posible rol en la defensa de *P. patens* frente a patógenos.

4 Hipótesis

El gen de función desconocida *Pp214* cumple una función en la defensa de *P. patens* frente a estrés biótico.

5 Objetivos

5.1 General

Estudiar el rol que cumple el gen de función desconocida *Pp214* de *P. patens* en la respuesta de defensa de vegetal frente a microorganismos patógenos.

5.2 Específicos

- Analizar el perfil de expresión de *Pp214* durante el desarrollo y diferentes condiciones de estrés.
- Determinar la localización subcelular de la proteína Pp214.
- Generar líneas de *P. patens* que sobre-expresen constitutivamente el gen *Pp214* para su estudio funcional.
- Analizar si la sobreexpresión de *Pp214* bajo el control de un promotor constitutivo aumenta la resistencia de *P. patens* y *A. thaliana* frente a patógenos microbianos.

6 Materiales y Métodos

6.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

6.1.1 *Physcomitrium patens*

Se trabajó con el musgo *P. patens* subespecie *patens* ecotipo Grandsen 2004 de genotipo salvaje o wild-type (wt) (Schaefer et.al. 1991) El tejido fue crecido en el medio de cultivo BCDTA [CuSO₄.H₂O 0.055 mg/L, ZnSO₄.7H₂O 0.055 mg/L, H₃BO₃ 0.614 mg/L, MnCl₂.4H₂O 0.389 mg/L, CoCl₂.6H₂O 0.055 mg/L, KI 0.028 mg/L, NaMoO₄.2H₂O 0.025 mg/L, MgSO₄.7H₂O 0.25 g/L (1 mM), KH₂PO₄ 0.25 g/L pH 6.5, KNO₃ 1.01 g/L, FeSO₄ 12.5 mg/L, CaCl₂ 1 mM, (NH₄)₂C₄H₄O₆ 5 mM y agar 10 g/L] (Ashton et al. 1977). Para los diversos tratamientos realizados las colonias fueron crecidas sobre placas cubiertas con celofán por tres semanas a 21-22°C con un fotoperiodo 16/8 horas de luz/oscuridad. El material vegetal fue propagado en una cámara de flujo laminar partiendo siempre de tejido en estado de protonema.

6.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 fueron utilizadas como referencia para la comparación con dos líneas sobre-expresantes de *Pp214* de igual genotipo base. Las semillas fueron estratificadas en agua, frío y oscuridad por dos días antes de ser sembradas en un sustrato de turba/vermiculita en proporción 3:1. Estas plantas fueron crecidas en cuartos de cultivo a 22°C con fotoperiodo 16/8 horas de luz/oscuridad por cuatro semanas antes de llevar a cabo los ensayos de infección.

6.1.3 *Nicotiana benthamiana*

Semillas de *N. benthamiana* fueron sembradas sobre un sustrato compuesto por tierra, turba y vermiculita en proporción 3:1:1. Estas plantas fueron crecidas en un invernadero a 24-26°C con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz oscuridad aproximadamente por cuatro semanas previas a su utilización.

6.2 Cepas y cultivo de microorganismos

6.2.1 *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas DH5 alfa y DB3.1 de *E. coli* para el pasaje de los diferentes vectores de expresión. Los cultivos se realizaron tanto en medio Luria-Bertani (LB) [bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%] líquido como sólido (con agregado de agar 1.5%). Los cultivos se crecieron a 37°C durante la noche.

Se generaron células electro competentes de la cepa DH5 alfa de *E. coli*. Se partió de un cultivo fresco en medio sólido del que se tomaron células para realizar un pre-cultivo de 5 mL en medio LB a 37°C en agitación "overnight". Con este pre-cultivo se inocularon 500 mL de medio LB y se incubó en las mismas condiciones que el anterior hasta llegar a una densidad óptica (DO₆₀₀) máxima de 0.7. Al alcanzar esta DO₆₀₀ se enfriaron las células en hielo durante 20 minutos y centrifugaron a 4°C por 15 minutos a 4.000 g (condiciones que se mantendrán durante todo el procedimiento). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en

500, 250, 40 y 2 mL de glicerol 10% frío en sucesivas veces de centrifugación, descarte del sobrenadante y resuspensión del pellet resultante. Finalmente se congelaron y guardaron alícuotas de 100 μ L a -80°C .

Para la transformación de estas células se descongelaron las alícuotas en hielo y agregaron 10 ng de plásmido. Estas se dejaron en reposo durante 10 minutos y luego se pasó la totalidad del volumen a una cuba de electroporación. En un electroporador BIO-RAD Gene Pulser II se las sometió a un pulso de 2.5 kV, 200 Ω y 25 mF y al terminar se agregó 1 mL de medio LB frío. La totalidad del volumen fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 mL e incubado a 37°C en agitación durante una hora, sembrando posteriormente el cultivo en una placa de LB con el antibiótico para el cual concede resistencia el plásmido introducido.

La cepa DB3.1 de *E. coli* se utilizó para clonar aquellos plásmidos Gateway que mantienen el gen letal *ccdB*. Las células competentes se generaron tomando una anzada de una colonia creciendo en una placa de medio LB sólido y cultivándolas a 37°C en agitación durante 4 horas. Luego se centrifugó el cultivo 10 minutos a 4°C y 5000 rpm y descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 0.5 mL de CaCl_2 0.1 M, se centrifugó, descartó el sobrenadante y volvió a resuspender el pellet en 100 μ L de CaCl_2 . Las células se mantuvieron en hielo hasta ser transformadas.

La transformación de las células DB3.1 se llevó a cabo agregando 10 ng del ADN plasmídico e incubando 10 minutos en hielo. Luego se realizó un shock térmico a 42°C durante 90 segundos y se transfirieron los tubos a hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se agregó 1 mL de medio LB y se incubó una hora a 37°C en agitación. Finalmente se plaquearon las células en placas con medio LB sólido y el antibiótico de selección.

6.2.2 *Pythium irregulare* y *Pythium debaryanum*

Se cultivó el micelio de los oomycetes en placas con medio Potato Dextrose Agar (PDA) [BD Difco 213400] por dos días a 26°C antes de ser utilizado en los ensayos de infección. *P. debaryanum* fue cedido por el IIBCE, Uruguay, y *P. irregulare* por el Centro Nacional de Biotecnología-CSIC; Madrid, España.

6.2.3 *Botrytis cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina*

Estos hongos fueron cultivados en placas de PDA a 26°C durante 4 semanas. Se extrajeron sus esporas con H_2O mQ y se contaron en una cámara de Neubauer. Se utilizó una concentración de 5×10^5 esporas/mL para los ensayos con *B. cinerea* y de 1×10^6 para los de *P. cucumerina*. Este último fue cedido por el Centro Nacional de Biotecnología.

6.2.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*, la cual fue crecida en medio LB sólido suplementado con el antibiótico Rifampicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 28°C durante dos días. El cultivo líquido se realizó en medio YEP [triptona 1% (m/v), extracto de levadura 0.5% (m/v), glucosa 0.1%, NaCl 0.5% (m/v), pH 7.0] a 28°C en agitación overnight.

Se generaron células quimio competentes de *A. tumefaciens* inoculando con un precultivo un matraz con 200 mL de medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Rifampicina e incubándolo 5 horas a 28°C en agitación. Luego se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos a

4°C, descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 100 mL de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 estéril. Se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y resuspendió el pellet en 2 mL de LB. De allí se hicieron alícuotas de 100 µL que fueron congeladas en N₂ líquido y guardadas a -80°C.

La transformación de estas células competentes se realizó descongelando una alícuota en hielo, añadiendo el ADN plasmídico a incorporar, mezclando suavemente y dejando reposar por 5 minutos más en hielo. Luego se congeló el tubo eppendorf que las contiene en N₂ líquido e inmediatamente calentó a 37°C por 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de medio LB y procedió como en las transformaciones anteriormente descritas.

6.2.5 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

El cultivo de *P. syringae* pv *tomato* se realizó de modo tapiz en una placa del medio King's B [peptona 20 g/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.5 g/L, glicerol 15% y agar 15 g/L, pH 7] y se cultivó overnight a 28°C.

6.3 Vectores

Se utilizaron una serie de vectores con tecnología Gateway con el fin de clonar y sobre-expresar el gen *Pp214* en diversos organismos microbianos y vegetales. El clonado se realizó en la cepa DB3.1 y DH5 alfa de *E. coli* y en la C58C1 de *A. tumefaciens*. La sobre-expresión se realizó en los organismos vegetales *A. thaliana*, *N. benthamiana* y *P. patens*.

6.3.1 pDONR223

Vector de clonado para *E. coli* que posee resistencia a los antibióticos Estreptomicina (Sm^R) y Espectinomicina (Sp^R) al codificar para la enzima aminoglucosido aminonilil transferasa. Su tamaño es de 5005 pares de bases (pb), posee un origen de copia pBR322, los sitios attP1 y 2 entre los cuales se encuentra la secuencia codificante para el gen letal *ccdB* y la que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa, la cual confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol (Invitrogen Life Technologies).

6.3.2 pUB-Dest

El tamaño de este vector es de 10.818 pb, posee dos genes de resistencia a antibióticos: uno para la phosphinothricin-*N*-acetyltransferase y otro para la aminoglycoside-3-adenyltransferase, enzimas que confieren resistencia al herbicida basta en plantas y a estrepto y espectinomicina en bacterias. El promotor que controla la expresión del gen es el que corresponde a ubiquitina 10. Posee sitios de recombinación compatibles con los demás vectores Gateway utilizados (attR1 y attR2), la secuencia de replicación pVS que permite mantener el vector en *A. tumefaciens* y el origen de replicación pBR322 que asegura un alto número de copias en *E. coli*.

6.3.3 pTHUbi

Es el vector de expresión utilizado para transformar protoplastos de *P. patens* y generar líneas sobre expresantes del musgo. El tamaño de este vector es de 12.039 pb y confiere resistencia al antibiótico hygromicina en *P. patens* y al antibiótico ampicilina durante su clonado en *E. coli*. Posee a su vez secuencias complementarias al locus 108 de *P. patens*, lo que permite su inserción en el genoma a través de un proceso de recombinación homóloga (Schaefer et al, 1997).

6.3.4 pMDC83

Este vector con tecnología Gateway posee 12513 pb, un origen de copia pBR322, el promotor fuerte 35S por duplicado, sitios attR 1 y 2 seguidos por la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente 6 y una cola de 6 residuos de histidina (GFP6-6xhis). Confiere resistencia al antibiótico kanamicina en bacterias e higromicina en plantas (Curtis & Grossniklaus, 2003).

6.4 Preparación y análisis de ácidos nucleicos

6.4.1 Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo utilizando el kit de extracción QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN (Cat. No.27106) según recomendaciones del proveedor.

6.4.2 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal

Se extrajo ARN de colonias de *P. patens* de 3 semanas de crecimiento sobre placas con el medio BCDTA sobre celofán. Previamente se congeló y molió el tejido de una placa (16 colonias) en un mortero y separaron tres alícuotas de 150 mg cada una. Se procesaron 4 réplicas biológicas para cada una de las muestras. La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el kit PureLink™ de Invitrogen (Cat. No.12183018A) y se realizó un tratamiento con la enzima ADNasa libre de RNasas (Cat. No.79254) en columna.

6.4.3 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis se llevó a cabo cargando las muestras en geles de agarosa 1% utilizando el buffer TAE 1x (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). La composición del buffer de carga que se agregó a las muestras de ADN es glicerol 6%, azul de bromofenol 0.05% y xilen-cianol 0.05%. Se utilizaron varios marcadores de peso molecular según el tamaño de banda esperado. Para productos de PCR de pequeño tamaño (330 pares de bases) se utilizó el marcador comercial 1kb Plus DNA Ladder de Invitrogen (Cat. No. 10787018). Para determinar concentraciones y tamaños de DNA plasmídico se utilizó un marcador generado tras la digestión del ADN del fago lambda con la enzima de restricción PstI. El voltaje utilizado fue de 90 mV para los geles en los que la muestra era ADN y 140 para los geles cuya muestra era ARN. Se utilizó bromuro de etidio como intercalante presente en el gel. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador UV.

6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo ProFlex™ de Applied Biosystems cuando se tomó como molde ADN genómico, plasmídico y cDNA (para una RT-PCR semi cuantitativa). Para llevar a cabo las RT-qPCR se utilizó el equipo QuantStudio 3 de Applied Biosystems.

6.5.1 Oligonucleótidos

Se muestran a continuación las secuencias y temperaturas de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos utilizados durante el trabajo. La base de datos utilizada para su diseño es el Phytozome versión 12.1 junto con la herramienta oligo analyzer de Integrated DNA Technologies.

Tabla 1: Nombre, secuencia y Tm de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *Pp214*, la enzima conjugadora de ubiquitina E2 de *P. patens* (*PpUbi-2*, *Pp3c14_21480*) y *PpPAL-1* (*Pp3c1_18680*).

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
FwBP214	5'-AA AAA GCA GGC TCA ATG CAA ATT CGC AGC ATG GCT-3'	51
RvBPss214	5'-A GAA AGC TGG GTA TTC GAA GAA TCC TCC GCG TAT-3'	51
attB1	5'-G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T-3'	45
attB2	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3'	45
Pp214 qPCR fw	5'-AGT TCA CGC ATT TCG AGT CC-3'	60
Pp214 qPCR rv	5'-CAC CCT GCA ATT TGG ATA CC-3'	60
PpUbi-2 qPCR fw	5'-TACGGACCCTAATCCAGATGAC-3'	60
PpUbi-2 qPCR rv	5'-CAACCCATTGCATACTTCTGAG-3'	60
PpPAL-1 Fw	5'-CTTTTGTGCCCCACGTCAAT-3'	60
PpPAL-1 Rv	5'-CTAGCAGCCTGACTACGAGA-3'	60

6.5.2 Amplificación para el clonado de la secuencia codificante de *Pp214*

La amplificación de la secuencia codificante del gen *Pp214* se realizó mediante una PCR de re-amplificación para clonado en el sistema Gateway tomando ADN genómico de *P. patens* como molde dado que *Pp214* no posee intrones. Se utilizó la enzima Phusion High Fidelity (F-530S) para evitar tener errores en la copia y se prepararon dos mix de reacción que diferían únicamente en los oligonucleótidos incorporados y su concentración. Se agregó en ambos 5x Phusion HF buffer, dNTPs 0.8 mM y Phusion DNA Polymerase 0.4 U. Para la primera PCR se utilizó el par de oligonucleótidos FwBP214-RvBPss214 a una concentración de 0.5 mM, mientras que para la segunda PCR se utilizó el par de adaptadores attB1-attB2 a una concentración de 2 mM. El ciclado consistió de una incubación a 98°C por 30 segundos seguida de 10 ciclos a 98°C por 10 segundos, 63°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos. Luego se tomaron 5 µL de esta amplificación que fueron transferidos al segundo mix de reacción, el cual se sometió a dos rondas de amplificación consecutivas. La primera consistió de 30 segundos a 98°C y 5 ciclos de 98°C por 10 segundos, 45°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos, seguida de 20 ciclos de 98°C por 10 segundos, 70°C por 15 segundos, 72°C por 15 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

6.5.3 Retrotranscripción

La síntesis de cDNA a partir del ARN extraído se llevó a cabo utilizando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase de la empresa Thermo Scientific (#EP0441). Se utilizó como molde 1 µg de cada muestra y se siguieron las instrucciones del fabricante. El cDNA sintetizado fue alicuotado y guardado a -20°C y -80°C hasta su uso.

6.5.4 Amplificación por RT-qPCR

Se utilizó el kit comercial QuantiNova Probe SYBR Green PCR Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se realizó una dilución 1:3 del cDNA sintetizado en el punto 7.5.3 de la cual se tomaron 2 µL para llevar a cabo la amplificación. Los pares de nucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *Pp214*, *PpUbi-2* y *PpPAL-1* fueron Pp214 qPCR fw/rv, PpUbi-2 qPCR fw/rv y PpPAL-1 fw/rv, respectivamente. Se confirmó la especificidad del juego de primers mencionados realizando una prueba sobre DNA genómico. El ciclado utilizado consistió de un primer paso de desnaturalización y activación de la enzima

manteniendo 95°C por 2 minutos seguidos por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, y 60°C por 20 segundos. El paso final consistió de un ciclo de 95°C y 60°C. El equipo utilizado fue un QuantStudio 3 de Applied Biosystems. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.3.1.

6.6 Modificaciones en el ADN

6.6.1 Recombinación con BP Clonasa II

Se utilizó el kit comercial Gateway BP Clonase II Enzyme Mix de Invitrogen (Cat. No. 11789-020) utilizando como ADN lineal un producto de amplificación por PCR y el plásmido de clonado pDONR223 para lo que se siguieron las recomendaciones del fabricante.

6.6.2 Recombinación con LR Clonasa II

La recombinación llevada a cabo entre la construcción pDONR223-214 y el vector de expresión pMDC83 se realizó utilizando el Gateway LR Clonase II Enzyme Mix de Invitrogen (Cat. No. 11791-020) según protocolo provisto por el fabricante.

6.6.3 Corte con enzimas de restricción

Se digirió ADN plasmídico correspondiente a la construcción pTHUbi-*Pp214* con la enzima *Swa*I de Thermo Scientific (#ER1241) siguiendo recomendaciones del proveedor.

6.7 Construcción de vectores

6.7.1 Construcción para la transformación de *Physcomitrium patens*

Se utilizó la construcción pTHUbi-*Pp214* realizada previamente en el laboratorio. Fue construida amplificando la secuencia codificante de *Pp214* a partir de ADN genómico de *P. patens* y ligando esta al vector pGEM-T Easy. Desde allí fue clonado y cortado con enzimas de restricción y ligado al vector pENTR-2B. Una vez en un vector Gateway se realizó una reacción de recombinación con el vector pTHUbi (punto 7.3.3) generando la construcción pTHUbi-*Pp214*.

6.7.2 Construcción para la transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se partió del vector pENTR2B:*Pp214* generado en el punto anterior y recombinó la secuencia codificante de *Pp214* en el vector de expresión pUBDEST. Luego de confirmada la correcta secuencia por secuenciación se transformaron plantas de *A. thaliana* por el método floral dip, recogieron sus semillas y analizaron en busca de plantas que poseían el transgén. Se llegó a la obtención de plantas sobre-expresantes de *A. thaliana* en la generación T2 que fueron utilizadas para analizar en esta tesis.

6.7.3 Construcción para la transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana*

La secuencia codificante del gen *Pp214* fue amplificada a partir de ADN genómico de *P. patens* utilizando una enzima High Fidelity en una PCR de re-amplificación para clonado en Gateway descrita previamente (punto 7.5.2). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para eliminar el codón stop de la secuencia de *Pp214* (FwBP214 y RvBPss214) y generar sitios attB en ambos extremos del amplicón (attB1 y 2) y. Esto permitió la utilización directa del producto

de amplificación en una reacción de recombinación con el plásmido pDONR223 (punto 7.3.1) llevada a cabo por la enzima BP Clonasa II (punto 7.6.1). De esta manera se generó la construcción pDONR223-*Pp214*, la cual una vez secuenciada fue recombinada junto al plásmido pMDC83 (punto 7.3.4) en una reacción de recombinación con la enzima LR Clonase II (punto 7.6.2). La construcción final fue secuenciada y corroborada su fase con la secuencia codificante para la GFP-6xhis en el extremo C-terminal.

6.8 Transformación de plantas

6.8.1 Procesamiento del fragmento de ADN a utilizar en la transformación

Para transformar protoplastos de *P. patens* se digirieron 40 µg de la construcción con la enzima de restricción SwaI (punto 7.6.3), se comprobó que la digestión fuese completa, inactivó térmicamente la enzima y limpió la digestión agregando 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Se dejó precipitando durante la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y lavó el ADN con 1 mL de etanol 70%, centrifugando y descartando el sobrenadante nuevamente. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente y resuspendió en H₂O mQ estéril.

6.8.2 Generación de protoplastos de *Physcomitrium patens*

Para transformar establemente *P. patens* se requiere de células vegetales sin pared o protoplastos. Para generarlos se realizaron tres pasajes por cuchilla de tejido en estado juvenil (protonema) durante tres semanas consecutivas previas a la exposición a una solución de D-manitol 8% con las enzimas celulasa (1%) y macerozima (0.5%) (Duchefa Biochemier) durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se filtró la suspensión celular estéril y se centrifugó a temperatura ambiente por 10 minutos a 700 rpm en rotor swing out y desaceleración 0. Se descartó el sobrenadante y realizaron tres lavados consecutivos con posterior centrifugación en las condiciones mencionadas. El primer lavado se llevó a cabo con una solución de D-manitol 8% y los otros dos con solución CaPW (D-manitol 8% y CaCl₂·2H₂O 50 mM). Se cuantificaron los protoplastos en una cámara Improved Neubauer y se resuspendieron en una solución 3M (D-manitol 9,1%, MgCl₂ 15 mM, MES 0.1% pH 5.6).

6.8.3 Transformación estable de *Physcomitrium patens*

Se tomaron 300 µL de la suspensión de protoplastos (3.6 x 10⁶ protoplastos/mL) generada en el punto anterior, agregaron 12 µg de ADN y 300 µL de una solución PEG (PEG 8000 40%, D-manitol 8%, Ca(NO₃)₂ 1 M, Tris-HCl 1 M pH 7,8). Luego se incubó a 45°C durante 5 minutos y se dejó a temperatura ambiente otros 5 minutos más. Posteriormente se realizó un lavado con la solución CaPW, se centrifugó y resuspendieron los protoplastos en 300 µL de PRML (medio BCDTA con agregado de CaCl₂ 10 mM, D-manitol 8%) y 2.5 mL de PRMT (medio BCDTA con agregado de CaCl₂ 10 mM, D-manitol 8% y agar 0.5%). Por último se depositaron sobre una placa del medio PRMB (medio BCDTA con agregado de D-manitol 8% y agar 1%) con celofán y fueron incubados a luz continua durante 7 días.

6.8.4 Selección de líneas transformantes de *Physcomitrium patens*

Se cultivaron las células sometidas al proceso de transformación en placas con el medio sólido BCDTA sin antibiótico sobre celofán por una semana, siendo transferidas luego a una placa con el mismo medio suplementado con el antibiótico higromicina 25 µg/mL. Estos dos pasajes fueron repetidos dos veces, permitiendo el crecimiento únicamente de células que hayan incorporado el fragmento de ADN de interés. Luego de un mes y medio de crecimiento se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en el medio con antibiótico y cultivaron en placas independientes.

6.8.5 Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

Para la transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizó la construcción pMDC83-Pp214. Dicha construcción fue utilizada para transformar la cepa C58C1 quimio competente de *A. tumefaciens*, de la que se seleccionaron clones que habían adquirido el vector. Se generó un cultivo líquido en el medio LB con los antibióticos Kanamicina y Rifampicina (ambos a 50 µg/mL) e incubó overnight a 28°C en agitación. Al día siguiente se añadió acetosiringona (0.2 mM) y dejó en reposo por dos horas. Luego se centrifugó el cultivo por 20 minutos a 3000 rpm, resuspendió el pellet en el buffer de infiltración [MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5.8], preparó una suspensión de 5 mL a una DO₆₀₀ de 0.1, volvió a agregar acetosiringona (0.2 mM) e incubó a temperatura ambiente sin agitación por una hora. Por el lado abaxial de hojas de tabaco de 4 semanas de crecimiento se infiltró la suspensión de bacterias y esperó 1, 2 y 3 días antes de analizar el tejido en un microscopio confocal.

6.9 Análisis de las líneas de *Physcomitrium patens* que sobre-expresan Pp214

6.9.1 Análisis de la ploidía relativa por citometría de flujo en plantas transformantes de *P. patens*

Se analizó el nivel de ploidía de 5 líneas sobre-expresantes para Pp214 de *P. patens* y se comparó con células de genotipo salvaje. Para esto se tomó una colonia de 3 semanas de crecimiento de cada línea y cortaron gametóforos con un bisturí hasta disgregar visiblemente el tejido sobre 1 mL de Woody Plant Lysis Buffer [Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, MgCl₂·6H₂O 4 mM, EDTA Na₂·2H₂O 2 mM, NaCl 86 mM, Tritón X-100 1%, Na₂O₅S₂ 10 mM y PVP-10 1%]. Luego se filtraron 450 µL de la suspensión resultante y se agregó yoduro de propidio a 50 µg/mL, se dio vortex e incubó 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se analizó cada muestra por separado empezando la calibración con la muestra de genotipo salvaje. El equipo utilizado para realizar el análisis fue un MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter).

6.9.2 Análisis morfológico de tejido en diferentes estados de desarrollo

El análisis morfológico de las diferentes líneas se realizó mirando en una lupa colonias y gametóforos individuales de cada una de las líneas sobre-expresantes de *P. patens* utilizando siempre como punto de comparación colonias de genotipo salvaje. Se utilizó el colorante Azul de toluidina al 0.05% para teñir raíces y realizar un análisis más detallado en un microscopio.

6.10 Inoculación con patógenos y tratamientos generadores de estrés abiótico en plantas transformantes de *Physcomitrium patens*

6.10.1 Estrés biótico

6.10.1.1 Micelio de *Pythium debaryanum* y *Pythium irregulare*

La inoculación se realizó siguiendo el protocolo de Adie et al., 2007. Brevemente: placas de PDA con micelio de *P. irregulare* y *P. debaryanum* de dos días de crecimiento fueron utilizadas para cortar discos de 0.5 cm de diámetro de la zona activa de crecimiento. Estos discos fueron depositados sobre colonias de *P. patens* de 3 semanas de crecimiento. Se utilizaron discos de PDA sin micelio como control negativo. Las placas fueron llevadas al cuarto de cultivo en condiciones normales de crecimiento y esperó 24 horas antes de determinar el daño causado.

6.10.1.2 Esporas de *Plectosphaerella cucumerina*

Se recogieron esporas del hongo fitopatógeno *P. cucumerina* de placas de más de tres semanas de crecimiento. Sobre estas placas se agregó H₂O mQ y rastrilló el micelio para desprender las esporas. La suspensión de esporas obtenida en cada caso fue cuantificada en una cámara Improved Neubauer y llevada a la concentración de uso: 5 x 10⁵ esporas/mL.

6.10.2 Estrés abiótico

6.10.2.1 Osmótico y salino.

Colonias de *P. patens* sobre-expresantes para *Pp214* y de genotipo salvaje de 3 semanas de crecimiento en condiciones normales (punto 7.1.1) sobre celofán fueron transferidas a placas con el medio BCDTA suplementado con D-manitol 0.9 M o NaCl 0.5 M durante 10 días. Transcurrido este tiempo se volvió a transferir el tejido a placas de BCDTA por dos semanas. Protocolo tomado de Ruibal et al., 2013.

6.11 Inoculación con microorganismos patógenos en plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*

6.11.1 Tratamiento con *Pst DC3000*

Para inocular plantas de *A. thaliana* con una suspensión de *P. syringae*, se generó el día previo un cultivo fresco y en forma de tapiz en una placa del medio King's B. Al día siguiente se recuperaron las células con 5 mL de MgCl₂ 10 mM estéril y midió la DO₆₀₀ de la suspensión. Se llevó la OD₆₀₀ a 0.5 (5 x 10⁷ cfu/mL) y agregó Silwet al 0.04%. La infección de las plantas se realizó mediante spray.

6.11.2 Esporas de *Botrytis cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina*

Se recogieron las esporas de ambos hongos al igual que se realiza para infectar *P. patens*. Las concentraciones utilizadas fueron 5 x 10⁴ y 1 x 10⁵ para *B. cinerea* y 1 x 10⁶ para *P. cucumerina*. La infección se realizó depositando una gota de 6 µL de la suspensión de esporas sobre 4 hojas de cada planta de *A. thaliana* de 4 semanas de crecimiento a analizar. Las plantas utilizadas para la infección con *P. cucumerina* fueron crecidas en fotoperiodo corto (8 horas de luz y 16 de oscuridad) y las utilizadas para los ensayos con *B. cinerea* en fotoperiodo largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad). La cabina en la que se encuentran las plantas se cerró

herméticamente y abrió a los 2 días y a partir de los 9 días para *B. cinerea* y *P. cucumerina* respectivamente.

6.12 Evaluación de las líneas sobre-expresantes de *Physcomitrium patens*

6.12.1 Cuantificación de daño con el colorante Azul de Evans

Colonias infectadas con los oomycetes *P. debaryanum* y *P. irregulare* fueron cuidadosamente desprendidas del disco de micelio o PDA a las 24 horas post infección y sumergidas en el colorante azul de Evans [0.05% (p/v)] durante 1 hora. Luego se realizaron 4 lavados en H₂O mQ y se depositaron de a 4 colonias en tubos falcon de 15 mL conteniendo 6 mL de la solución de lavado [metanol 50%, SDS 1%]. Estos tubos fueron incubados a 60 °C por 30 minutos y luego las colonias fueron depositadas sobre trozos de papel aluminio de peso conocido y puestas a secar por al menos 16 horas en una estufa a 65°C. Se midió la absorbancia a 600 nm de la solución de lavado junto con el colorante desprendido del tejido en placas de 96 pocillos de fondo curvo. Finalmente se determinó la relación absorbancia a 600 nm/mg de paso seco por línea y tratamiento.

6.12.2 Tinción para visualizar el hongo *Plectosphaerella cucumerina*

Esta tinción se llevó a cabo utilizando una solución del colorante Solofenil flavine 7 gfe [0.1%]. Se incubó el tejido de colonias de *P. patens* de genotipo salvaje infectadas con una suspensión de esporas del hongo de concentración 5×10^5 esporas/mL luego de 3 días de infección, por 10 minutos en oscuridad. El tejido fue lavado en H₂O destilada y visualizado en un microscopio Olympus BX61.

6.12.3 Visualización de cambios a nivel de pared celular

Para visualizar los cambios en la pared celular de hojas de *P. patens* en respuesta a la infección por el hongo se partió del mismo tejido que en el punto anterior, el cual fue teñido con dos colorantes diferentes. Uno fue una solución de Safranina-O [0.01% en etanol 50%] durante 10 minutos y posteriores lavados con H₂O destilada. Esta tinción se combinó con el colorante Solofenil flavine 7 gfe para visualizar al hongo y modificaciones en la pared vegetal al mismo tiempo. La segunda tinción se realizó destiñendo el tejido en etanol 95% con posterior incubación con el colorante azul de metilo [0.01% en buffer fosfato pH 7,0] durante media hora. El tejido fue lavado con H₂O destilada y visualizado en el microscopio Olympus BX61.

6.12.4 Evaluación de la respuesta generada frente a estrés osmótico y salino.

La evaluación se realizó de manera visual y se tomaron fotos de las colonias a diferentes días luego de volver a poner las colonias en medio normal, período en el cual los tejidos se empiezan a recuperar.

6.13 Evaluación de las líneas transformantes de *Arabidopsis thaliana*

6.13.1 Recuento de colonias de *Pst DC3000*

Se tomaron 3 hojas por planta de *A. thaliana* tres días post-infección y se sacó un bocado de 1 cm² de cada una. Se mezclaron los bocados y depositaron de a 3 en tubos eppendorf de 1,5 mL conteniendo 500 µL de MgCl₂ 10 mM y bolitas de vidrio pequeñas. Se homogenizó el tejido agitando vigorosamente los tubos a máxima velocidad por 30 segundos (30 agitaciones/segundo). Se hicieron diluciones seriadas (hasta -5) en MgCl₂ 10 mM y plaquéó una alícuota de dos diluciones correspondientes a cada genotipo en placas individuales con medio King's B. Estas placas fueron incubadas a 28°C durante dos días y luego se contaron las colonias presentes en cada placa. Los datos se expresaron según el logaritmo de la cantidad de colonias obtenidas por placa/cantidad de tejido utilizado.

6.13.2 Cuantificación del área foliar dañada por *Botrytis cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina*

Las lesiones generadas por estos hongos se cuantificaron sobre cada hoja utilizando un calibre digital Silverline. Cuando las lesiones se consideraron pequeñas se volvió a cerrar herméticamente la cabina y se dejó proseguir la infección por un par de días para volver a cuantificar el daño.

6.14 Análisis de la localización subcelular de Pp214

6.14.1 Microscopía confocal

Se cortaron trozos de 0.5 cm² de hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana* 72 horas post inoculación que fueron observados en el microscopio confocal Leica TCS SP5. Se utilizó el objetivo 63x para la toma de fotos y el láser de excitación 488nm.

6.14.2 Extracción de proteínas de *Nicotiana benthamiana* y análisis por Western blot

Se cortaron hojas de *N. benthamiana* agro-infiltradas con la construcción pMDC83-Pp214 a las 24, 46 y 72 horas post infiltración. Se congeló el tejido en N₂ líquido y guardó a -80°C hasta su uso. Una vez recogidas todas las muestras se disgregó el tejido congelado con un homogenizador durante 5 segundos. Luego se agregaron 200 µL de buffer de extracción de proteínas [Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, NP-40 0.2%, PMSF 2 mM y el cocktail inhibidor de proteasas-SIGMA (P2714)] frío y se volvió a homogenizar por 5 segundos más. Las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm y 4°C. Se tomó el sobrenadante y se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Se cargaron en un gel de poliacrilamida 12% 25 µg de proteínas junto al marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (#1610374). El buffer de carga utilizado estaba compuesto por SDS 1%, β-mercaptoetanol 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01% y Tris 50 mM pH 6.8. El gel se corrió 15 minutos a 100 V y a 150 V hasta el final. Antes de terminar la corrida electroforética se sumergieron 6 papeles 3MM, una membrana de nitrocelulosa y las esponjas del set en agua y luego en buffer de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%]. Al terminar la corrida se sumergió el gel en el mismo buffer y se procedió a montar el blot. La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante una hora a 4°C con agitación magnética. Transcurrido este tiempo se desmanteló el equipo y se tiñó el gel con una solución de tinción Ponceau [Ponceau S 0.1% (p/v) y ácido acético 5%]

por 5 minutos. Se tomó una foto, se lavó la membrana en buffer de lavado [TBS (Tris 5 mM pH 7.4, NaCl 15 mM) y Tween-20] durante un minuto en agitación y se procedió al bloqueo de ésta en buffer de bloqueo [TBS, Tween-20 y leche en polvo 5%] durante una hora en agitación. Se descartó el buffer de bloqueo y se lavó 3 veces en buffer de lavado. Se agregó el anticuerpo anti-GFP conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (AS153001) [1/20.000, leche 1%] y se incubó overnight a 4°C en agitación. Al día siguiente se guardó el anticuerpo a -20°C y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en buffer de lavado a temperatura ambiente en agitación. Luego se descartó el buffer, se secó la membrana en papel de filtro y se incubó por 5 minutos con el agente revelador en condiciones de poca luz. Transcurrido este tiempo se llevó la membrana al equipo de toma de imágenes ChemiDoc de BioRad.

6.15 Análisis informático

6.15.1 Expresión espacio-temporal

Se tomó información de la expresión del gen *Pp214* de las bases de datos del ePlant de la Universidad de Toronto (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>) y del PEATmoss (<https://peatmoss.online.uni-marburg.de/>).

6.15.2 Elementos regulatorios en cis

Se tomaron de la base de datos Phytozome versión 12.1 los 1500 pb previos al inicio de transcripción del gen *Pp214* y analizaron en busca de motivos conservados a través del portal PlantCARE (Lescot et al., 2002).

6.15.3 Estudio evolutivo de la presencia del gen *Pp214* en genomas secuenciados de otros musgos

Se utilizaron las bases de datos del NCBI y Phytozome versión 12.1 como motor de búsqueda de secuencias homólogas a *Pp214*.

6.16 Análisis estadístico

Se utilizó el test de Student para determinar la significancia estadística de los resultados obtenidos. Se consideraron niveles de significancia del 5, 1 y 0,1%, tomando valores de $p < 0.05$ (*), 0.01 (**) y 0.001 (***)

7 Resultados

7.1 Características del gen *Pp214* de *P. patens*

El gen *Pp214* fue identificado en un trabajo anterior del grupo de investigación (Alvarez et al. 2016), y corresponde al gen con la identificación Pp3c2_30370V3.1 localizado en el cromosoma 2 de *P. patens* entre las posiciones 20244787 y 20247194 (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/report/gene/Ppatens_v3_3/Pp3c2_30370). Otros nombres con los que se lo identifica son: Phpat.002G124800; Phypa_69162; Pp1s22_34V6; Pp1s22_34V6.1; Pp3c2_30370; Pp3c2_30370E2.1; Pp3c2_30370V1.1; Pp3c2_30370.v3.1. El largo de su secuencia genómica es de 824 nucleótidos, compuestos por un 5' y 3' UTR de 394 y 124 pb respectivamente, y 306 pb de secuencia codificante sin intrones (figura 6 A). Existe un transcripto alternativo predicho con la misma secuencia codificante y regiones no traducidas más largas (1441 pb el 5'UTR y 660 pb el 3'UTR). La secuencia peptídica predicha para este gen es de 101 aminoácidos (figura 6 B).

A

Pp3c2_30370V3.1

```
ATACATTCAACATTGACAGCACCAGTCGCTTTGCATCGTGTTGTTGCATTCAAGCAAAGTGAGACCATTATCCA  
AACTGATAGAACACCGTGCCAGCAGCTGTTTGTGAGGATCGGAGTCTGTTGCATCGTACCTCGTCAAGCGACT  
TGGATCACCATGGATAGAGGCATGAACAACCAATGTGTCTGTGAAGATCCTCATCCTAGGCTGAAATTACA  
GTAGCGTGACACACACACAGACACACACAGATTTTGAGCTGCTAGCTAGGCAAATAGAGGAAGAGGAAGA  
AGCCATGGACAGGGGAATGCAAGGCAACGCCAATGTGTCTGTAAAGATTCTCCTCTTGGGAAAGACAGGCGA  
GGGAGAAATTCTCCTCGTGGGATTGAGGAATGCAAATTCGCAGCATGGCTGCATCAGGAGCGATCGATCT  
GCCTGTTTCTGTACCCATTGCATTCGCTTTGGAAGATCTAGAACACAGGGATCTAAGCAACAGTGATGAATCA  
GTAAACAACAGCAACATGCTTCCGAAGATTCTATTCCGTGTAATGCAGAGCTGAGGCGAGAGCATCAGTTCA  
CGCATTTGAGTCCCTGCGATTTCACTGTCTAGATGAACTGGTTTTTGCCTAACATCGACTGGTATCCAAATT  
GCAGGGTGTGGGCAACGGAACATACGCGGAGGATTCTCGAATAAAAATGTGGCTTATTGTAGTTTATTACA  
AGATAAAGTGCAGCATATCGGTTATTGGCTAGCTTATATCTACACTACAATAATAAAAATAAAAAAACTGCACA  
TCAATGTGCAGAATTCCTCAGG
```

B

Secuencia peptídica

```
MQIRSMAASGAIDLPSVPIAFALEDLEHRDLSNSDESNNNSMLPKILIPCNAELRREHQFTHFESLRFHCLDELVF  
CPTSTGIQIAGCGQRNIRGGFFE
```

Figura 6: Secuencias genómica y peptídica del gen *Pp214*. A- Secuencias pertenecientes al 5'UTR en verde, codificante en azul y 3'UTR en violeta. B- Secuencia peptídica de 101 aminoácidos en gris. Datos tomados de la base de datos Phytozome v13.

7.2 Búsqueda de *Pp214* en genomas de otros musgos

Se llevó a cabo la búsqueda de secuencias homólogas a *Pp214* en las bases de datos Phytozome v13 y NCBI, no encontrándose genes con similitud de secuencia codificante para

ninguna otra especie vegetal. El Phytozome v13 se utilizó durante todo el estudio como base de referencia para datos de expresión, estudios de contexto genómico y familias de proteínas dado su enfoque en genomas provenientes del reino vegetal. En este sitio se comparó *Pp214* con los genomas de los musgos *Ceratodon purpureus* (*C. purpureus*) y *Sphagnum fallax* (*S. fallax*). La base de datos del NCBI se utilizó con el fin de flexibilizar los parámetros de la búsqueda y acceder a genomas que se encuentran actualmente en fase de borrador y por lo tanto no están presentes en el Phytozome v13, como son los genomas de los musgos *Pleurozium schreberi* (BioProject PRJNA509035) (Pederson et al., 2019) y *Funaria hygrometrica* (*F. hygrometrica*). La utilización del NCBI también permitió utilizar datos obtenidos por RNA-seq de especies de musgos dentro de estos géneros de los que solo existen datos de expresión génica, como por ejemplo *Bryum argenteum*, *C. conicus*, *C. heterophyllum*, *F. apophysata*, *F. flavicans*, *S. palustre* y *S. lescurii*, *Syntrichia caninervis* entre otros (Szovényi et al., 2011; Gao et al., 2014; Gao et al., 2015; Devos et al., 2016).

Ante la ausencia de homología de secuencia con genes en organismos cercanos evolutivamente, se estudió el contexto genómico de *Pp214* en búsqueda de una posible sintenia. Esto se realizó mediante la plataforma VISTA, la cual permitió comparar la región del cromosoma 2 de *P. patens* en la que se encuentra *Pp214* con las regiones ensambladas del genoma de *S. fallax*. El programa permitió la utilización de la versión 3.0 del genoma de *P. patens* y la 0.5 de *S. fallax*, siendo que al momento de realizar el estudio existe una versión mejor para ambos (v3.1 para *P. patens* y v1.1 para *S. fallax*) pero los datos de éste último se encuentran protegidos hasta la publicación del artículo asociado.

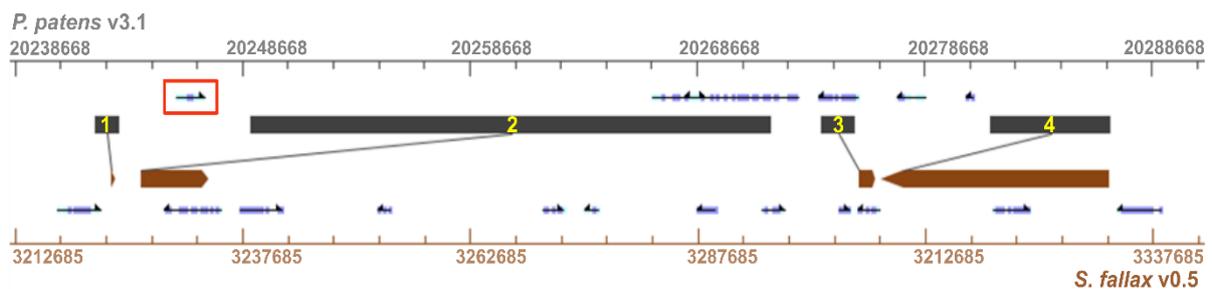


Figura 7: Bloques de homología encontrados entre la región cromosómica de *Pp214* y el super 6 de *S. fallax*. Se muestra en la hebra superior el cromosoma 2 de *P. patens* y en la hebra inferior el super 6 de *S. fallax*. *Pp214* se enmarcó en el rectángulo rojo. Se representa en bloques de color gris (con numeración en amarillo) y marrón las regiones de homología encontradas entre ambos genomas. Estudio realizado en la plataforma VISTA con las versiones 3.1 de *P. patens* y 0.5 de *S. fallax*.

Se encontraron cuatro bloques de homología entre la región cromosómica en la que se encuentra *Pp214* y el andamio 6 de *S. fallax* (figura 7). La primera y más pequeña con 1044 pb (Chr02:20242155-20243199) se encuentra corriente arriba de *Pp214* (Figura 7, n° 1) y no codifica para ningún gen en ninguno de los dos genomas comparados.

La segunda es la más extensa con 6570 pb (Chr02: 20248990-20271898) y abarca a dos genes en *P. patens*: *Pp3c2_30380V3.1* y *Pp3c2_30390V3.1*. El primero no posee dominios anotados, es de función desconocida y se encuentra únicamente en *P. patens* (por lo que no se

encuentra en *S. fallax*). El segundo codifica para una RNAsa P, de la que *S. fallax* posee tres homólogos y uno de ellos se encuentra en el super 6 (Sphfalx0006s0233.2) (figura 7, n°2).

El tercer bloque de homología consta de 1508 pb (Chr2: 20274083-20275591) dentro del que se encuentra la secuencia codificante para una citocromo P450 (Pp3c2_30400V3.1) que posee un 55% de similitud con 2 genes presentes en el super 6 de *S. fallax*: Sphfalx0006s0236.1 y Sphfalx0006s0241.1 (figura 7, n°3). El cuarto y más alejado bloque de homología del cromosoma 2 de *P. patens* con el super 6 en esta región abarca 5308 pb (Chr02:20281531-20286839) y no codifica para ningún gen en *P. patens* (figura 7, n°4). Estos resultados sugieren que la región codificante para *Pp214* no está presente en un organismo cercano evolutivamente a *P. patens* como es *S. fallax*, siendo que sí se encuentra homología entre las regiones genómicas que lo flanquean.

7.3 Patrón de expresión de *Pp214*

Se analizó el patrón de expresión del gen *Pp214* en bases de datos disponibles para plantas de carácter público como son el *Physcomitrella* Expression Atlas Tool (PEATmoss) y el ePLANT. Se tomaron de esta última los datos correspondientes a la expresión relativa de *Pp214* (Pp1s22_34V6.1) al gen *PpUbi-2* (Pp1s34_302V6.1) en tejidos de *P. patens* en 11 etapas diferentes del desarrollo.

Los niveles de expresión más altos son detectados en el estadio S1 del esporofito seguido del tejido caulonema (figura 8), en los cuales se obtiene un log₂ fold-change (FC) de 3.03 y 2.01 respectivamente. Cuando se compara la expresión de *Pp214* relativa a un gen house-keeping como es *PpUbi-2* se ve que esta es de 1.12, 1.08 y 1.05 veces mayor para el tejido de cloronema, esporofito en fase S2 y rizoides, y 0.99, 0.92, 0.75, 0.69, 0.45, 0.4 veces menor para esporas, gametóforos, arquegonia, protoplastos y esporofito en fase S3 y maduro.

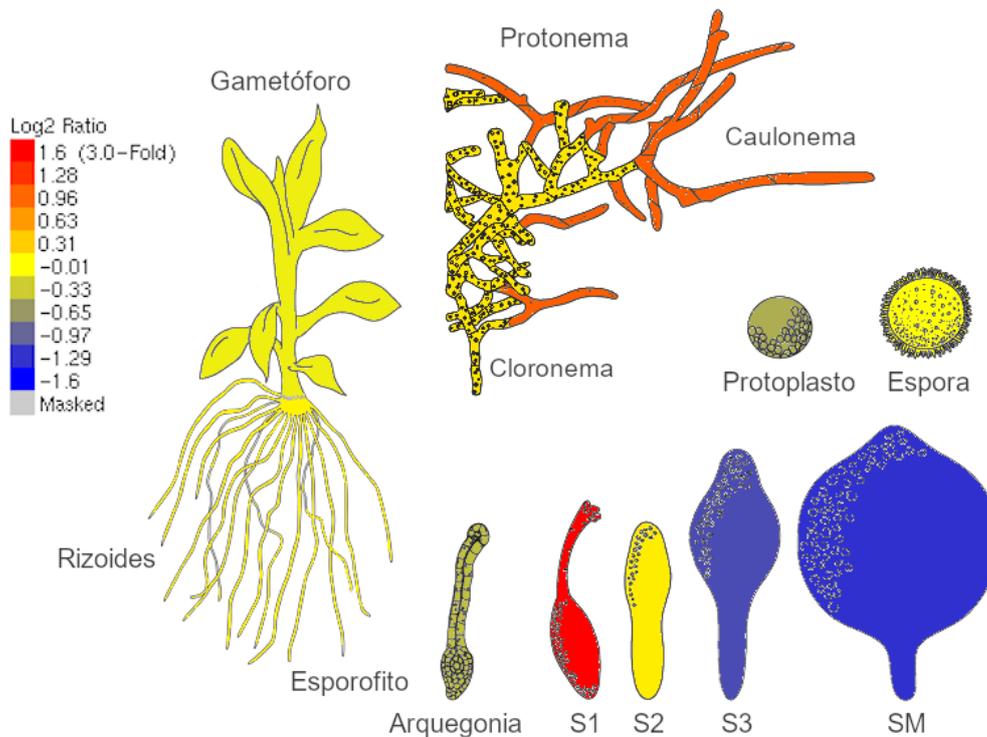


Figura 8: Patrón de expresión de *Pp214* en diferentes tejidos de *P. patens*. Expresión de *Pp214* (*Pp1s22_34V6.1*) relativa al gen *PpUbi-2* (*Pp1s34_302V6.1*) en diferentes tejidos de *P. patens*. Tejidos aislados de colonias de *P. patens* de genotipo salvaje ecotipo Grandsen crecidas a 25°C, fotoperiodo 16/8 y humedad al 50%. La inducción del desarrollo de los gametóforos y esporofitos fue producida en las mismas condiciones variando únicamente la temperatura (17°C). Datos por triplicados. Imagen tomada del *P. patens* electronic Fluorescent Pictograph Browser del Bio-analytical Resource for Plant Biology (BAR) de la Universidad de Toronto. S1,2, 3 y M: esporofitos colectados 5-6, 9-11, 18-20, 28-33 días post fertilización (Ortiz-Ramírez et al., 2016; Winter et al., 2007).

Para estudiar la expresión del gen *Pp214* frente a diferentes condiciones ambientales se recurrió a datos obtenidos por diferentes grupos de investigación que están disponibles en el PEATmoss. Estos fueron obtenidos por diferentes metodologías, como son RNA-seq para los tratamientos en tejidos de protonema, y microarrays para los tratamientos en gametóforos. Los primeros provienen de la publicación de Perroud et al., 2018 y los correspondientes a gametóforos de Hiss et al., 2014 y Possart et al., 2017. Se vio que las condiciones que promovían una mayor inducción de los niveles de expresión de *Pp214* eran los tratamientos con las hormonas ABA y OPDA en protonema (figura 9 A y B), y luz roja y esporas de *B. cinerea* a las 24 horas en gametóforos (figura 9 C y D).

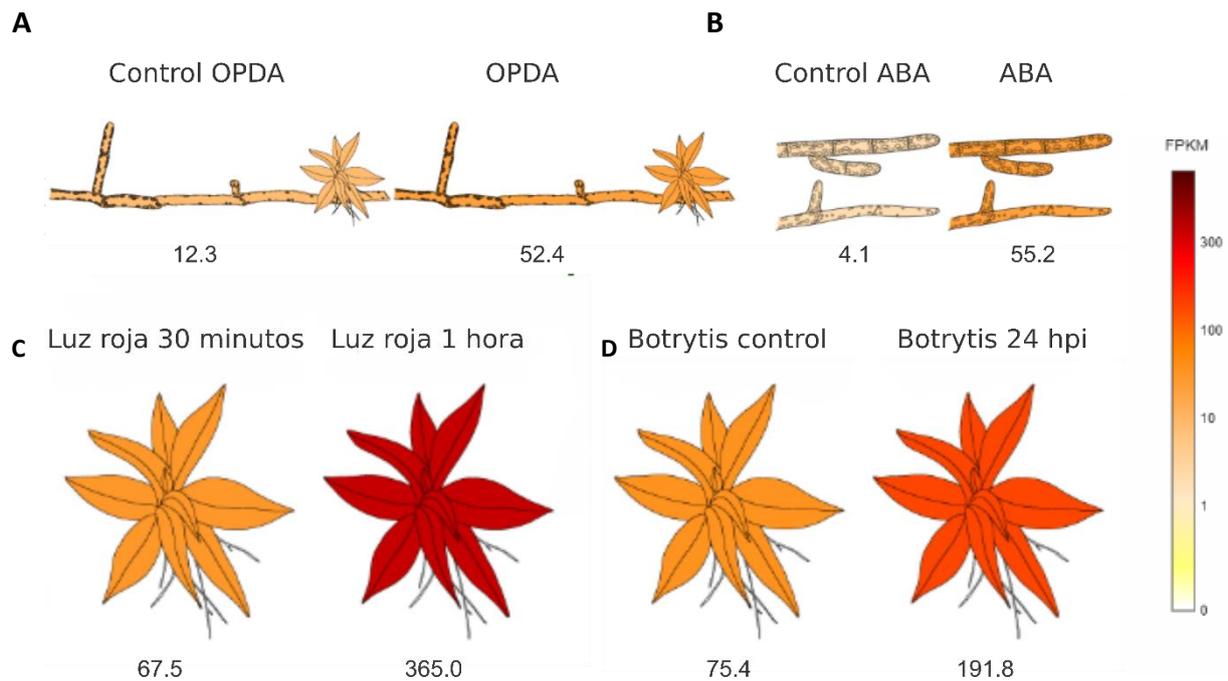


Figura 9: Expresión del gen *Pp214* en diferentes condiciones y tejidos de *P. patens* ecotipo Grandsen. A- Nivel de expresión del gen en tejido protonema con gametóforos ante un tratamiento de 6 horas con 50 μ M OPDA y su control en medio sólido BCDA. B- Expresión de *Pp214* en tejido protonema frente a un tratamiento de 24 horas con 50 μ M de la hormona ABA y su respectivo control. C- Expresión del gen a los 30 minutos y luego de una hora de exposición a luz roja. D- Expresión de *Pp214* a las 24 horas post infección con esporas de *B. cinerea* y su respectivo control. Datos tomados del PEATmoss atlas (Hiss et al., 2014; Perroud et al., 2018; Possart et al., 2017). Escala de colores de 0 a 500 FPKM y valores de expresión de cada figura en FPKM.

Se registraron a su vez los tres genes con valores de correlación más altos en relación a la expresión de *Pp214* en los datasets mencionados en la figura 9. Para los datos de RNA-seq de tratamientos de protonema se encontró que los tres genes que comparten el partón de expresión con *Pp214* son una esterasa (Pp3c19_9000V3.1), una DNA J (Pp3c19_10460V3.1) y una catecol oxidasa (Pp3c24_11260V3.1). Para los datos obtenidos a partir de diferentes tratamientos en gametóforos se vio que los tres genes con mayores valores de correlación eran dos genes que codifican para la enzima PAL (Pp3c1_18940V3.1 y Pp3c1_18830V3.1) y una snrk1-interacting protein 1 (Pp3c1_32560V3.1) con valores de correlación de 0.96 las dos PALs y 0.94 la última (figura suplementaria 1). Se sabe por datos del laboratorio no publicados que estos seis genes presentan una inducción similar a la de *Pp214* a las 8 y 24 horas post inoculación (hpi) con esporas de *B. cinerea* en tejidos de protonema y gametóforos.

7.4 Elementos regulatorios en cis presentes en el promotor de *Pp214*

Se identificaron 79 elementos regulatorios presentes en la región promotora de *Pp214* utilizando el programa plantCARE (Lescot et al., 2002). Para esto se tomó como región promotora del gen los 1500 pb corriente arriba del inicio de transcripción. Como se puede

apreciar en la tabla 2, estos elementos participan de respuestas asociadas a la luz (6), bajas temperaturas (1), a activación por hormonas como ABA (4), Me-JA (3), giberelinas (1) y auxinas (1), asociadas a patógenos (8), al inicio de la transcripción (37), pueden ser específicas de tejido (4), o con varias funciones posibles (14). Dichas secuencias tienen un largo de entre 4 y 11 nucleótidos, no siendo tomadas en cuenta aquellas que presentaban un largo menor dada su probabilidad intrínseca de ser encontradas por azar. El elemento más largo encontrado corresponde a chs-CMA2b, el cual es de respuesta lumínica y es el segundo más próximo al inicio de transcripción luego del otro elemento que comparte el mismo estímulo y sentido en la hebra, Sp1.

Tabla 2: Elementos de respuesta en cis dentro del promotor de *Pp214*. Se presentan los 79 elementos reguladores encontrados según su función, su abundancia, secuencia, posición en la hebra sentido o anti sentido y distancia desde el inicio de la transcripción de *Pp214*. El asterisco * está colocado en elementos que están repetidos en más de 16 posiciones.

Función	Elemento en cis	N°	Secuencia	Hebra	Posición
Respuesta a ABA	ABRE	4	ACGTG y TACGTGTC	-	756, 828, 1011, 1013
Respuesta a auxinas	Elemento- TGA	1	AACGAC	-	1077
Respuesta a giberelinas	Motivo- GARE	1	TCTGTTG	-	1247
Respuesta a Me-JA	Motivo-CGTCA	3	CGTCA	+, -	327, 442, 1495
Transcripción	CAAT-box	18	CAAT, CAAAT	+, -	*
	TATA-box	19	ATATAT, TATA, TATAAA, TATATA	+, -	*
Defensa frente a patógenos	W box	3	TTGACC	+, -	569, 646, 1124
	WRE3	5	CCACCT	+, -	417, 1149, 1180, 1404, 1454
Respuesta a la luz	As-1	3	TGACG	+, -	327, 442, 1495
	Box II	1	ACACGTAGA	+	1012
	Sp1	1	GGGCGG	+	28
	Chs-CMA2b	1	GAACCTACACAC	+	85
Temperatura	LTR	1	CCGAAA	-	1232
Específica de tejido	As-1	3	TGACG	+, -	327, 442, 1495
	CAT-box	1	GCCACT	-	1223
Varias funciones posibles	MYC	1	CATGTG	-	908
	MYB	3	CAACAG	+	307, 520, 1247
	MYB	3	CAACCA	+, -	276, 330, 353
	MYB	1	TAACTG	-	183
	STRE	3	AGGGG	+, -	301, 491, 1113
	Unnamed__1	2	CGTGG	-	333, 642
	Unnamed__2	1	AACCTAACCT	+	914

Se observó que los elementos de respuesta a ABA, auxinas y giberelinas están en su mayoría lejos del inicio de transcripción y ubicados en la hebra antisentido (8 de 9). Los elementos que destacan por su alta abundancia son los relacionados a funciones de transcripción como las cajas CAAT (18 repetidos) y TATA (19 repetidos). Las primeras son un elemento muy común en regiones promotoras y potenciadoras, y las segundas un elemento esencial de los promotores eucariotas que se encuentra alrededor de la posición -30 del inicio de la transcripción.

Se llevó a cabo otra búsqueda complementaria de elementos regulatorios en cis de esta región en la base de datos New PLACE (Higo et al., 1999). En esta se encontraron 356 elementos que incluyen a los 79 del programa plantCARE y agrega elementos a regiones que llamaron la atención por su composición de nucleótidos y no fueron reconocidas en la primera búsqueda. Un ejemplo de estas regiones de composición peculiar son repetidos "GA" de 38 nucleótidos de largo a los 800 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción que están relacionados a proteínas de unión a elementos GAGA. Esta búsqueda también permitió enriquecer el número de sitios encontrados para MYB y MYC (16 nuevos sitios para cada uno) y WRKY (10 sitios), TFs ampliamente estudiados y relacionados a respuestas mediadas por hormonas y que en datos de RNAseq de nuestro grupo se inducen en tejidos de *P. patens* inoculados con *B. cinerea* (datos no publicados).

7.5 Análisis de la localización subcelular de Pp214

Se amplificó la secuencia codificante para *Pp214* a partir de ADN genómico de *P. patens* (Figura 10 A) y se clonó en el plásmido pDONR223 (Figura 10 B). Una vez corroborada su secuencia, se procedió a clonar *Pp214* en el vector final de expresión pMDC83 (Figura 10 C).

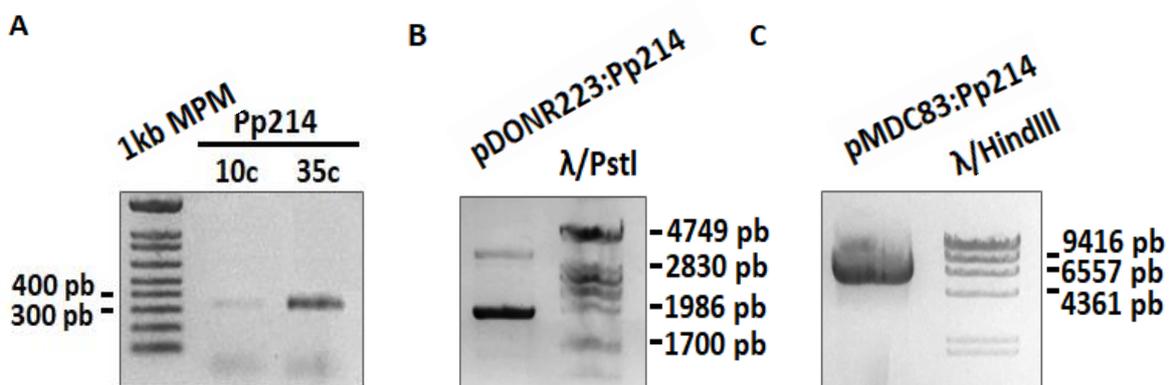


Figura 10: Amplificación y clonado del gen *Pp214*. A- Amplificación de la secuencia codificante del gen *Pp214* a partir de ADN genómico extraído de *P. patens* utilizando la enzima Phusion High Fidelity. Se cargó en el segundo y tercer carril una alícuota proveniente del ciclado inicial (10 ciclos) y final (35 ciclos) respectivamente. B-

Comprobación del tamaño esperado de la construcción pDONR223:*Pp214*. C- Construcción final utilizada para la transformación de *N. benthamiana*. Geles de agarosa 1% teñidos con BrEt. Tamaños esperados de 365, 3363 y 11364 pares de base respectivamente.

Se puede observar en la figura 10 A como la técnica de clonado de Gateway genera en un primer paso una amplificación de baja magnitud que se visualiza como una banda tenue en el gel de agarosa, para luego de agregados los oligonucleótidos adaptadores attB1 y 2 amplificar exponencialmente y con éxito la secuencia de interés. Dado que la secuencia codificante para *Pp214* está compuesta por 306 pares de bases, si se compara con el marcador de peso molecular utilizado en la electroforesis, la banda obtenida posee el tamaño esperado. El producto de amplificación fue clonado exitosamente en el plásmido pDONR223 (figura 10 B). Se puede apreciar la presencia de dos bandas en el gel atribuidas a dos conformaciones en las que se encuentra el plásmido naturalmente. La colonia de *E. coli* seleccionada para realizar la purificación del plásmido dio positiva para una PCR de colonia utilizando oligonucleótidos complementarios a la secuencia codificante de *Pp214* (datos no mostrados).

Por último y aprovechando la simplicidad del sistema Gateway, se transfirió por recombinación la secuencia de interés al plásmido de expresión final. Este plásmido es de mayor tamaño (figura 10 C) y cuenta con dos copias adyacentes del promotor de expresión fuerte en plantas 35S. También agrega la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente en fase con el extremo C-terminal de la secuencia codificante de *Pp214*. Su presencia y fase fueron confirmadas por secuenciación.

La construcción pMDC83-*Pp214* fue introducida en la bacteria *A. tumefaciens*, la cual fue utilizada para transformar transitoriamente hojas de *N. benthamiana*. A los tres días post agro-infiltración se cortaron trozos del material vegetal de la zona de infiltración que fueron visualizados en busca de señal fluorescente emitida por la GFP utilizando el láser 488nm y objetivo de agua 63x del microscopio confocal Leica TCS SP5 (Figura 11). Se registró también la señal proveniente de los cloroplastos y se documentó el estado del tejido por luz transmitida (figuras 11 B-D).

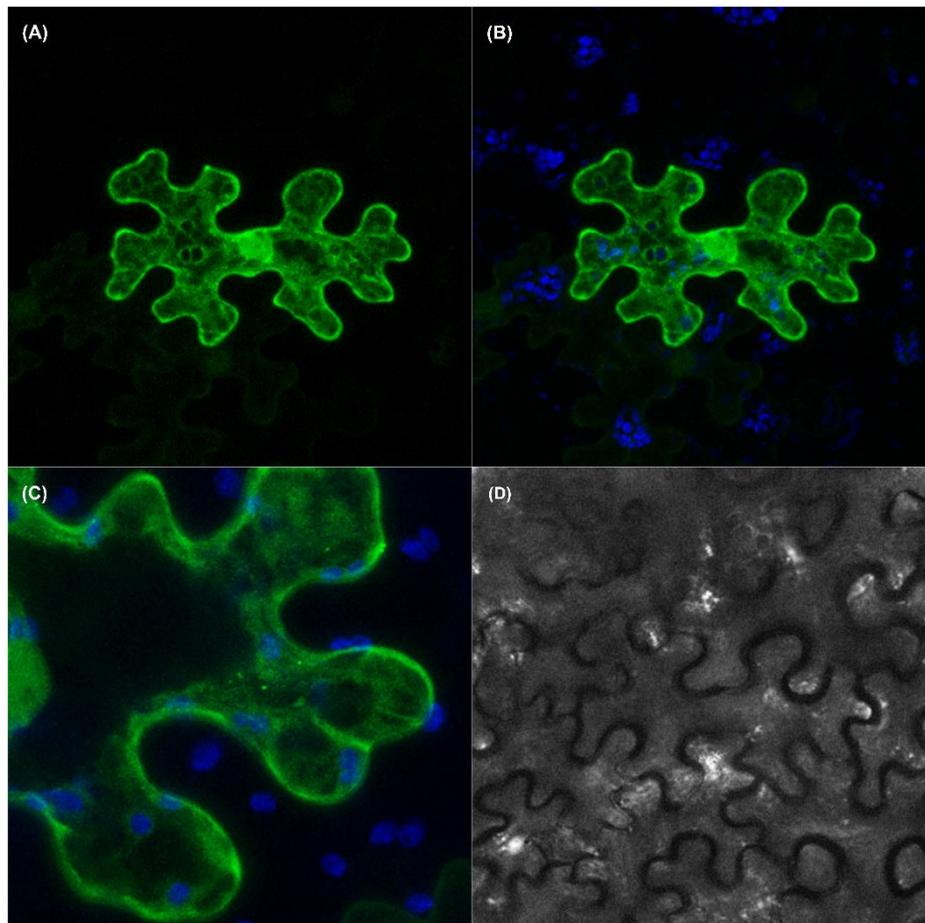


Figura 11: Localización subcelular de la proteína de fusión Pp214-GFP en hojas de *N. benthamiana*. A- Señal fluorescente detectada dentro de células transformadas de *N. benthamiana* en el eje Z. B- Superposición de planos en los que se muestra la señal emitida por Pp214-GFP y aquella intrínseca emitida por los cloroplastos de las células. C-Imagen de una célula vegetal transformada a mayor aumento con presencia de cloroplastos. D- Imagen tomada en campo claro. Señal emitida por Pp214-GFP en verde, cloroplastos en azul, luz transmitida en gris. Se utilizó el objetivo 63x del microscopio con focal Leica TCS SP5 del CNB.

Se detectó señal fluorescente tanto en el núcleo celular como en el citosol de las células transformadas. Se aprecia una distribución uniforme en el citosol con una presencia levemente mayor en los bordes e inmediaciones del núcleo. Se puede ver como la señal rodea a los cloroplastos coloreados en azul presentes en el interior de ésta (figura 11 B y C).

Se extrajeron las proteínas totales de hojas de *N. benthamiana* agro infiltradas a las 24, 48 y 72 hpi. Estas proteínas fueron cuantificadas y cargados 2 μg en un gel de poliacrilamida 12%. Posteriormente se realizó la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa donde se comprobó la integridad de las muestras tiñendo dicha membrana con una solución de Rojo Ponceau.

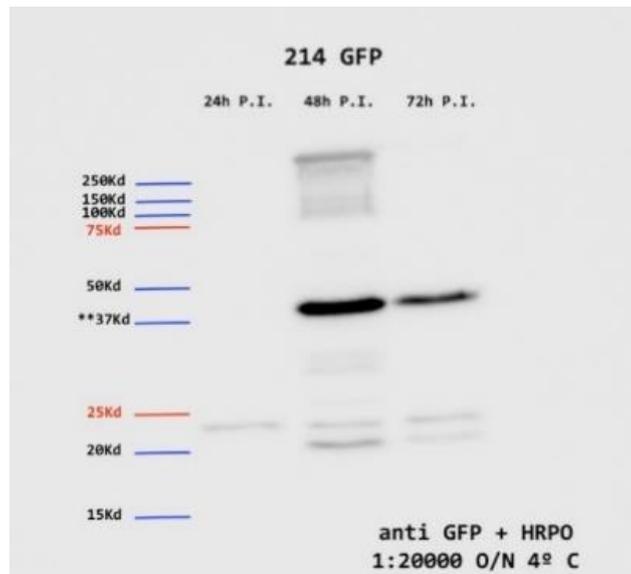


Figura 12: Producción de la proteína de fusión Pp214:GFP en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. Western blot cuyos tres carriles fueron cargados con proteínas extraídas de hojas de *N. benthamiana* agro infiltradas a las 24, 48 y 72 horas post infiltración. Se indica con asteriscos el tamaño teórico esperado para la proteína de fusión. El anticuerpo utilizado es anti-GFP en concentración 1:20000.

Se observa en la figura 12 la presencia de una banda de peso levemente superior a 37 kDa que se induce a las 48 horas post infiltración (hpi) y que disminuye su abundancia al cabo de 72 hpi. Dado que la GFP tiene un peso molecular de 27 kDa y el peso teórico de Pp214 es de casi 11 kDa, la suma de ambos pesos moleculares es de 38 kDa. Este es el peso molecular correspondiente a la banda proteica de alta abundancia en las muestras extraídas a las 48 y 72 hpi, y ausente en la muestra 24 hpi. La cinética de producción nos indica que la proteína demora más de 24 horas en ser sintetizada en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, alcanzando su pico de producción a las 48 hpi (momento propicio para realizar el estudio) y disminuyendo a las 72 hpi. Estos resultados demuestran que la proteína Pp214 se localiza principalmente en el citoplasma.

7.6 Generación de líneas de *Physcomitrium patens* que sobre-expresan Pp214

Previo a la transformación de protoplastos de *P. patens* se linealizaron 20 µg del vector pTHUbi-Pp214 mediante digestión con la enzima *SwaI* y se corroboró su digestión completa como se muestra en la figura 13 A.

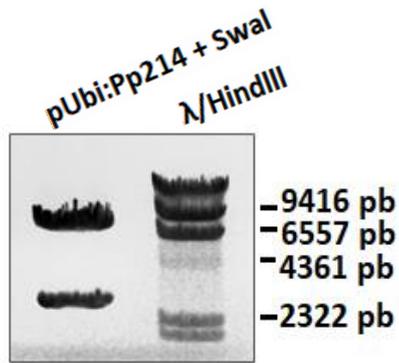
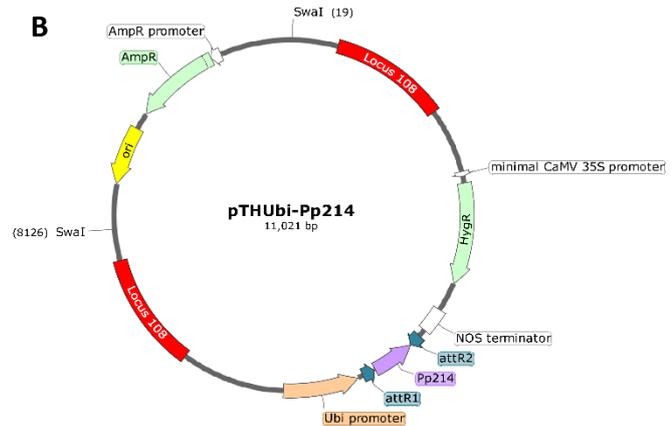
A**B**

Figura 13: Digestión del vector pUbi:Pp214 con la enzima de restricción *SwaI*. A- Cuantificación y comprobación de la completa digestión y tamaño esperado de los fragmentos. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular corresponde a lambda DNA digerido con la enzima de restricción HindIII. B- Vector pTHUbi-Pp214 utilizado. Se marcan en rojo las regiones del locus 108 de *P. patens*, los dos sitios de corte para *SwaI*, el promotor de *ubiquitina*, los sitios de recombinación utilizados por el sistema Gateway, la secuencia del gen en estudio y la secuencia codificante para la enzima higromicina B fosfotransferasa.

Luego de la digestión se liberaron dos fragmentos, siendo el de mayor tamaño el de interés que fue posteriormente purificado para llevar a cabo la transformación de protoplastos de *P. patens*. Dicho fragmento está compuesto por la secuencia codificante para el gen *Pp214*, el promotor ubiquitina tomado de maíz y la enzima higromicina B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia al antibiótico higromicina que permite la selección de los clones transformantes flanqueados por las dos regiones comprendidas por la secuencia del locus 108 de *P. patens*. El fragmento purificado fue utilizado para la transformación de protoplastos, la cual se realizó por duplicado con posterior selección de las líneas transformantes. Se obtuvieron 71 eventos independientes de transformación, los cuales fueron transferidos individualmente a placas con el medio BCDTA y cultivados en condiciones normales de crecimiento (figura 14). Se corroboró que transcurridos 6 meses las colonias seguían siendo resistentes al antibiótico en medio BCDTA con el antibiótico higromicina en concentración 25 µg/mL.

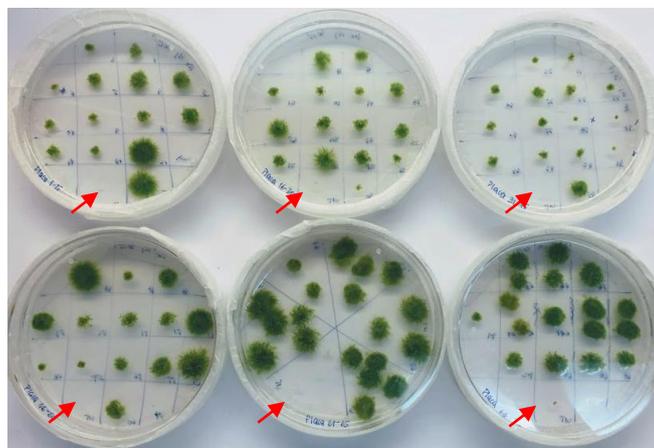


Figura 14: Crecimiento de clones sobre-expresantes de *Pp214* en el medio BCDTA suplementado con el antibiótico higromicina (25 µg/mL). Se incluyó en cada placa una muestra de tejido de genotipo salvaje, incapaz

de crecer en presencia del antibiótico (sección inferior izquierda en todas las placas señalada con una flecha roja).

Como se observa en la figura 14, los diferentes clones presentaron tasas de crecimiento diferentes entre ellos en medio con el antibiótico. Sin embargo, luego de las rondas de selección y en medio sin antibiótico, las tasas de crecimiento eran muy similares entre la mayoría de ellos. Se seleccionaron varios clones que poseían tasas parecidas a las presentadas por colonias de genotipo salvaje y se multiplicaron para los siguientes ensayos.

7.6.1 Caracterización de las líneas sobre-expresantes de *Physcomitrium patens*

Se seleccionaron 5 líneas que sobre-expresan *Pp214* para ser analizada su ploidía en relación a la ploidía del genotipo Gransden salvaje. Esto fue necesario dado que el proceso por el cual se generan los protoplastos incrementa la probabilidad de obtener eventos de fusión de células, generando productos diploides que deben ser descartados dada su diferencia con el musgo salvaje (Schween et al., 2005)(figura 15)

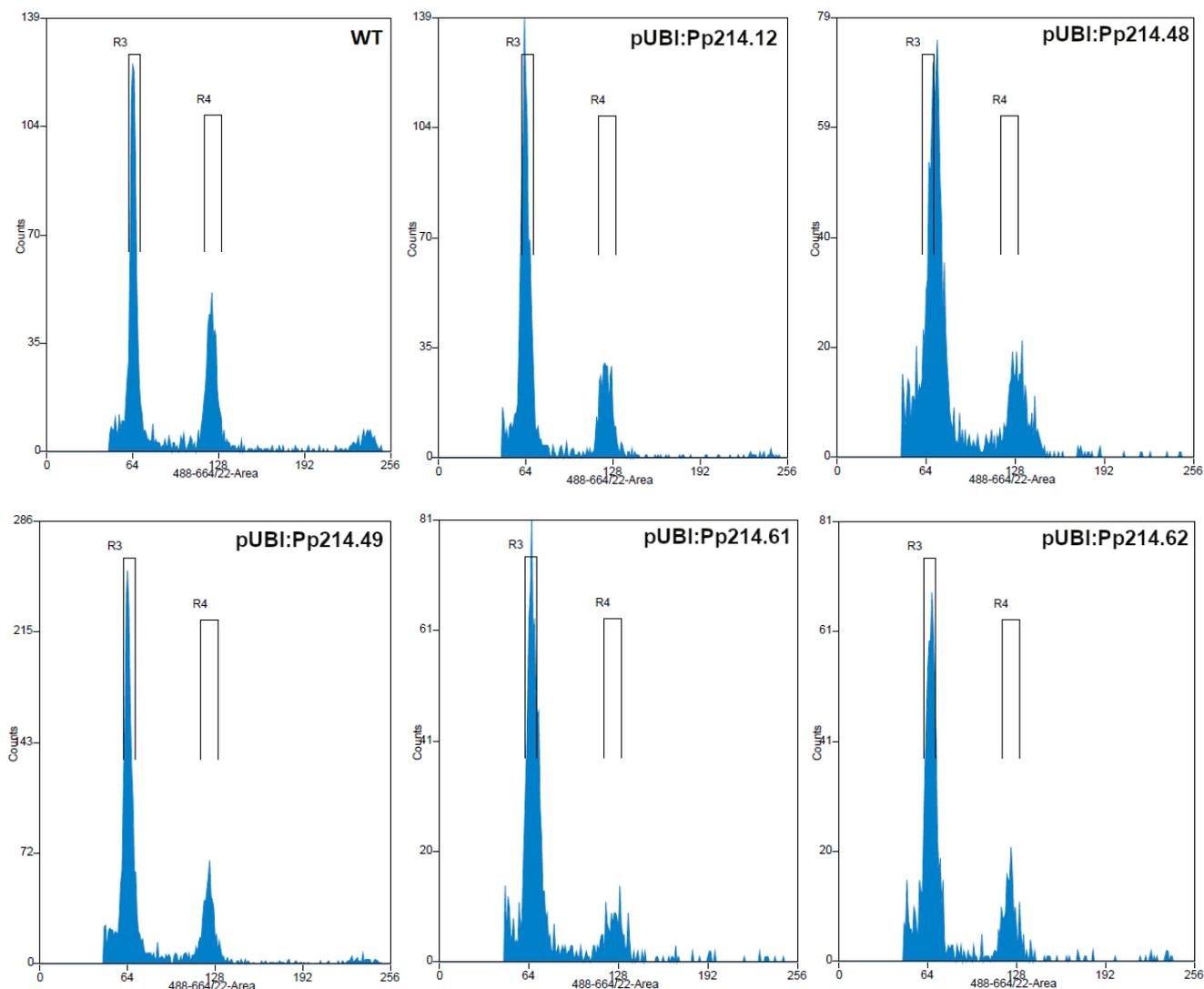


Figura 15: Ploidía relativa de colonias de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes. Histogramas obtenidos por citometría de flujo de células provenientes de muestras de genotipo salvaje (Wt) y pUBI:Pp214.12, 48, 49, 61 y 62. Se grafica el número de células respecto a la cantidad de ADN que éstas poseen.

Se observa en la figura 15 los 6 histogramas obtenidos por citometría de flujo correspondientes a muestras de genotipo Gransden salvaje y 5 líneas sobre-expresantes para *Pp214*. Se analizaron entre 1590 y 4769 células por muestra en un equipo MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF-IIBCE). En cada uno de los histogramas se observan dos picos bien definidos, uno correspondiente a una cantidad de ADN de 64 (pico de mayor altura) y otro más pequeño en la posición 128 (menor altura). Dado que todos los diagramas presentan la misma distribución se tomaron a las 5 líneas de *P. patens* como sobre-expresantes haploides.

Se observó detalladamente la morfología de las diferentes líneas sobre-expresantes pUBI:Pp214.12, 48, 49, 61 y 62 de *P. patens* en relación a la observada en plantas salvajes haciendo énfasis en la tasa de crecimiento, morfología de las colonias, gametóforos, rizoides, tejido protonema y hojas. Todas las líneas analizadas presentaron una tasa de crecimiento similar a la del genotipo salvaje (motivo inicial de su pre-selección), y la morfología de las

colonias fueron muy similares entre ellas y el genotipo salvaje a excepción de una sola línea (pUBI:Pp214.61) (figura 16). Se observó en esta línea un crecimiento tipo botón, en el cual se generó una acumulación de tejido compacto en el centro de cada colonia. pUBI:Pp214.61 presentó a su vez un desarrollo en el que predominaba el estadio de protonema cuando sus colonias eran crecidas sobre placas de medio BCDAT sólido sobre celofán. Por este motivo se decidió dejar de usar esta línea en los estudios posteriores.

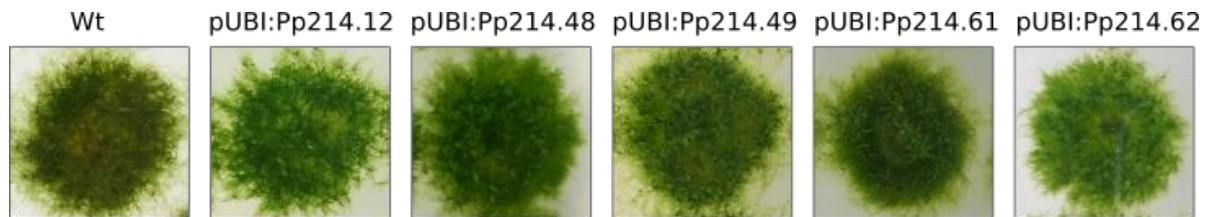


Figura 16: Morfología de colonias de *P. patens* creciendo sobre medio BCDTA con celofán. Se observa un tamaño similar entre todas las colonias de las diferentes líneas en estudio menos en la colonia perteneciente a la línea pUBI:Pp214.61.

Las colonias de las líneas sobre-expresantes pUBI:Pp214.12, 48, 49 y 62 presentaron una morfología igual a las de genotipo salvaje (figura 17). Lo mismo se observó al tomar fotos de tejido protonema, gametóforos y hojas, por lo que se seleccionó a pUBI:Pp214.12, 48 y 62 para los experimentos posteriores. Se concluyó por lo tanto que la sobre-expresión de *Pp214* en *P. patens* no produce una alteración en el desarrollo normal de sus tejidos.

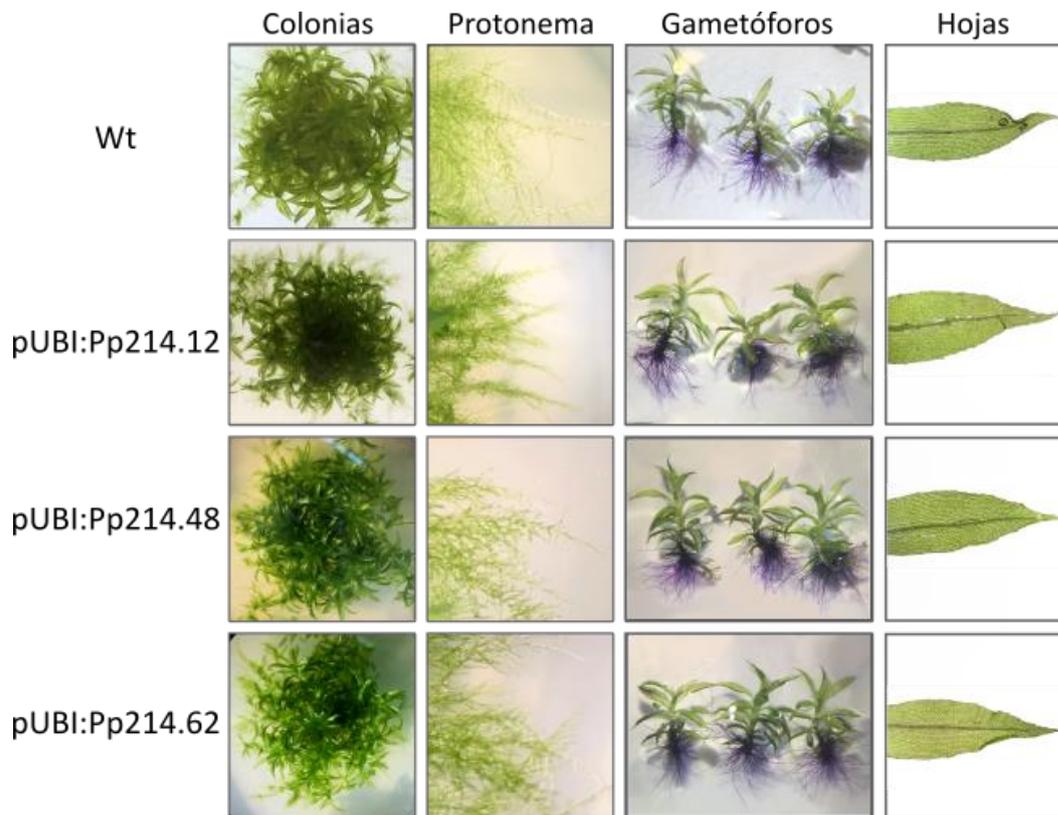


Figura 17: Morfología de colonias, protonema, gametóforos y hojas de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes para *Pp214*. Crecimiento sobre medio BCDAT sin celofán. Las imágenes de colonias, protonema y gametóforos fueron tomadas en una lupa y las de hojas en un microscopio. La tinción de los rizoides se realizó con el colorante azul de toluidina al 0.5%.

7.7 Niveles de expresión de *Pp214* en líneas sobre-expresantes de *P. patens* comparado con el genotipo salvaje

Se extrajo el ARN total de colonias de 3 semanas de crecimiento en condiciones normales utilizando 4 placas por genotipo (Wt, pUBI:Pp214.12, pUBI:Pp214.48 y pUBI:Pp214.62). Se midió su concentración en un espectrómetro NanoDrop 2000 y se comprobó posteriormente su integridad en un gel de agarosa 1% (figura 18).

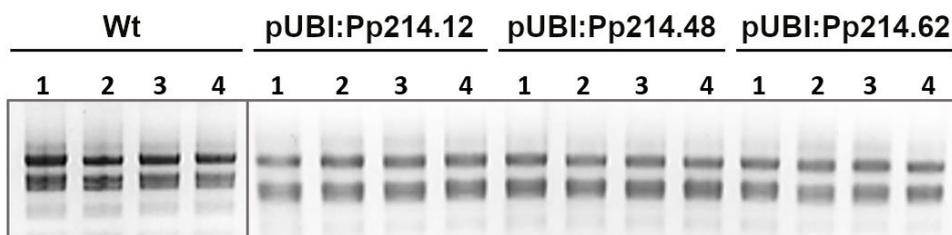


Figura 18: Integridad de las muestras de ARN. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con 2 µg de ARN de muestras de plantas de genotipo salvaje, pUBI:Pp214.12, pUBI:Pp214.48 y pUBI:Pp214.62 teñidas con BrEt. Se trabajó con cuatro réplicas biológicas de cada genotipo.

Se observa en la figura 18 una distribución e intensidad equivalente de bandas correspondientes al ARN ribosomal. Una vez comprobada la integridad de las muestras se procedió a realizar la retro-transcripción. Se llevó a cabo un primer paso de retro-transcripción del ARN extraído de muestras provenientes de plantas de genotipo salvaje y pUBI:Pp214.12, 48, 62, utilizando a su vez muestras del laboratorio correspondientes a condiciones de infección de colonias de *P. patens* de genotipo salvaje por el patógeno *B. cinerea* a dos tiempos diferentes (4 y 24 hpi) con sus respectivos controles (agua).

Los ADN copia generados fueron utilizados como molde para la amplificación de manera cuantitativa de los genes *Pp214*, *PpUbi-2* y *PpPAL-1*. Se utilizaron los niveles de expresión de *PpUbi-2* (gen house-keeping) como referencia y los de la *PpPAL-1* como control de una infección exitosa en muestras de genotipo salvaje con infección por el hongo *B. cinerea*. Se calculó la eficiencia del par de oligonucleótidos utilizados para amplificar *Pp214* utilizando ADN genómico como molde (figura S2).

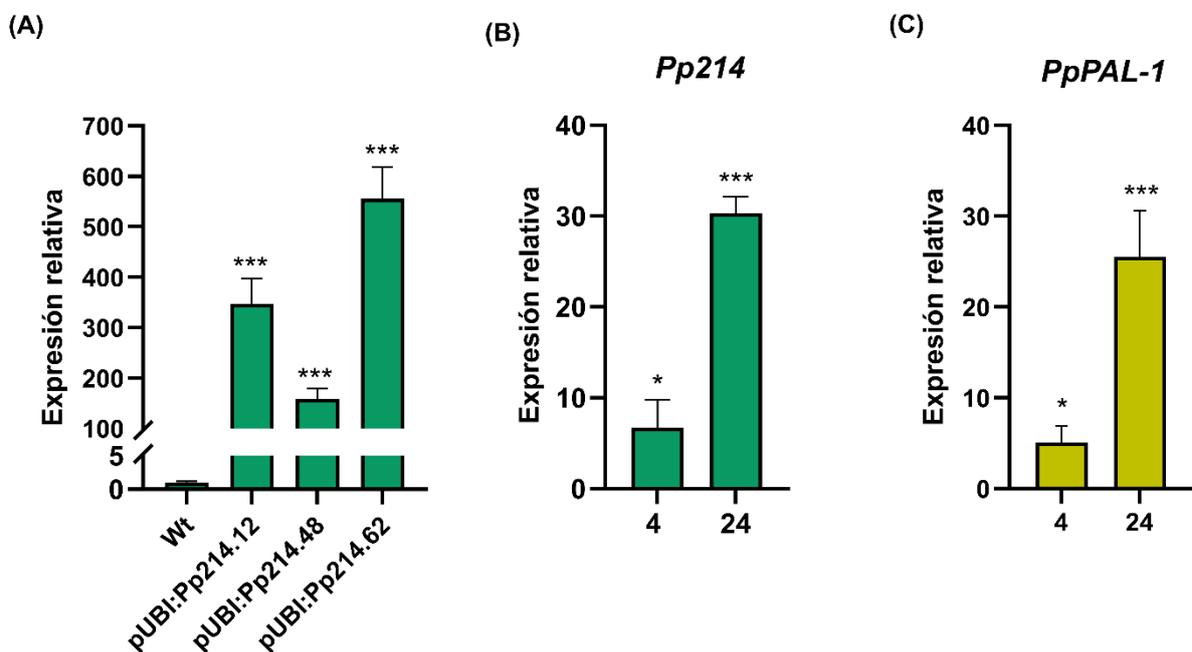


Figura 19: Niveles de expresión relativa a *PpUbi-2* de los genes *Pp214* y *PpPAL-1* en tejidos de plantas de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes. A- Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión relativa del gen *Pp214* en plantas de genotipo salvaje (Wt) y las líneas sobre-expresantes pUBI:Pp214.12, 48 y 62 respecto al gen de referencia *PpUbi-2*. B y C- Niveles de expresión de *Pp214* y *PpPAL-1* relativos a *PpUbi-2* en plantas de genotipo salvaje infectadas con esporas del hongo *B. cinerea* a las 4 y 24 hpi. Se utilizó agua como control en cada caso. Cada punto es el valor promedio de 3 o 4 réplicas biológicas. Se aplicó el test de Student para determinar la significancia estadística de cada punto (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Los niveles basales de expresión del gen *Pp214* en las líneas sobre-expresantes pUBI:Pp214.12, 48 y 62 son 346.6, 158.5 y 555.5 veces mayores (respectivamente) a los encontrados en condiciones normales en plantas de genotipo salvaje (figura 19 A). Por otro lado, se estudiaron los niveles de expresión del *Pp214* y *PpPAL-1* alcanzados en estas plantas

en condiciones de infección con esporas del patógeno *B. cinerea* a las 4 y 24 horas (figura 19 B y C). Se puede observar como la expresión de *Pp214* aumenta casi 7 veces a las 4 horas y 30 veces pasadas las 24 horas, mientras que el aumento es de 5 y 25 veces para *PpPAL-1*. La expresión se expresa en todos los casos relativa al gen de referencia *PpUbi-2* en cada situación control. Se tomaron como muestras control ARN obtenido de colonias de genotipo salvaje sin tratamiento para la figura 19 A, y muestras de genotipo salvaje tratadas con agua a las 4 y 24 horas para las figuras 19 B y C. Estos resultados muestran que se obtuvieron transformantes con altos niveles de expresión de *Pp214* de manera constitutiva.

7.8 Respuestas de las líneas de *P. patens* que sobre-expresan *Pp214* y plantas salvajes frente a diferentes patógenos

Se evaluó la susceptibilidad de las líneas sobre-expresantes pUBI:*Pp214*.12, 48 y 62 frente a los oomycetes *P. irregulare* y *P. debaryanum*, patógenos capaces de infectar tejido de *P. patens* (Oliver et al., 2009)(figura 20). Se utilizaron para este ensayo 96 colonias por línea, 32 por cada uno de los 3 tratamientos (control, micelio de *P. irregulare* y de *P. debaryanum*).

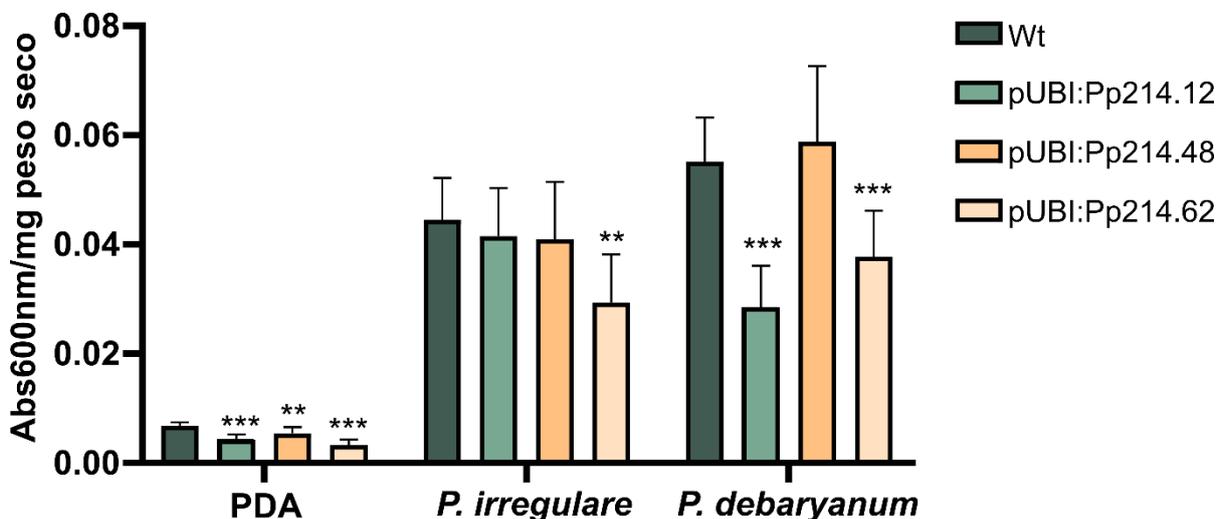


Figura 20: Daño celular provocado por los oomycetes *P. debaryanum* y *P. irregulare*. Niveles de daño en colonias de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes pUBI:*Pp214*.12, 48 y 62. Se expresan los resultados en Abs600nm/mg de peso seco de las colonias. Se realizaron múltiples tests de Student para determinar la significancia estadística de los datos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). La tinción se realizó con el colorante azul de Evans. El ensayo fue repetido 2 veces con resultados similares.

Se obtuvieron valores parejos y con poco desvío para los tratamientos control con PDA en todas las líneas. En el caso de *P. irregulare*, el cual es menos agresivo que *P. debaryanum*, se mantuvieron los niveles de daño similares entre colonias de genotipo salvaje y las líneas sobre-expresantes PpUBI:*Pp214*.12 y 48. La línea PpUBI:*Pp214*.62, la cual acumula mayores niveles de transcriptos de *Pp214*, fue la única línea que presentó menores niveles de daño frente a este patógeno en comparación con plantas salvajes. Para *P. debaryanum* se

obtuvieron niveles de daño similares entre el genotipo salvaje y PpUBI:Pp214-48 siendo significativamente menores para las líneas PpUBI:Pp214-12 y -62. Estas dos últimas líneas presentan mayores niveles de expresión de *Pp214* que la línea PpUBI:Pp214-48.

Además de realizar infecciones con las especies de *Pythium* antes mencionadas, se decidió utilizar el hongo *P. cucumerina* dado que presenta un estilo de colonización de los tejidos diferente. Se sabe que éste es capaz de alternar entre un tipo de colonización hemibiótrofa o necrótrofa según la concentración de inóculo utilizado y la distribución de éste en los tejidos (Pétriacq et al., 2016). A su vez, presenta la ventaja de que su colonización es más lenta en el tiempo, permitiendo observar con mayor detalle los síntomas presentados.

Primero se analizó si este hongo es capaz de infectar *P. patens*. Para esto se inocularon colonias del musgo de tres semanas de crecimiento en medio BCDTA sobre celofán con una suspensión de esporas de concentración 5×10^5 esporas/mL. Se observaron los síntomas a los tres días post inoculación en una lupa y en el microscopio de epifluorescencia Olympus BX61. Luego de transcurridos los tres días de infección, las colonias que habían estado en contacto con el patógeno presentaron una disminución en su tasa de crecimiento junto con un amarronamiento general del tejido, especialmente el protonema, como se muestra en la figura 21 A. Los gametóforos se mantuvieron verdes por un periodo mayor de tiempo, tomando su base y rizoides un color rojizo (figura 21 B). Fue posible detectar hifas del patógeno creciendo sobre tejido protonema en colonias infectadas, aunque no se observaron procesos que evidencien muerte celular o la redistribución subcelular de cloroplastos en las hojas (figura 21 C). Mediante tinciones con el colorante Safranina-0 se pudo observar un reforzamiento de la pared celular con compuestos fenólicos en las células de hojas de gametóforos infectados (figura 21 D), aunque no se pudo correlacionar con una gran cantidad de patógeno proliferando en esa zona. Se realizaron tinciones con el colorante Solofenil – flavine para evidenciar la presencia de hifas del hongo en los tejidos, y en estos casos se vio que si bien las hifas se extendían sobre los tejidos, al observar éstos en campo claro no se veían lesiones o compartimentos celulares vacíos. Luego de dos semanas de infección, las colonias de *P. patens* infectadas con la suspensión de esporas del hongo aparecían totalmente cubiertas por el micelio de éste pero mantenían su coloración verde en los gametóforos, sugiriendo que si bien el hongo crecía sobre los tejidos, no le genera un daño al musgo que implique la muerte celular y disgregación de sus cloroplastos.

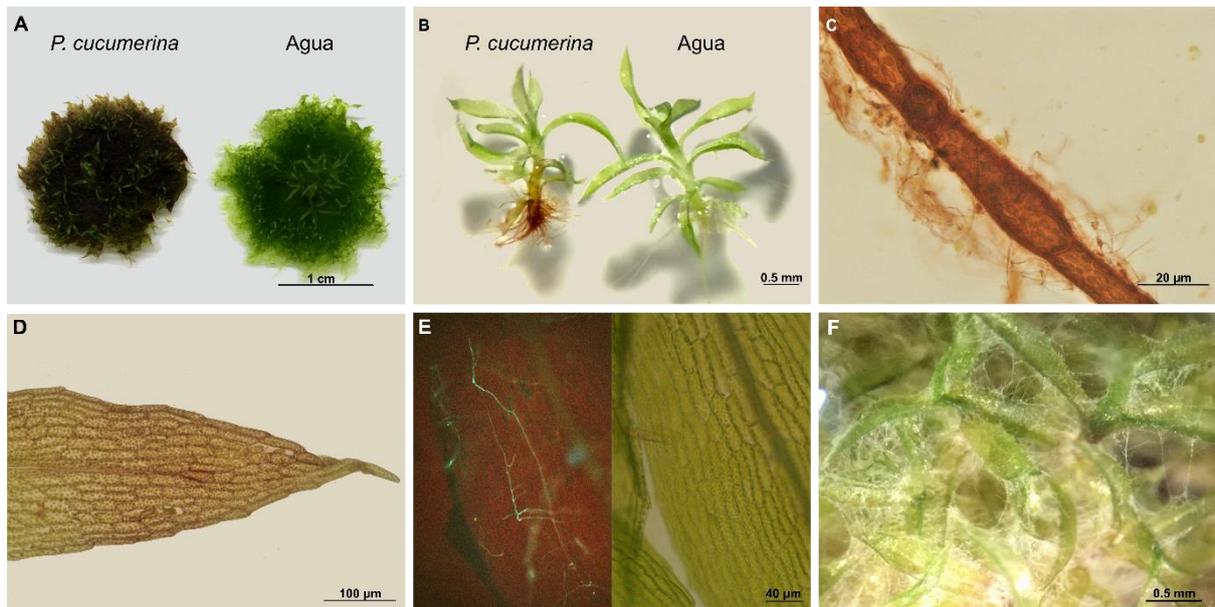


Figura 21: Desarrollo de la infección causada por *P. cucumerina* en tejidos de *P. patens*. Síntomas observados en diferentes tejidos provenientes de colonias de genotipo salvaje de *P. patens* frente a la infección por el hongo *P. cucumerina*. A- Imagen de colonias luego de 3 días de infección con una suspensión de 5×10^5 esp/mL del patógeno o agua (control). B- Gametóforos representativos de cada una de las condiciones mencionadas. C- Células de tejido protonema rodeadas de hifas del patógeno. D- Hoja tomada de un gametóforo infectado teñida con el colorante Safranina-O. E- Segmento de hoja en el que se evidencia el crecimiento de hifas del patógeno sobre la superficie del tejido pero no un daño dado por muerte celular local. Hifas del hongo teñidas con el colorante Solofenil-flavine. F- Gametóforos de *P. patens* cubiertos por hifas del hongo luego de dos semanas de crecimiento.

Paralelamente se realizaron tinciones del mismo tejido con el colorante Solofenil-flavine 7 gfe. Este permite teñir las estructuras del patógeno y seguir de esta manera su crecimiento y desarrollo sobre el tejido de *P. patens*.

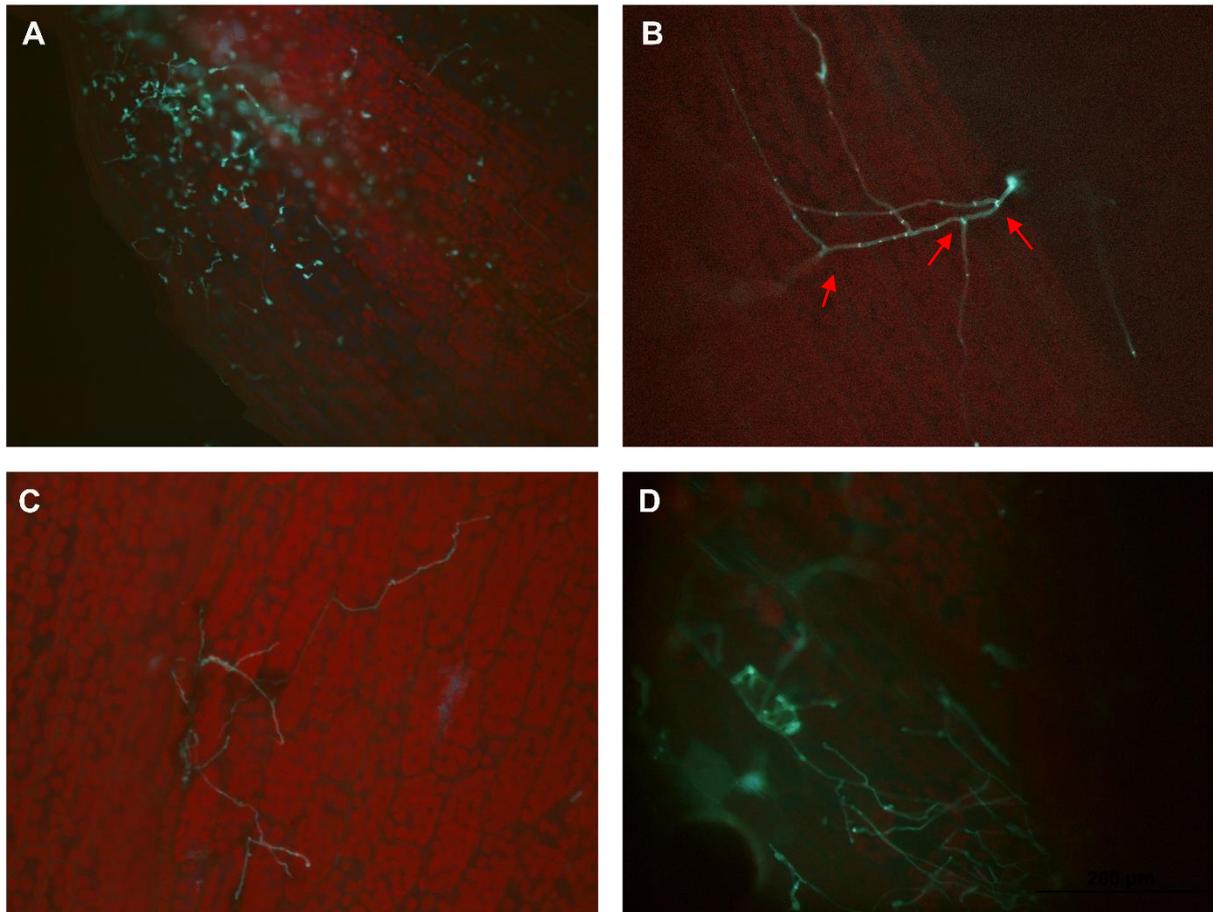


Figura 22: Progreso de la infección *P. cucumerina* sobre hojas de *P. patens*. Colonización del patógeno en tejidos del musgo de genotipo salvaje. A- Esporas del patógeno sobre hojas de gametóforos infectados. B- Germinación y bifurcación de hifas provenientes de una espora de *P. cucumerina* marcadas con flechas rojas. C- Avance de hifas del patógeno sobre o entre células de una hoja de *P. patens*. D- Crecimiento de hifas dentro de un compartimento celular. Tejido teñido con el colorante Solofenil-flavine 7 gfe. Imágenes obtenidas en el microscopio Olympus BX61.

Se observaron y documentaron las distintas etapas en la colonización del tejido. En una primera instancia se depositan las esporas sobre el tejido vegetal (figura 22 A). Luego se puede observar cómo estas esporas germinan y las hifas generadas se bifurcan repetidas veces en busca de puntos de contacto con el tejido vegetal (figura 22 B, flechas rojas). Estas hifas septadas avanzan entre o sobre células (figura 22 C) para colonizar el tejido y poder entrar, en las etapas finales de la infección, a compartimentos celulares (figura 22 D). Esto solo se observa en zonas con una gran cantidad de patógeno y tejido muy macerado.

Se trataron plantas salvajes y las líneas sobre-expresantes en *Pp214* con esporas de *P. cucumerina* y se realizaron ensayos de daño celular con el colorante azul de Evans. A pesar de realizar este ensayo similar a las infecciones con *Pythium*, los tejidos no se tiñeron con el colorante a pesar de haber un daño notorio de los mismos, por lo que no se pudo comparar la susceptibilidad de las diferentes plantas frente a este patógeno. Esto se puede deber a la forma de infección o al tipo de daño generado por este hongo.

7.9 Comportamiento de las líneas Pp214 sobre-expresantes y salvajes frente a estrés abiótico en *P. patens*

Con la intención de evaluar una posible contribución del gen *Pp214* a la respuesta de *P. patens* frente a condiciones de estrés abiótico, se simularon dos condiciones diferentes: estrés osmótico y salino. Para ello se expusieron colonias de 3 semanas en medio conteniendo D-manitol 0.9M y NaCl 0.5M (figura 23). En estos ensayos se crecieron las plantas de las diferentes líneas en la misma placa con el medio BCDTA utilizándose dos placas por tratamiento. El monitoreo de la recuperación se realizó hasta el día 19 en el tratamiento con D-manitol y hasta los 21 días en el de NaCl.

Para las colonias tratadas durante 10 días con D-manitol, se observó una pérdida de clorofila y secado de los tejidos durante el transcurso del tratamiento que llevó a la pérdida total de color a los 3 días de relajado el estrés. El comienzo de los signos de recuperación se observó a los 4 días post-relajación, apareciendo un halo verde de tejido protonema alrededor de gametóforos totalmente secos (figura 23, d4). Estos nunca se recuperan aunque el resto del tejido logra sobrevivir creciendo radialmente (figura 23, d11).

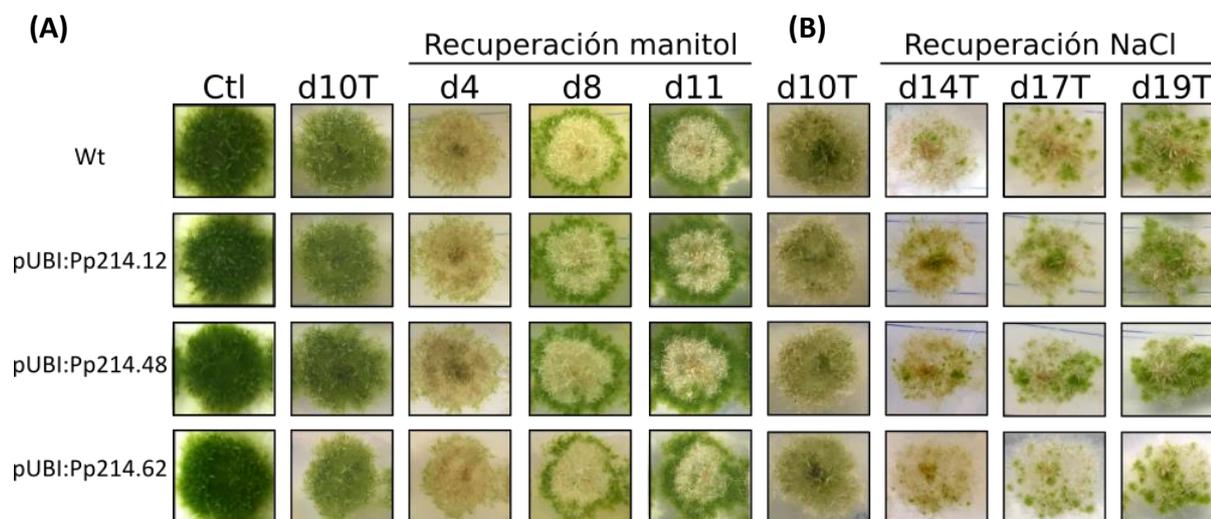


Figura 23: Respuesta de colonias de genotipo salvaje y sobre-expresantes frente a un estrés osmótico y salino. A- Recuperación de colonias luego de 10 días de crecimiento en medio suplementado con D-manitol 0.9M. Fotos tomadas el día que se relaja el estrés y a los 4, 8 y 11 días de recuperación. B- Recuperación de colonias de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes luego de 10 días de crecimiento en medio suplementado con NaCl 0.5M. Fotos tomadas el día que se relaja el estrés y a los 14, 17 y 19 días de recuperación. Experimentos llevados a cabo dos veces por duplicado. Las colonias de diferentes genotipos fueron crecidas en la misma placa. Ctl: control, d10T: día 10 de tratamiento, d4-19R: días 4 al 19 de recuperación, wt: genotipo salvaje, pUBI:Pp214.12, 48 y 62: líneas sobre-expresantes de *P. patens* para *Pp214*.

Respecto al tratamiento con NaCl 0.5M, el tejido pierde toda su clorofila durante los días posteriores a la relajación del estrés (1-10) y requiere más tiempo para recuperarse del

requerido para el tratamiento con D-manitol. La generación de tejido nuevo se da gracias a células aisladas que comienzan a dividirse y generar nuevos puntos verdes donde se multiplica el protonema y a partir de los cuales se recupera cada colonia (figura 23B, d14-19R). En ninguno de estos dos procesos de recuperación de un estrés osmótico y salino severo se observaron diferencias fenotípicas entre las colonias de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes de *Pp214*.

7.10 Respuestas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan *Pp214* y plantas salvajes frente a diferentes patógenos

Se realizaron ensayos de infección en plantas de *A. thaliana* con 3 microorganismos patógenos diferentes. El número de plantas analizadas fue diferente para cada ensayo. Las líneas B y M corresponden a plantas transgénicas sobre-expresantes para *Pp214*, detectándose en ambas niveles de expresión similares por RT-PCR semicuantitativa.

Para *P. syringae* DC3000 se llevaron a cabo 3 ensayos de infección en condiciones controladas. Se utilizaron plantas mutantes para la inducción de la vía del ácido salicílico (Sid-2) como control de infección. Estas plantas son más susceptibles a la infección por *Pst* DC3000, por lo que su recuento de colonias se hace en una dilución mayor a la utilizada para las líneas Col-0, B y M, actuando como control positivo.

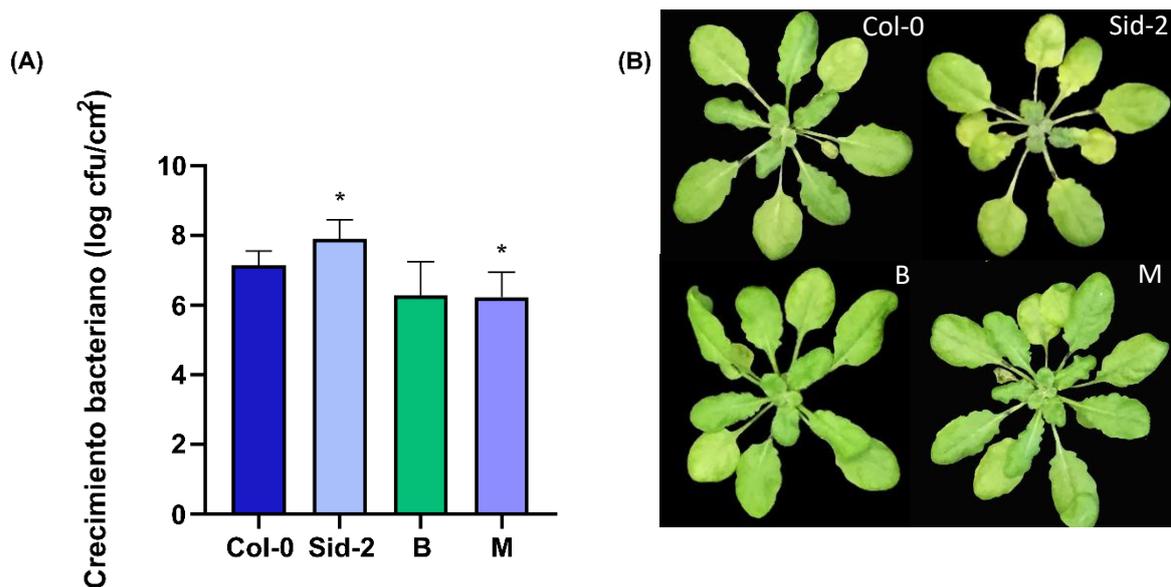


Figura 24: Respuesta de plantas de *A. thaliana* de genotipo Col-0, Sid-2 y las líneas sobre-expresantes B y M para *Pp214* frente a la infección por la bacteria *Pst* DC3000. A- Crecimiento bacteriano en hojas de *A. thaliana* luego de 72 horas de infección. El conteo de colonias se realizó en la dilución 10^{-4} . La inoculación se realizó con 5×10^7 cfu/mL de una suspensión de *Pst* DC3000. Se analizaron 5 plantas para Col-0, 10 para Sid-2 y B, y 9 para M. Se procesó un bocado de 3 hojas por cada planta. B- Imágenes del estado fenotípico de las plantas de *A. thaliana* de diferentes genotipos a las 72 horas post infección con *Pst*DC3000. (* $p < 0.05$).

Los datos obtenidos muestran que la mayor multiplicación bacteriana sucedió en plantas Sid-2 con valores de 7.9 log cfu/cm² (figura 24 A). En las muestras de genotipo Col-0 se obtuvo un recuento de 7.1 log cfu/cm² mientras que para las provenientes de plantas transformantes de *A. thaliana* para *Pp214* B y M se obtuvieron valores similares entre ellas y menores a los obtenidos para Col-0 (6.3 y 6.2 log cfu/cm² en promedio respectivamente). Si bien estos datos muestran diferencias significativas para la línea M, estos resultados no se vieron en las otras repeticiones del ensayo.

Se observa en la figura 24 B el estado fenotípico de las plantas al momento de sacar un bocado para ser analizado. Las plantas de genotipo Col-0, B y M permanecieron más verdes luego de tres días de infección, mientras que se observa un amarillamiento o pérdida de clorofila en aquellas hojas donde la infección fue más exitosa, como es el caso de plantas de genotipo Sid-2 (figura 24 B). También existe un retraso en el crecimiento de plantas que presentan mayor infección, generando plantas más pequeñas luego de tres días en contacto con la bacteria. Los resultados obtenidos no son concluyentes y sugieren que no hay un aumento de resistencia frente a *P. syringae* DC3000 por efecto de la sobre-expresión de *Pp214*.

La infección con esporas de *P. cucumerina* se llevó a cabo según lo descrito en el punto 7.11.2. Se siguió el progreso de las lesiones durante 16 días, tomando medidas del diámetro de lesión a los 9, 13 y 15 días en el primer ensayo y a los 9, 13 y 16 días en el segundo ensayo. En cada uno se analizaron entre 12 y 14 plantas por duplicado creciendo en bandejas independientes. Los resultados obtenidos se aprecian en la figura 25.

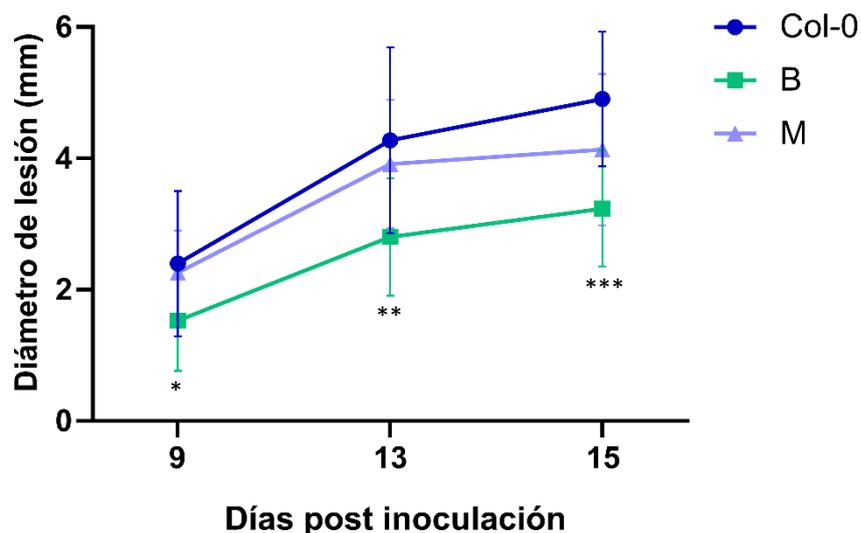


Figura 25: Diámetros de lesión en hojas de *A. thaliana* de genotipo Col-0, B y M infectadas con esporas de *P. cucumerina* a los 9, 13 y 15 días post infección (dpi). A-C-Diámetros de lesión (mm) en hojas de plantas de genotipos Col-0, B y M de *A. thaliana* a los 9, 13 y 15 días post infección creciendo en dos bandejas independientes. D- Progreso de la lesión a los 9, 13 y 15 días en hojas de los tres genotipos al promediar el diámetro de la lesión entre bandejas. Determinación de la significancia estadística de los datos a través de múltiples t-tests (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)

Los diámetros de lesión se comenzaron a cuantificar al noveno día de infección en cada repetición del ensayo. Se observaron en un principio lesiones de diámetro pequeño, las cuales

progresan hasta el día 15 (figura 25). El experimento culminó luego de este día debido a que se alcanzó un nivel de daño de la totalidad de la superficie de las hojas (diámetros mayores a 5 mm). Se puede observar como la misma tendencia en cantidad de daño se mantiene en el tiempo entre líneas. Los datos se expresan por bandeja y por día. Los resultados obtenidos muestran que en las plantas de la línea B se generaron lesiones de menor diámetro en promedio que en las Col-0 y M.

Se eligieron las hojas más representativas de cada genotipo para tomar fotos de los síntomas presentados (figura 26). Se aprecia claramente en la figura 26 como las hojas provenientes de plantas de genotipo B logran controlar mejor el avance del patógeno que las de genotipo Col-0, donde la lesión se extiende en una superficie del tejido más amplia. Las hojas provenientes del genotipo M también presentan a la vista un área de lesión menor a las de genotipo Col-0 pero la diferencia no es tan grande.

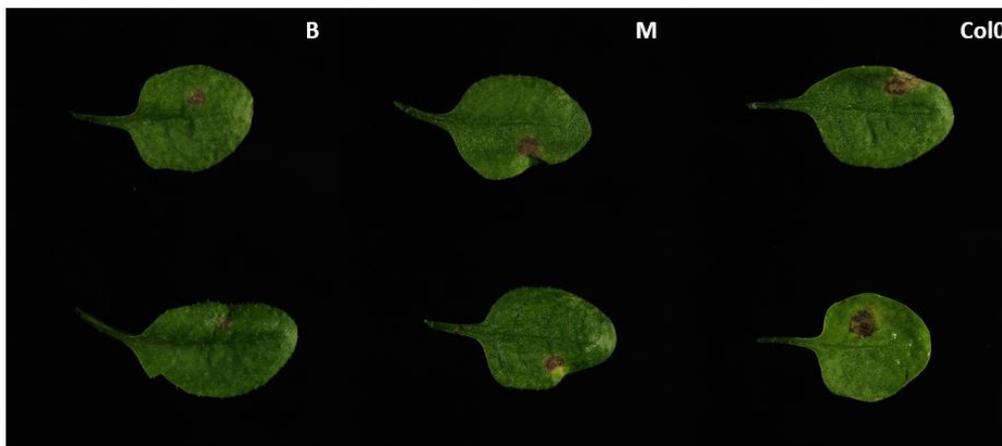


Figura 26: Hojas desprendidas de plantas de *A. thaliana* con lesiones generadas por el patógeno *P. cucumerina*. Se tomaron dos hojas por cada genotipo (B, M y Col-0) a los 15 días post inoculación.

También se realizaron dos ensayos de infección con esporas de *B. cinerea* en plantas de *A. thaliana*. Se utilizaron 15 plantas de genotipos Col-0 y línea M y 16 plantas de la línea B para el primer ensayo con una concentración de esporas 5×10^4 esporas/mL. Durante el segundo ensayo se utilizaron 11 plantas de cada genotipo y una concentración del patógeno de 1×10^5 esporas/mL. Se midieron los diámetros de lesión a los 4 y 5 días post infección.

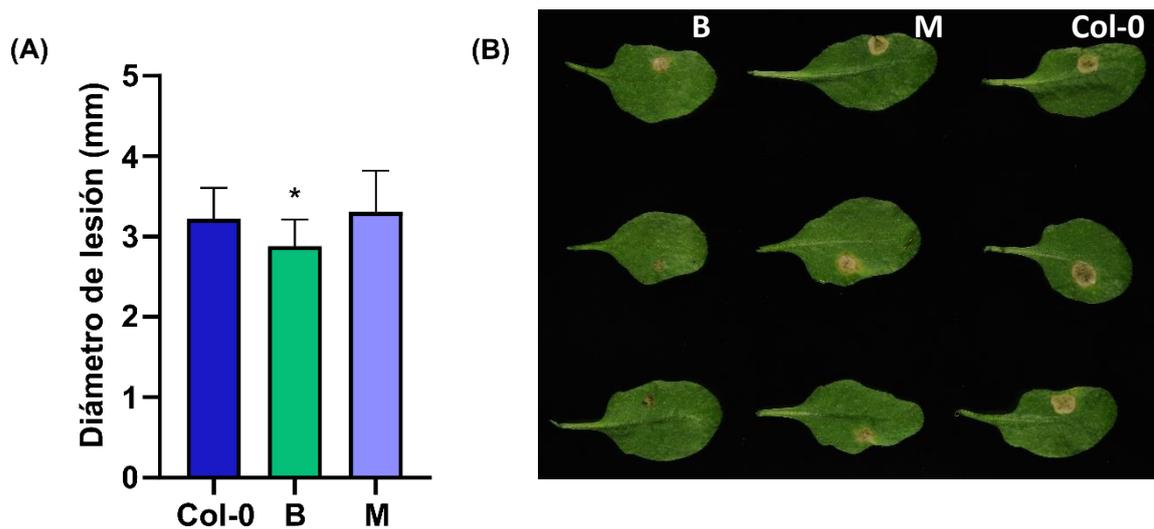


Figura 27: Lesión generada por el patógeno *B. cinerea* en hojas de *A. thaliana*. A- Diámetros de lesión en hojas de *A. thaliana* Col-0 y líneas B y M a los 4 días post infección. B- Síntomas presentados en tres hojas de cada línea. (* $p < 0.05$). La concentración del inóculo utilizado fue de 5×10^4 esporas/mL.

La línea B fue la que presentó lesiones más pequeñas, seguida de plantas de genotipo salvaje o Col-0 y la línea M (figura 27 A). Estos últimos dos presentaron lesiones muy similares en tamaño no generando diferencias significativas. Las hojas provenientes de plantas de la línea B presentan lesiones más secas que las observadas en hojas de plantas de la línea M y Col-0 (figura 27 B). Se muestran solo los diámetros de lesión a los 4 días ya que al perder la humedad de la cámara durante la medición este día la lesión se estancó y no prosiguió. La repetición del ensayo sufrió el mismo efecto por lo que se debe volver a repetir tomando medidas en momentos de mayor evolución o tamaño de lesión. Se concluye de esta manera que la línea sobre-expresante B podría ser más resistente al patógeno *B. cinerea*.

En conjunto los resultados muestran que existe una tendencia hacia una mayor resistencia a la infección frente a los hongos *P. cucumerina* y *B. cinerea* presentada por la línea transformante B de *A. thaliana*. Dado que por PCR semi-cuantitativo no se observaron diferencias en los niveles de *Pp214* entre la línea B y M, sería interesante realizar ensayos de RT-qPCR para cuantificar de manera precisa los niveles de expresión de *Pp214* en estas dos líneas y poder relacionarlos a los resultados obtenidos.

8 Discusión

8.1 Expresión de *Pp214* en diferentes tejidos de *Physcomitrium patens* y durante estrés biótico y abiótico

La expresión del gen *Pp214* durante los diferentes estadios del desarrollo de *P. patens* parece ser estable y en niveles bajos cercanos a cero. Se encontraron dos tejidos en los que se induce su expresión; el caulonema y el esporofito en sus primeras etapas de maduración. Se observa además una represión de *Pp214* que sigue a una inducción al culminar la maduración el esporofito, sugiriendo que *Pp214* podría contribuir en algún proceso relacionado a la reproducción del musgo.

Se observó mediante el PEATmoss que *P. patens* induce la expresión de este gen en diversas situaciones de estrés. Estas incluyen la exposición al hongo fitopatógeno *B. cinerea*, a luz roja y a la hormona ABA y al OPDA. Las cuatro condiciones caen dentro de las categorías de estreses tanto biótico como abiótico, sugiriendo que no está regulado por una única vía sino que su expresión puede ser requerida, y por lo tanto inducida, en más de una condición. Respecto a los tratamientos con hormonas, se sabe que en plantas vasculares tanto el ABA como el JA son de suma importancia en la activación y coordinación de mecanismos de defensa contra patógenos. Como otras briofitas, *P. patens* no sintetiza JA sino que en su lugar actúa su precursor, el dinor-OPDA. Esta hormona es capaz de unirse al receptor COI1 y desencadenar los mecanismos de defensa en *M. polymorpha* (Monte et al., 2018). A su vez, *P. patens* aumenta varias veces sus niveles de OPDA endógenos como mecanismo de defensa frente al ataque por *P. debaryanum*, *P. irregulare* y *B. cinerea*, duplicando también sus niveles de ABA a las 24 horas de infección con este último (Oliver et al., 2009; Ponce de León et al., 2012). El aumento de los niveles endógenos de estas dos hormonas frente a situaciones de estrés sugiere acciones coordinadas que parecen involucrar, en este caso, la expresión del gen en estudio.

Se ha detectado a su vez como el OPDA es capaz de inducir la expresión de genes que codifican para enzimas que actúan como marcadoras de la infección. Dentro de éstas se encuentran las PAL, para las cuales *P. patens* tiene una familia extendida de 14 miembros (más que *A. thaliana*, con solo 4) (Wolf et al., 2010). La inducción de su expresión se relaciona a diversas condiciones dentro de las que se encuentran luz UV-b, patógenos como *P. debaryanum*, *P. irregulare* y *B. cinerea*, o la aplicación exógena de la hormona SA (Oliver et al., 2009; Ponce de León et al., 2007, 2012; Wolf et al., 2010). Se observó que dos de estas PALs de *P. patens* (*Pp3c1_18940V3.1* y *Pp3c1_18830V3.1*) presentan altos valores de correlación con la expresión de *Pp214* según el set de datos obtenidos por microarrays presentes en el PEATmoss (tabla suplementaria 1). Otros genes con altos valores de correlación incluyen a los que codifican para una esterasa, una proteína DNAJ, una catecol oxidasa, y una "Snrk1-interacting protein".

Se tomaron datos de RNA-Seq de nuestro grupo de investigación para comparar la expresión de los genes seleccionados a 8 y 24 hpi (datos no publicados) y de otros grupos de investigación para los tratamientos con ABA y OPDA (Perroud et al., 2018) (figura 28).

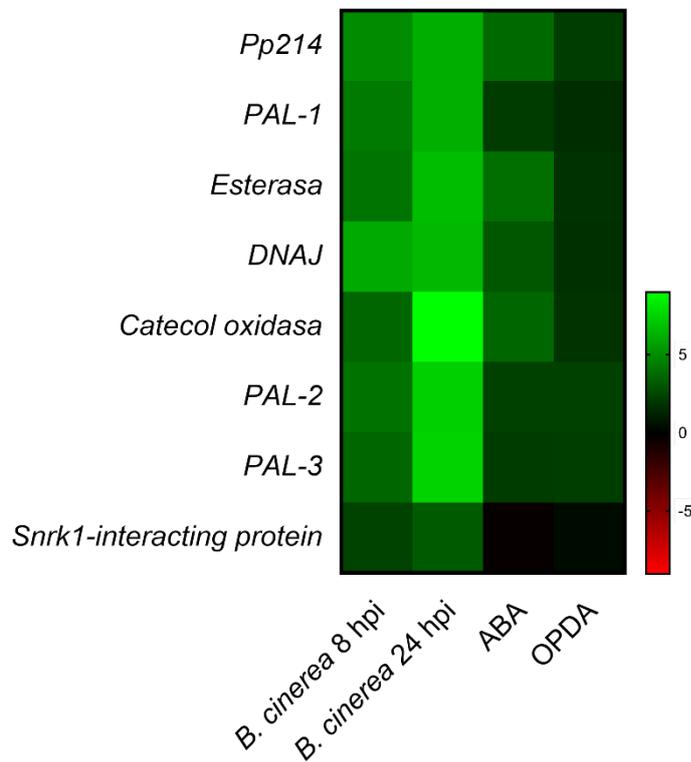


Figura 28: Expresión de *Pp214* y genes que presentan alto valor de correlación en diferentes condiciones experimentales. Niveles de expresión en log₂ fold change (FC) de *Pp214*, *PpPAL-1* y los tres genes con valores de correlación más altos en cada ensayo del PEATmoss analizado (RNA-seq protonema treatment y Microarray gametophore treatment). Se muestra su expresión en 4 condiciones diferentes: infección por esporas de *B. cinerea* a las 8 y 24 hpi y tratamientos con ABA y OPDA. Escala de colores entre -9 y 9 log₂ FC. *Esterasa*: Pp3c19_9000V3.1, *DNA J*: Pp3c19_10460V3.1, *Catecol oxidasa*: Pp3c24_11260V3.1, *PAL-2*: Pp3c1_18940, *PAL-3*: Pp3c1_18830, *Snrk1-interacting protein 1*: Pp3c1_32560V3.1.

Se observa en la figura 28 como estos genes con alto valores de correlación poseen una expresión similar a la presentada por *Pp214* en las 4 condiciones analizadas. Se incluyeron también los valores obtenidos para *PpPAL-1*, el cual fue tomado como referencia de infección para los ensayos de RT-qPCR y que posee una tendencia de expresión similar a la observada en *Pp214* en las 4 condiciones. El gen que codifica para la Snrk1- interacting protein parecería ser el que menos se asemeja al comportamiento presentado por *Pp214*, reprimiéndose en vez de aumentando su expresión frente a un tratamiento con ABA. Por otro lado, se encontró que el gen que codifica para la esterasa posee un comportamiento casi idéntico al de *Pp214* en estas condiciones. Todos estos genes están relacionados con la defensa vegetal, por lo que el hecho de que *Pp214* tenga un patrón de expresión similar a ellos en tantas condiciones diferentes (25 y 18 condiciones para los tratamientos en protonema y gametóforos respectivamente en el PEATMoss), indica que participan en procesos biológicos similares, incluyendo la defensa frente a patógenos.

8.2 Elementos regulatorios en cis presentes en el promotor de *Pp214*

La identificación de elementos regulatorios en los promotores de genes de interés es crucial para entender la especificidad de la interacción entre los factores de transcripción y los promotores que éstos regulan, así como para entender la clase de regulación dada entre vías metabólicas y cascadas de transcripción que se desencadenan. A lo largo de años de estudios de estos elementos se ha llegado al consenso de que los elementos de regulación más comunes tienen entre 6 y 15 nucleótidos y que están bien conservados entre especies (Brendolise et al., 2017). Esto nos permite la utilización de plataformas en las que si bien no se encuentran subidos datos de *P. patens*, se cree que los de otras especies son lo suficientemente conservados para ser extrapolables. Con el criterio del tamaño se descartaron todos aquellos elementos encontrados de menos de 5 nucleótidos que no fueran cajas TATA, justificando también el hecho de que la probabilidad de encontrarlos por azar es alta. Se encontraron en este trabajo más de 400 elementos regulatorios en cis de diversas clases dentro del promotor de *Pp214*. Estos participan en respuestas de diversa naturaleza como son estímulos lumínicos, fitohormonas, bajas temperaturas y defensa ante microorganismos patógenos. Varios de estos elementos regulatorios son esenciales para un correcto inicio de transcripción, algunos son específicos de tejido y otros no tienen función asignada o tienen muchas posibles funciones.

Se encontró en la secuencia promotora de *Pp214* una región de 19 repetidos GA. Éstos han sido ampliamente estudiados en otros genomas, en lo que se ha demostrado que son esenciales para la actividad de algunos promotores. Suelen estar cercanos al inicio de transcripción, donde tienen efectos tanto de activación como de represión transcripcional (Berger & Dubreucq, 2012). El estudio de estos repetidos en *P. patens* nos pueden dar una idea de la regulación a la que está sometida *Pp214*.

Como mencioné anteriormente, aparte del rol de las hormonas en el correcto desarrollo de la planta, éstas son importantes en las rutas involucradas en la respuesta frente a estreses bióticos y abióticos. La mayoría de los elementos de respuesta a fitohormonas encontrados son de respuesta a ABA (ABRE, ABRE3a, ABRE4, AT-ABRE), lo cual es consistente con el aumento de expresión de *Pp214* en respuesta a esta hormona. Además, se encontraron algunos elementos para auxinas, giberelinas y metil-JA. Los ABRE junto con otros TFs de las familias MYB, MYC y WRKY, todos encontrados en el promotor de *Pp214*, son capaces de regular la expresión génica dependiente de ABA (Abe et al., 2003; Rushton et al., 2012). Se han descrito estos ABRE en *P. patens*, compartiendo los mismos componentes basales con angiospermas (Timmerhaus et al., 2011).

Se encontraron dentro de la lista 32 elementos de unión MYB y MYC. Respecto a los primeros, se considera a los factores de transcripción MYB como una superfamilia, donde solo en *A. thaliana* se han encontrado más de 100 y son funcionalmente muy diversos (Dubos et al., 2010). Estos posibles roles son conservados entre factores MYB de diferentes especies y van desde la regulación de la síntesis de lignina y flavonoides en *A. thaliana* (Preston et al., 2004),

Triticum aestivum (Wei et al., 2017) y *Prunus pérsica* (Zhou et al., 2019), a la iniciación de tricomas en tallos (Kirik et al., 2005), modulación del crecimiento de raíz (Mu et al., 2009; Shin et al., 2007), regulación del desarrollo de hoja (Theodoris et al., 2003) y anteras (Cheng et al., 2009). También se han encontrado alguno de estos genes que están involucrados en respuestas a estreses abióticos como sequía o frío (Agarwal et al., 2006), y bióticos como patógenos (Seo et al., 2009 ; Seo & Park, 2010) o defensa contra insectos (Vos et al., 2006). Se vio además en trabajos del laboratorio que varios MYB se inducen con *B. cinerea* en *P. patens* (datos no publicados).

Respecto a los factores MYC, se sabe que regulan varios aspectos de la vía de señalización del JA, activando la expresión de genes de defensa, cerrado de estomas, acumulando de glucosinolatos, terpenoides y otros metabolitos secundarios (Gimenez-ibanez et al., 2016; Schweizer et al., 2013; Hong et al., 2012). También coordinan respuestas del JA con otras fitohormonas como el SA, GAs y auxinas (Chini et al., 2016), con la regulación lumínica (Chico et al., 2014) y del desarrollo incluyendo la formación de raíces laterales, floración, fertilidad y senescencia (Wasternack & Hause, 2013; Qi et al., 2015). Los factores de ambas familias, MYC y MYB, pueden interactuar entre ellos para generar respuestas coordinadas (Feller et al., 2011), incluyendo aquellas activadas por ABA (Abe et al., 2003). Dada tal cantidad de posibles funciones, se posicionó a los elementos de reconocimiento para factores de transcripción MYB y MYC en la tabla 2 como con diversas funciones posibles.

La presencia de elementos de respuesta a ABA, luz y bajas temperaturas sugiere que el gen *Pp214* no solo juega un rol en la defensa de *P. patens* contra microorganismos patógenos como se hipotetizó en un primer momento, sino que podría intervenir en otras respuestas asociadas a otros tipos de estreses. Para confirmar esto se podrían analizar las plantas que sobre-expresan *Pp214* y plantas salvajes sometidas a otros estreses como calor, deshidratación, estrés oxidativo y frío, entre otros. La generación de un mutante de *P. patens* knock-out en *Pp214* sería de gran utilidad para complementar estos estudios.

8.3 *Pp214* es un gen huérfano presente solo en *Physcomitrium patens*

La ausencia de secuencias homólogas a la de *Pp214* en genomas de otras plantas, incluyendo los de organismos evolutivamente muy cercanos como son los musgos *C. purpureus*, *F. hygrometrica*, *P. shreberi* y *S. fallax* indica que *Pp214* es un gen exclusivo de *P. patens*, pudiendo haber surgido *de novo*. A estos genes se les conoce con el nombre de huérfanos y se estima que hay millones de estos en especies tanto eucariotas como procariotas e incluso dentro de los virus cuyas proteínas son reconocibles solo en una especie particular (Yin & Fischer, 2008).

Se cree que los genes huérfanos juegan un rol crucial en la adaptación a nuevos nichos biológicos dado que proveen a los organismos con un reservorio de elementos genéticos que les permiten responder rápidamente a presiones de selección cambiantes. Unos han surgido *de novo* a partir de secuencias no codificantes, otros son transposones “domesticados”, duplicaciones muy divergentes, pseudogenes que vuelven a tener una función o son

generados a partir de un cambio en un marco de lectura. Algunos quedan retenidos en el genoma y continúan evolucionando haciendo que cada genoma contenga una mezcla de genes de diferente edad evolutiva y permitiendo de esta manera la especiación (Carvunis et al., 2012). Dado el abanico de posibilidades existentes, se cree que la mayoría de las funciones de este tipo de genes están aún por ser descubiertas. La falta de plegamientos identificables, motivos funcionales y dominios reconocibles, hace que estos estudios sean complicados y hasta el momento no se ha adoptado un método que permita predecir con precisión estos genes y otros genes jóvenes linaje-específicos. Aunque lo más común es que se encuentren entre el 5 y 15% de los genes presentes dentro de una especie. Los métodos basados en homología asumen que los genes tienen ortólogos identificables en otras especies, lo que suele excluir a los genes huérfanos (Klasberg et al., 2016; Seetharam et al., 2019). Hasta ahora se ha visto que estos genes tienden a expresarse menos y en un rango de tejidos limitado (Arendsee et al., 2014). Estos resultados coinciden con la expresión encontrada para *Pp214* (figuras 8 y 9), la cual está limitada en condiciones normales mayoritariamente a tejido tipo caulonema y el esporofito en estadio S1 en valores relativamente bajos.

Respecto a la regulación transcripcional de estos genes, se cree que aparece muy rápidamente, no así las interacciones proteína-proteína o genéticas (Abrusán, 2013). Esta regulación puede generarse por la inserción corriente arriba de un sitio de inicio de transcripción, que puede aumentar sus niveles de expresión y de esta manera acoplarlo a un tipo de respuesta específico de estrés o tejido. También puede compartir elementos regulatorios con otros genes más antiguos, asociarse a un promotor bidireccional, alojarse en un intrón o tener un tipo de regulación epigenética. En el caso de *Pp214*, además de encontrarse una gran cantidad de elementos en su promotor que se espera jueguen un rol en su regulación, se vio que posee un transcripto alternativo que difiere únicamente en el largo de sus UTRs. Curiosamente, la región 5' UTR de *Pp214* posee un intrón de 256 pb que podría cumplir un rol en la regulación del gen. Esto es algo común en *P. patens*, donde el 40% de los 5' UTRs de genes anotados están compuestos por múltiples exones, más de los encontrados en otros genomas vegetales. Se estima que el largo promedio de estos intrones en los 5' UTRs es de 520 pb, mientras que para regiones codificantes y 3' UTRs es de 264 y 268 pb respectivamente (Zimmer et al., 2013). Este alto porcentaje de genes con intrones en el 5' UTR, su largo y que se estima que el 50% de los genes de *P. patens* sufren splicing alternativo, sugiere que su utilización como mecanismo de regulación es frecuente y nos da una idea de la regulación a la que está sometido *Pp214*. No se sabe nada aún sobre las posibles interacciones que pueda tener a nivel de ARN o proteína, aunque sería importante estudiarlas para completar su caracterización.

Se ha demostrado como varios genes huérfanos juegan un papel principal en respuestas de plantas frente al ambiente. En *A. thaliana*, más del 80% de los mutantes knockout de genes de función desconocida presentan fenotipos alterados cuando se somete a las plantas a diferentes estreses oxidativos u osmóticos, confiriendo tanto protección como supresión a estos (Luhua et al., 2013). Dentro de las proteínas que utilizan las plantas para defenderse encontramos varias catalogadas como huérfanas, como por ejemplo Ps-AFP1 de *Pisum sativum* que posee un tipo de plegamiento único (Mandal et al., 2013), el supresor de defensa inducida por patógenos *Os-DR10* (*Oryza sativa* defense-responsive gene 10) (Xiao et al., 2009)

y EWR1 (Enhancer of vascular Wilt Resistance-1) que confiere resistencia a varios hongos patógenos (Yadeta et al., 2014). También se han encontrado ejemplos de este tipo de proteínas que son secretadas por áfidos, hongos y nematodos dentro de sus huéspedes al alimentarse que son especie-específicas (Elzinga & Jander, 2013; Jonge et al., 2011; Tomalova et al., 2012).

Se estima que el 13% de los genes de *P. patens* son genes huérfanos, siendo estos especie o linaje específicos. Estos pueden haber surgido como innovación adaptativa en alguna de las duplicaciones del genoma y ayudado a soportar condiciones ambientales adversas (Zimmer et al., 2013). En otro estudio realizado en *P. patens* se encontraron más de 500 genes diferencialmente expresados sin función asignada en condiciones de estrés provocado por bajas temperaturas sin ortólogos en otras Viridiplantae (Khraiwesh et al., 2015). Esta información, sumada a la alta tasa de recombinación homóloga y transferencia horizontal de genes de microorganismos observada en *P. patens*, hace pensar que su genoma es un gran reservorio de genes que han evolucionado únicamente en este musgo.

Para poder avanzar en el reconocimiento de genes nuevos sería de gran utilidad contar con más genomas ensamblados y datos de transcriptomas de otros musgos (Rensing, 2017). Esto nos permitiría generar conocimiento acerca de cómo surgieron los genes huérfanos y qué función cumplen en mecanismos de adaptación. Dado que los musgos fueron de las primeras plantas en colonizar la tierra (Rensing et al., 2008), estos genes pueden haber sido importantes para la adaptación al nuevo medio terrestre.

8.4 La proteína Pp214 se localiza en el citosol de las células vegetales

Se determinó que la localización subcelular de la proteína Pp214 es citoplasmática (figura 11). Este resultado concuerda con lo esperado dada la ausencia de péptido señal en la secuencia aminoacídica de la proteína. La distribución uniforme que presenta no contribuye a la asignación de una función particular sino que solo permite el descarte de organelos en los que podría ejercer su función.

8.5 La sobre-expresión de *Pp214* en *Physcomitrium patens* no genera alteraciones en la morfología de las colonias

Luego de la transformación con la construcción para sobre-expresar *Pp214*, se lograron obtener un total de 71 clones resistentes al antibiótico dados por eventos independientes. Este es considerado un número alto de eventos y demuestra la gran eficiencia de transformación alcanzada. *P. patens* presenta altas tasas de recombinación homóloga comparables a las encontradas en levaduras (Schaefer et al., 1997). La inserción de la secuencia del gen Pp214 se realizó por recombinación homóloga y de manera estable en el locus 108 de *P. patens*, el cual es una región genómica de copia única ampliamente descrita como lugar blanco de inserción que no genera modificaciones apreciables *per se* en el

fenotipo de los transformantes (Schaefer et al., 1997). Dentro de los 71 clones sobre-expresantes generados que lograron sobrevivir a las primeras rondas de crecimiento sobre medio con selección, se encontró que una gran cantidad (1/3 aproximadamente), perdía la resistencia al antibiótico luego de crecer en medio sin presión de selección (datos no mostrados). Estos llamados transformantes replicativos se obtienen en todos los experimentos de transformación, en los cuales el plásmido utilizado se concatena para formar estructuras episomales de alto peso molecular que se replican dentro de las células del musgo pero que presentan mala segregación durante la mitosis y por lo tanto acaban perdiéndose (Ashton et al., 2000).

La observación macro y microscópica de los diferentes estadios del desarrollo y tejido de colonias de las líneas sobre-expresantes permitió demostrar que la sobre-expresión del gen *Pp214* no genera cambios fenotípicos evidentes en las plantas y permite el desarrollo normal del tejido. Solo dos transformantes de los 71 presentaron una alteración en el crecimiento, tipo botón, el cual se puede atribuir a una inserción de manera ilegítima en alguna otra parte del genoma y en un gen que afecta el desarrollo. De esta manera se descartó la posibilidad de que las diferencias encontradas en ensayos de estrés, tanto biótico como abiótico, entre colonias de genotipo salvaje y sobre-expresantes, estén dadas por diferencias en la morfología de las colonias o tasa de crecimiento que son factores que afectan en gran medida los resultados.

8.6 Niveles de expresión de *Pp214* durante la infección con *B. cinerea* y en plantas sobre-expresantes

Para determinar la cinética de expresión de *Pp214* en *P. patens* se determinaron sus niveles de ARNm en dos sets de muestras. En el primer set se utilizó material extraído de tres líneas sobre-expresantes y genotipo salvaje que permitió cuantificar la expresión de *Pp214* relativa al gen house-keeping *ubiquitina-E2*. El segundo análisis se realizó sobre muestras de genotipo salvaje a las 4 y 24 horas post infección con esporas de *B. cinerea* y permitió realizar una comparación de la significancia biológica de los niveles de expresión encontrados en las líneas sobre-expresantes que se evalúan en el trabajo.

Las 3 líneas sobre-expresantes evaluadas presentan niveles de expresión de *Pp214* que se cree no serían alcanzables en condiciones normales de inducción en un genotipo salvaje. La línea con menor sobre-expresión (pUBI:Pp214.48, figura 19) presenta niveles 168 veces más altos que las muestras de genotipo salvaje, mientras que la línea con mayor expresión llega a un aumento de 555 veces su expresión relativa. Con estos resultados es posible afirmar que cualquier diferencia encontrada en los ensayos de estrés biótico y abiótico entre las colonias que sobre-expresan *Pp214* y aquellas de genotipo salvaje estará influenciada por la sobre-expresión del gen *Pp214*.

Se estudió también la expresión del gen que codifica para la enzima *PpPAL-1* involucrada en la vía de los fenilpropanoides. Se sabe que a través de la activación de esta vía se producen varios compuestos relacionados con la defensa vegetal frente a patógenos, como la

producción de flavonoides, cumarinas y lignanos, por lo que un aumento en los niveles de su ARNm es indicativo de un reconocimiento celular del daño causado por el patógeno y respuesta frente a éste (Ponce de León et al., 2007). *PpPAL-1* fue utilizado como control positivo de la infección y activación de la defensa. Se tomaron como momentos clave las 4 y 24 hpi en muestras de genotipo salvaje ya que representan tiempos tempranos y avanzados de la infección. En el primer tiempo las esporas del patógeno han empezado a germinar y se están dando los primeros pasos de reconocimiento entre éste y la planta pero no se ha generado gran cantidad de biomasa. A las 24 hpi las esporas han germinado y colonizado el tejido, generando más biomasa y daño (Ponce de León et al., 2007, 2012). Datos previos obtenidos mediante la técnica northern blot mostraron que la presencia de *Pp214* en muestras de tejido expuestas a esporas de *B. cinerea* aumentaba a las 4 hpi y continuaba aumentando a las 24 hpi, no así en muestras del mismo tejido tratadas con filtrado acelular de *P. carotovorum* en el cual la inducción era mayoritaria a las 4 hpi y disminuía a las 24 hpi (figura 4). Las diferencias encontradas se cree están en la naturaleza del daño generado por los diferentes patógenos, en los que uno debe germinar y crecer mientras que el otro presenta enzimas degradadoras de pared desde que se establece el primer contacto. El análisis de expresión mediante RT-qPCR del gen *Pp214* corroboró lo observado anteriormente frente a *B. cinerea*.

La cinética de expresión de *PpPAL-1* presenta el mismo comportamiento que *Pp214*. La expresión de ambos se encuentra levemente inducida las 4 hpi, con valores de 5.5 y 8.6 de expresión relativa al gen house-keeping, mientras que a las 24 hpi llegan a valores de 25,5 y 44 respectivamente (figura 19). Esta similitud en los niveles de expresión a dos tiempos diferentes si bien no significa que ambos genes estén regulados conjuntamente, da una idea de la tendencia o rapidez con la que se requiere la presencia de *Pp214* frente a un estrés biótico como es la infección por *B. cinerea*. También corrobora los datos obtenidos en el PEATmoss de los valores de correlación entre los dos genes.

8.7 Las líneas de *Physcomitrium patens* con mayores niveles de sobre-expresión de *Pp214* presentan mayor resistencia que plantas salvajes a especies de *Pythium*

Los resultados de los ensayos de infección con *Pythium* sugieren que la sobre-expresión de *Pp214* puede contribuir a los mecanismos de defensa de *P. patens* frente a estreses bióticos. En los ensayos de infección realizados con *P. debaryanum* y *P. irregulare*, se encontró una correlación entre los niveles de expresión de *Pp214* de las líneas en estudio y el nivel de daño celular provocado por los mismos. Las líneas con mayores niveles de expresión del gen *Pp214* fueron las que presentaron menores niveles de daño celular frente a *P. debaryanum*. La línea pUBI:*Pp214*.62 fue la que presentó menores niveles de daño para ambos tratamientos y es la que posee mayores niveles de expresión de *Pp214*. La línea pUBI:*Pp214*.12 es la que posee niveles de expresión intermedios y presentó menor nivel de daño solo en el tratamiento con *P. debaryanum*.

El daño provocado en plantas control, si bien es muy poco, se puede deber a posibles y pequeñas lesiones provocadas durante la manipulación. Los resultados muestran que todas las líneas sobre-expresantes presentan menos daño que las plantas salvajes, y este está correlacionado con los niveles de sobre-expresión de *Pp214* en las líneas.

Datos publicados previamente por el laboratorio muestran cómo luego de transcurridas las 24 hpi, ambos oomycetes son capaces de penetrar los tejidos de *P. patens* e invadir todos los tipos celulares (Oliver et al., 2009). La diferencia entre estas dos especies de *Pythium* radica en su agresividad, *P. debaryanum* degrada y coloniza los tejidos más rápido que *P. irregulare*, y los síntomas de enfermedad, incluyendo amarronamiento y maceración de los tejidos se evidencian antes con *P. debaryanum* (Oliver et al., 2009). El hecho que niveles intermedios de expresión de *Pp214* solo sean suficientes para disminuir el daño con la especie más virulenta y no la menos virulenta resulta sorprendente y es difícil de explicar con los conocimientos que tenemos actualmente. La diferencia observada se podría deber a cómo *Pp214* ejerce su función y en relación con la forma de colonización y generación de la enfermedad de ambas especies de *Pythium*. Para poder profundizar en este resultado sería importante conocer la cantidad de proteína *Pp214* que se acumula en las tres líneas y ver si esto tiene una relación con los niveles de resistencia observados. Para ello se podría generar un anticuerpo para la secuencia traducida del gen y corroborar su expresión a nivel de proteína.

P. patens activa en respuesta a la infección con *Pythium* mecanismos de defensa como la alteración de la composición de la pared celular por deposición de compuestos fenólicos y deposición de calosa, relocalización de los cloroplastos y producción de ROS. También se demostró como los niveles de OPDA aumentan 25 veces aproximadamente en los tejidos del musgo luego de 24 horas de infección con los oomycetes utilizados (Oliver et al., 2009). Los datos obtenidos desde el PEATmoss indican que *Pp214* se induce ante el tratamiento con esta hormona (Log₂ FC 2,12) (figura 9 A), por lo que se espera que cumpla un rol dentro de las respuestas inducidas naturalmente por *P. patens*. El hecho de tener altos niveles de expresión de *Pp214* de manera constitutiva en las líneas sobre-expresantes mejora la defensa de la planta frente a la infección con *Pythium*. Conjuntamente, estos resultados demuestran que *Pp214* participa en la defensa de *P. patens*, aunque falta determinar cómo ejerce esta función. Resulta interesante que el aumento de resistencia de las líneas sobre-expresantes para *Pp214* observado frente a *Pythium*, es dependiente del nivel de humedad. Los niveles de daño entre las líneas y las plantas salvajes son similares cuando las plantas tienen altos niveles de humedad (datos no mostrados). Esto puede explicarse por el hecho que en condiciones de altos niveles de humedad, el patógeno se ve favorecido y coloniza mejor los tejidos, por lo que las plantas tienen menos tiempo para activar sus mecanismos de defensa resultando en mayores niveles de daño.

Se podrían medir los niveles de biomasa de *Pythium* en las líneas sobre-expresantes y las líneas salvajes y correlacionar el crecimiento del patógeno en condiciones de bajo y alto nivel de humedad con la respuesta generada por el musgo. Se podrían además estudiar mejor los mecanismos que están participando de la respuesta de defensa y pueden estar modificados en las líneas sobre-expresantes, incluyendo la expresión de genes asociados a mecanismos de defensa de *P. patens*, como aquellos involucrados en la producción de fenilpropanoides o PRs.

8.8 Las líneas de *Physcomitrium patens* que sobre-expresan *Pp214* no son más tolerantes al estrés osmótico y salino

No se observaron los mismos resultados en los ensayos de estrés abiótico, donde la recuperación presentada por las colonias de genotipo salvaje y líneas sobre-expresantes frente a los estreses dados por altas concentraciones de D-manitol y NaCl fue igual para todas. Se sabe que el ABA juega un rol importante en la defensa frente a estos tipos de estreses abióticos en *P. patens* (Takezawa & Komatsu, 2011). Se había visto en datos tomados del PEATmoss como el tratamiento de tejido protonema del musgo con esta hormona inducía la expresión de *Pp214* y encontrado varios ABRE en el promotor del gen (figura 9 B y tabla 2). De esa manera, se esperaba que su sobre-expresión contribuyera de alguna manera a una mayor tolerancia a los estreses abióticos a los que fueron sometidas las colonias. Como se observa en la figura 28, *Pp214* se induce levemente frente al tratamiento con las hormonas ABA (FC 3,732) y OPDA (FC 2,121), sin embargo no aumenta la tolerancia o la recuperación frente a los tratamientos con manitol y NaCl, por lo que *Pp214* no estaría involucrado en la respuesta frente a estos estreses.

8.9 Esporas de *Plectosphaerella cucumerina* son capaces de germinar y producir enfermedad en *Physcomitrium patens*

P. cucumerina es un hongo ascomycete filamentoso que posee un amplio rango de hospederos y genera grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Carlucci et al., 2012). Diversos estudios han descrito como *A. thaliana* es capaz de desencadenar una gran variedad de mecanismos de defensa ante la infección por patógenos necrótrofos como *P. cucumerina* o *B. cinerea*, como son las inducibles por las hormonas ET, JA, SA, ABA y auxinas, o deposiciones de calosa y generación de ROS (Llorente et al., 2008; Thomma et al., 1999; Tierens et al., 2002; Ton & Mauch-Mani, 2004). Dado que se habían obtenido resultados prometedores en los ensayos de infección con este patógeno en plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan *Pp214*, se analizó si esto se repetía en las líneas sobre-expresantes de *P. patens*.

En este trabajo describimos como sus esporas son capaces de germinar sobre tejido de *P. patens* generando enfermedad. Mediante diferentes tinciones se evidenciaron cambios en la composición de las paredes vegetales de las células del musgo y colonización de los tejidos por las hifas del patógeno. Se realizaron a su vez tinciones con el colorante azul de metilo en búsqueda de deposiciones de calosa reportadas como mecanismo de defensa activado en *A. thaliana*, aunque no fue posible detectar presencia de éstas (datos no mostrados). El tipo y tasa de crecimiento de este patógeno permite estudiar la generación de enfermedad en el musgo en un periodo de tiempo más prolongado que el manejado para otros patógenos como son *B. cinerea*, *P. debaryanum* y *P. irregulare*. La concentración del inóculo utilizado para los ensayos fue de 5×10^5 esporas/mL y el tiempo promedio para realizar ensayos de infección

es de 3 días, mientras que para *B. cinerea* se utilizan concentraciones menores y los ensayos se suelen analizar a las 24 hpi. Estas características hacen que las etapas iniciales de la infección sean más largas en el tiempo y se puedan observar con mayor precisión, permitiendo al musgo una ventana de tiempo más grande para activar sus defensas. También se observó como el patógeno es capaz de realizar su ciclo de vida completo en los tejidos de *P. patens*, al infectar colonias con una suspensión de esporas y recuperar nuevas a la semana de crecimiento (datos no mostrados). Se intentó cuantificar el daño producido por el crecimiento del patógeno en los tejidos de *P. patens* salvajes y las líneas que sobre-expresan *Pp214*, aunque no se tiñeron los tejidos y por lo tanto no se pudo cuantificar el daño. A pesar de este resultado, en este trabajo se establece este nuevo patosistema que permitirá continuar con el estudio de las respuestas de defensa activadas por *P. patens* frente a la infección por microorganismos patógenos.

8.10 Plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan constitutivamente *Pp214* presentan una tendencia a ser más resistentes frente a microorganismos patógenos

Se observó una tendencia a presentar menores niveles de daño en la línea B de plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan *Pp214*, cuando las mismas son infectadas con patógenos, especialmente hongos, y comparadas con plantas salvajes. Se utilizaron para la inoculación de los patógenos métodos diferentes. Para la bacteria *PstDC300* se utilizó el spray, el cual permite una distribución homogénea del patógeno en el tejido vegetal y evita de esta manera la acumulación en un único punto que puede estar sujeto a particularidades en la planta y aportar significativamente a la variación en los valores de los datos. Para los hongos patógenos *B. cinerea* y *P. cucumerina*, se depositó una gota de la suspensión de esporas sobre la superficie de la hoja, método que concentra el patógeno en un solo punto y puede cambiar el comportamiento del patógeno de ser hemibiótrofo a necrótrofo (Pétriacq et al., 2016). Para los dos hongos se vio que las plantas de la línea B presentaban una tendencia a ser más resistentes que las plantas salvajes. Las plantas de la línea M generaron resultados más desparejos, presentando en algunos casos menores niveles de daño que plantas Col-0, como es el caso de la inoculación con *PstDC3000*, o no presentando diferencias significativas como fue en el caso de la inoculación con los hongos.

Si bien el número de plantas utilizado en estos ensayos fue alto y todos fueron repetidos dos o más veces, las diferencias de resistencia en la línea B y M no permiten sacar conclusiones y por lo tanto no se puede asegurar que *Pp214* cumpla un rol en la defensa de *A. thaliana* frente a patógenos. Los análisis de expresión por RT-PCR semi-cuantitativo realizados durante mi tesis de grado mostraron niveles de expresión de *Pp214* similares entre las líneas B y M (figura 5) aunque estos niveles deben ser corroborados por RT-qPCR y además se debería analizar los niveles de proteína producidos en estas plantas y ver si los mismos se correlacionan o no con los niveles de resistencia observados en ambas líneas. *Pp214* es un gen que no está presente ni tiene homólogos en *A. thaliana*, por lo que podría no funcionar en esta angiosperma. Una posibilidad es que estén ausentes proteína(s) que interaccionan y son

necesarias para la función de Pp214 en *A. thaliana*, aunque pueden existir otras que no le permiten contribuir con la defensa vegetal.

9 Conclusiones

- La expresión basal de *Pp214* es baja y se induce frente a diversos tratamientos de estrés.
- La localización subcelular de *Pp214* es citoplasmática.
- La sobre-expresión del gen en *P. patens* no produce alteración en la morfología de sus colonias.
- La línea de *P. patens* con mayores niveles de sobre-expresión de *Pp214* (pUBI:Pp214.62) es más resistente a *P. irregulare* y *P. debaryanum*, mientras que la línea con niveles intermedios (pUBI:Pp214.12) es más resistente a *P. debaryanum*, comparado con plantas salvajes.
- *P. cucumerina* es un microorganismo patógeno capaz de infectar los tejidos de *P. patens*.
- La línea B de *A. thaliana* que sobre-expresa *Pp214* presenta niveles de daño menores respecto a Col-0 cuando se enfrentan a los hongos *P. cucumerina* y *B. cinerea*.

10 Perspectivas

Se debe volver a analizar la posible sintenia con las versiones nuevas de los genomas de *S. fallax* una vez que se liberen los datos y estos puedan ser analizados mediante el programa VISTA. Se espera encontrar un ensamblado a nivel cromosómico de este último que permitirá ubicar las regiones cromosómicas adyacentes a *Pp214* en *P. patens* en un cromosoma de *S. fallax*.

Se podría generar una construcción que permita estudiar la influencia del 5' UTR del transcripto alternativo en la expresión espacio temporal del gen. Este llama la atención debido a su largo de secuencia (1185 pb) respecto a la secuencia codificante (306 pb) y la presencia de un intrón (256 pb) en el medio. Se sabe que estas características lo hacen propenso a ser blanco de una regulación especial que puede ser interesante estudiar.

Se podría ampliar la cantidad de genes y condiciones estudiadas por RT-qPCR en los transformantes y plantas salvajes para generar un panorama más amplio de las vías en las que *Pp214* puede participar. Se pueden incluir otros genes además de *PAL-1* como *CHSs*, *LOXs* y *PRs* que estén involucrados en los mecanismos de defensa junto con muestras provenientes de infecciones con otros microorganismos patógenos a diferentes tiempos post infección.

Se podría determinar experimentalmente cómo se acumula la proteína Pp214. Para esto se debería hacer una extracción de proteínas de *P. patens* en condiciones de estrés en las que se sepa que se incrementa su expresión, por ejemplo con *B. cinerea*, y realizar un SDS-PAGE con posterior western blot utilizando anticuerpos que permitan reconocer su presencia.

Contar con un anticuerpo que reconoce Pp214 sería muy importante y permitiría medir además el nivel de proteína Pp214 en los transformantes de *P. patens* y *A. thaliana* y determinar si los niveles de resistencia a patógenos se correlacionan con los niveles de proteína.

Se podría cuantificar la biomasa del patógeno en los ensayos de infección de *P. patens* para establecer una relación entre la capacidad de colonización de tejidos y daño generado.

Se pueden probar más condiciones de estrés abióticos como deshidratación, calor, frío u otros, así como evaluar la respuesta de los sobre-expresantes en *Pp214* y plantas salvajes frente a otros microorganismos patógenos que posean alguna diferencia en su método de infección.

Por último, sería importante generar un mutante de *P. patens* knock-out en *Pp214*, que permita complementar los estudios realizados en este trabajo y determinar la función que cumple este gen en la respuesta de defensa frente a patógenos y estreses abióticos.

11 Figuras suplementarias

Tabla S1: Genes con valores de correlación de expresión similares a *Pp214*. Se muestran los tres genes cuya expresión es más cercana a 1 en los dos sets de datos analizados en el programa PEATmoss.

Set de datos	Gen	Nombre	Valor de correlación respecto a <i>Pp214</i>
RNA-seq tratamiento sobre protonema	<i>Pp3c19_9000V3.1</i>	<i>Esterasa</i>	0.90
	<i>Pp3c19_10460V3.1</i>	<i>DNA J</i>	0.89
	<i>Pp3c24_11260V3.1</i>	<i>Catecol oxidasa</i>	0.89
CombiMatrix tratamiento sobre gametóforos	<i>Pp3c1_18940V3.1</i>	<i>PAL-2</i>	0.96
	<i>Pp3c1_18830V3.1</i>	<i>PAL-3</i>	0.96
	<i>Pp3c1_32560V3.1</i>	<i>Proteína de interacción con Snrk1</i>	0.94

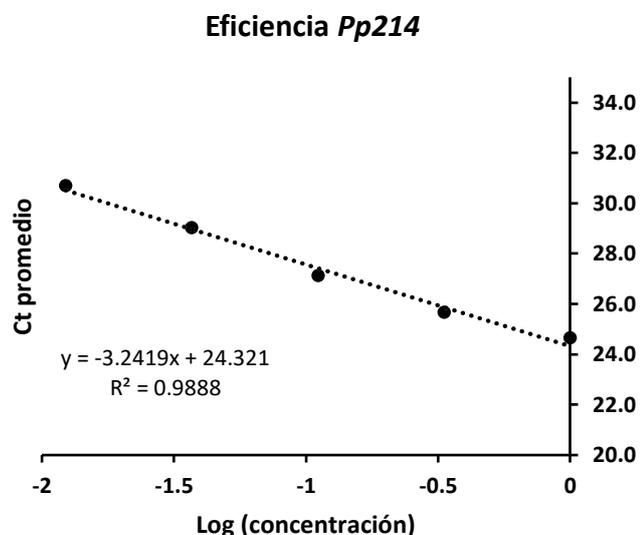


Figura S1: Eficiencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar *Pp214* por RT-qPCR. Se utilizó como molde diluciones seriadas al tercio de ADN genómico de *P. patens*. El cálculo de la eficiencia para este par de oligonucleótidos se realizó utilizando la fórmula $E = 10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)} - 1 \times 100$. Dado que la pendiente es -3.2419, la eficiencia para el par de oligonucleótidos utilizados es del 103.45%. El R^2 obtenido fue de 0.9888.

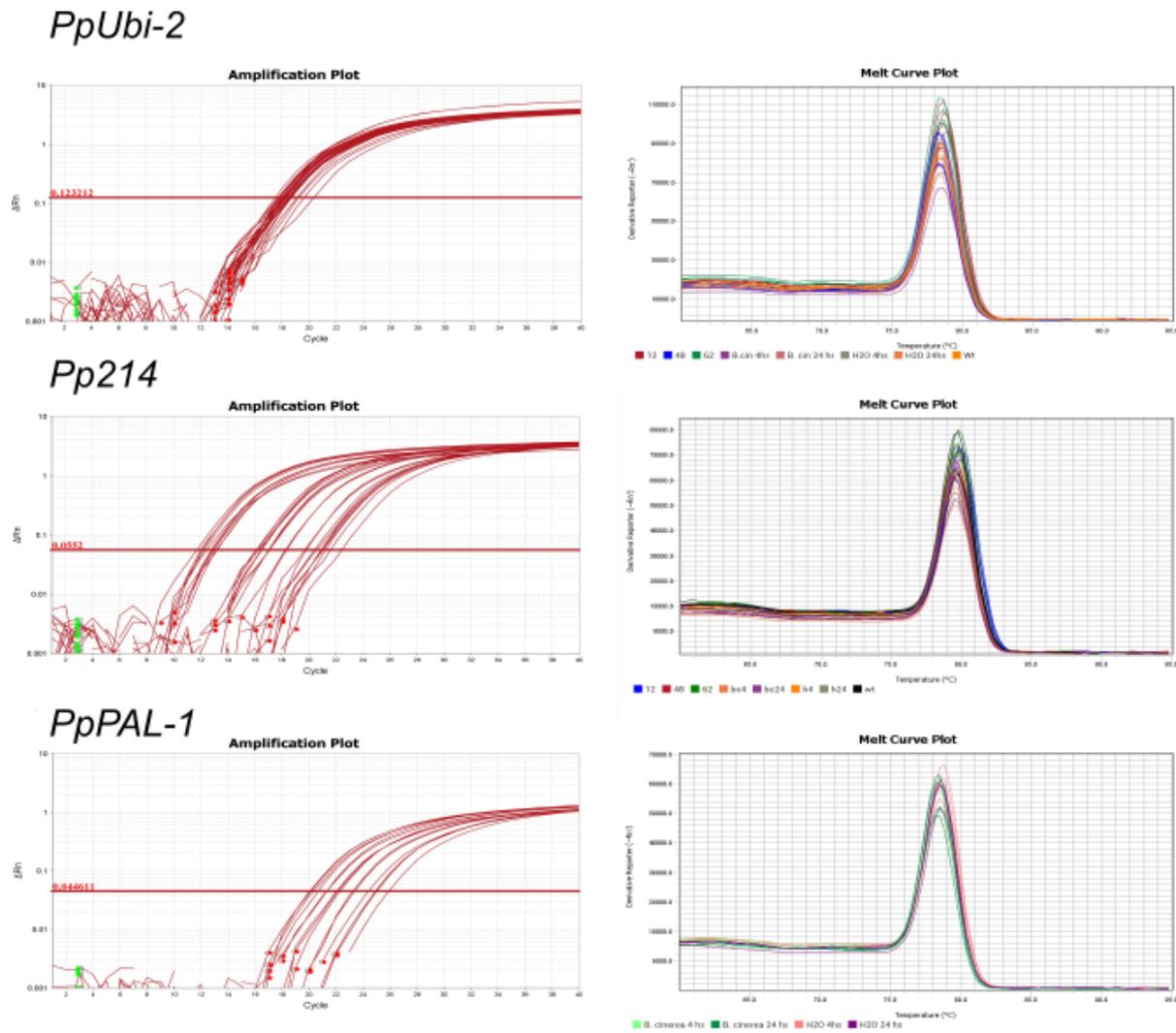


Figura S2: Curvas de amplificación y de melting obtenidas por RT-qPCR para los genes *PpUbi-2*, *Pp214* y *PpPAL-1*. Se observa en cada imagen de la izquierda el valor del threshold, comportamiento y plateau alcanzado en cada reacción. En las gráficas de la derecha se muestran una temperatura única de disociación para cada par de oligonucleótidos utilizados. Gráficas obtenidas desde el software QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.3.1.

12 Referencias

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., & Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 15(January), 63–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130.salt>
- Abrusán, G. (2013). Integration of New Genes into Cellular Networks, and Their Structural Maturation. *Genetics*, 195, 1407–1417. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152256>
- Adie, B. A. T., 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*. *The Plant Cell*, 19, 1665–1681. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048041>
- Adie, B. A. T., Schmelz, E. A., Solano, R., & Gene, D. (2007). ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(May), 1665–1681. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048041>
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C., Fujii, H., Zheng, X., & Zhu, J. (2006). A R2R3 Type MYB Transcription Factor Is Involved in the Cold Regulation of CBF Genes and in Acquired Freezing Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37636–37645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605895200>
- Alvarez, A., Montesano, M., Schmelz, E., & Ponce de León, I. (2016). Activation of Shikimate, Phenylpropanoid, Oxylipins, and Auxin Pathways in *Pectobacterium carotovorum* Elicitors-Treated Moss. *Frontiers in Plant Science*, 7(328), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00328>
- Anterola, A., Göbel, C., Hornung, E., Sellhorn, G., Feussner, I., & Grimes, H. (2009). *Physcomitrella patens* has lipoxygenases for both eicosanoid and octadecanoid pathways. *Phytochemistry*, 70(1), 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.11.012>
- Arendsee, Z. W., Li, L., & Wurtele, E. S. (2014). Coming of age: orphan genes in plants. *Trends in Plant Science*, 19(11), 698–708. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.003>
- Ashton, N. W., Champagne, C. E. M., Weiler, T., & Verkoczy, L. K. (2000). The bryophyte *Physcomitrella patens* replicates extrachromosomal transgenic elements. *New Phytologist*, 146, 391–402.
- Ashton, N. W., & Cove, D. J. (1977). The Isolation and Preliminary Characterisation of Auxotrophic and Analogue Resistant Mutants of the Moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*, 154, 87–95.
- Bachmann, S., Archer, C. R., Huber, R., Groll, M., Schellenberg, B., Powell, T. K., ... Dudler, R. (2008). A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*, 452(2008), 755–759. <https://doi.org/10.1038/nature06782>
- Bar, M., & Shtein, I. (2019). Plant trichomes and biomechanics of defense in various systems with *Solanaceae* as a model. *Botany*, 97(12), 651–660.

- Bari, R., & Jones, A. E. J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, *69*, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Bayles, C. J., Ghemawat, M. S., & Aist, J. R. (1990). Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papilla deposition, and resistance to powdery mildew in an ml-o barley mutant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *36*, 63–72.
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., ... Schulze-Lefert, P. (2009). Pathway in Living Plant Cells Mediates. *Science*, *323*(January), 101–106.
- Berger, N., & Dubreucq, B. (2012). Evolution goes GAGA : GAGA binding proteins across kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta* *1819*, 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.022>
- Block, A., Li, G., Qing Fu, Z., & Alfano, J. R. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(4), 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2008.06.007>. Phytopathogen
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology*, *48*, 419–436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- Bohm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., & Nurnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Immunology*, *20*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.007>
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, *324*(5928), 742–744. <https://doi.org/10.1126/science.1171647>. Innate
- Bos, J. I. B., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., & Taylor, R. M. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9909–9914. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914408107>
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, *55*, 257–86.
- Brendolise, C., Espley, R. V., Lin-wang, K., Laing, W., Peng, Y., Mcghee, T., ... Allan, A. C. (2017). Multiple Copies of a Simple MYB-Binding Site Confers Trans-regulation by Specific Flavonoid-Related R2R3 MYBs in Diverse Species, *8*(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01864>
- Busch, H., Boerries, M., Bao, J., Hanke, S. T., & Hiss, M. (2013). Network Theory Inspired Analysis of Time-Resolved Expression Data Reveals Key Players Guiding *P. patens* Stem

- Cell Development. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060494>
- Buttner, D., & He, S. Y. (2009). Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology*, 150, 1656–1664. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J., & Phillips, A. J. L. (2012). Plectosphaerella species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, 28, 34–48.
- Carvunis, A.-R., Rolland, T., Wapinski, I., Calderwood, M. A., Yildirim, M. A., Hidalgo, A., ... Vidal, M. (2012). Proto-genes and de novo gene birth. *Nature*, 487, 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature11184>
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H. M., Cheng, Z., Xie, D., & Peng, J. (2009). Gibberellin Acts through Jasmonate to Control the Expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to Promote Stamen Filament Growth in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 5(3), 20–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000440>
- Chico, J.-M., Fernández-Barbero, G., Chini, A., Fernández-Calvo, P., Díez-Díaz, M., & Solano, R. (2014). Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(May), 1967–1980. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125047>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(August), 666–673. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>
- Choi, H. W., Manohar, M., Manosalva, P., Tian, M., & Moreau, M. (2016). Activation of Plant Innate Immunity by Extracellular High Mobility Group Box 3 and Its Inhibition by Salicylic Acid, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005518>
- Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G., & Frederick, M. (2009). Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. *Science*, 323(5910), 95–101. <https://doi.org/10.1126/science.1164627>
- Collier, S. M., & Moffett, P. (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in Plant Science*, 14(10), 1360–1385. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.001>
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10), 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Cove, D. (2005). The Moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics*, 39, 339–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.110214>
- Cove, D. J., Perroud, P., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., & Quatrano, R. S.

- (2009). Culturing the Moss *Physcomitrella patens*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(2), 1–6. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5136>
- Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*, 133(October), 462–469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979.specific>
- Dagdas, Y. F., Belhaj, K., Maqbool, A., Chaparro-garcia, A., Pandey, P., Petre, B., ... Bozkurt, T. O. (2016). An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.10856>
- Decreux, A., & Messiaen, J. (2005). Wall-associated Kinase WAK1 Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-induced Conformation. *Plant Cell Physiology*, 46(2), 268–278. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci026>
- Delaux, P., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkeningf, J. D., ... Ané, J.-M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2012). SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17(9), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A., Teh, T., Wang, C. A., Ayliffe, M. A., ... Ellis, J. G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Publishing Group*, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Cell Press*, 15(10), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Elzinga, D. A., & Jander, G. (2013). The role of protein effectors in plant–aphid interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.018>
- Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.020>
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., & Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors, 94–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x>
- Fernandez-Pozo, N., Haas, F. B., Meyberg, R., Ullrich, K. K., Hiss, M., Perroud, P.-F., ... Rensing, S. A. (2020). PEATmoss (*Physcomitrella* Expression Atlas Tool): a unified gene expression atlas for the model plant *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/tbj.14607>

- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 344–350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Frank, W., Ratnadewi, D., & Reski, R. (2005). *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220(May 2014), 384–394. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1351-1>
- Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0226-01>
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Mittler, R., ... Inze, D. (2006). Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis 1 [W], 141(June), 436–445. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078717.signaling>
- Gao, B., Zhang, D., Li, X., Yang, H., & Wood, A. J. (2014). De novo assembly and characterization of the transcriptome in the desiccation-tolerant moss *Syntrichia caninervis*. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-490>
- Gao, B., Zhang, D., Li, X., Yang, H., Zhang, Y., & Wood, A. J. (2015). De novo transcriptome characterization and gene expression profiling of the desiccation tolerant moss *Bryum argenteum* following rehydration. *BMC Genomics*, 16(416), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1633-y>
- Gimenez-ibanez, S., Boter, M., Garc, G., Chini, A., Lewsey, M. G., Ecker, J. R., ... Solano, R. (2016). JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist*, 213, 1378–1392. <https://doi.org/10.1111/nph.14354>
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* . *Current Biology*, 10, 751–757.
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.013>
- Harrison, C. J. (2017). Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 372, 20–25.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database : 1999, 27(1), 297–300.
- Hiss, M., Laule, O., Meskauskiene, R. M., Arif, M. A., Decker, E. L., Erxleben, A., ... Rensing, S. A. (2014). Large-scale gene expression profiling data for the model moss *Physcomitrella patens* aid understanding of developmental progression , culture and stress conditions. *The Plant Journal*, 79, 530–539. <https://doi.org/10.1111/tpj.12572>
- Hong, G., Xue, X., Mao, Y., Wang, L., & Chen, X. (2012). Arabidopsis MYC2 Interacts with DELLA Proteins in Regulating Sesquiterpene Synthase Gene Expression. *The Plant Cell*, 24(June), 2635–2648. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098749>
- Hoorn, R. A. L. Van Der, & Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy : A New Model for

- Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 20, 2009–2017.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>
- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., Yamada, K., Oshikawa, Y., Saitoh, H., ... Takano, Y. (2019). Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2), 496–505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807297116>
- Jacob, F., Vernaldi, S., & Maekawa, T. (2013). Evolution and conservation of plant NLR functions. *Frontiers in Immunology*, 4(297), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00297>
- Jeter, C. R., Tang, W., Henaff, E., Butterfield, T., & Roux, S. J. (2004). Evidence of a Novel Cell Signaling Role for Extracellular Adenosine Triphosphates and Diphosphates in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(October), 2652–2664.
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.023945.include>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system, 444(November), 323–329.
<https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, J. D. G., Vance, R. E., & Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*, 354(6316), 1117–1125.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf6395>
- Jonge, R. De, Bolton, M. D., & Thomma, B. P. H. J. (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.005>
- Jonge, R. De, Esse, P. Van, Kombrink, A., & Desaki, Y. (2010). Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science*, 329(August), 953–956.
<https://doi.org/10.1126/science.1190859>
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19486–19491.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1214848109>
- Kadota, Y., Liebrand, T. W. H., Goto, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Menke, F. L. H., ... Shirasu, K. (2019). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants, 2, 2160–2175.
<https://doi.org/10.1111/nph.15523>
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., & Fournier, E. (2012). Arms race co-evolution of Magnaporthe oryzae AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions, 894–907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05110.x>
- Kariyat, R. R., Smith, J. D., Stephenson, A. G., Moraes, C. M. De, & Mescher, M. C. (2017). Non-glandular trichomes of *Solanum carolinense* deter feeding by *Manduca sexta*

- caterpillars and cause damage to the gut peritrophic matrix. *Proceedings of the Royal Society*, 284(February). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2323>
- Khandelwal, A., Cho, S. H., Marella, H., Sakata, Y., P.F. P., Pan, A., & Quatrano, R. S. (2010). Role of ABA and ABI3 in Desiccation Tolerance. *Science*, 327(January), 546.
- Khraiweh, B., Qudeimat, E., Thimma, M., & Chaiboonchoe, A. (2015). Genome-wide expression analysis offers new insights into the origin and evolution of *Physcomitrella patens* stress response. *Nature Publishing Group*, (October), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep17434>
- Kift, N., Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Jose, M., ... Griffiths, G. (2005). Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens 1 [W], 139(December), 1902–1913. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066274.1902>
- Kirik, V., Lee, M. M., Wester, K., Herrmann, U., Zheng, Z., Oppenheimer, D., ... Hulskamp, M. (2005). Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation, (January), 1477–1485. <https://doi.org/10.1242/dev.01708>
- Klasberg, S., Bitard-feildel, T., & Mallet, L. (2016). Computational Identification of Novel Genes : Current and Future Perspectives. *Bioinformatics and Biology Insights*, 10, 121–131. <https://doi.org/10.4137/BBI.S39950>
- Kovtun, Y., Chiu, W., Tena, G., & Sheen, J. (1999). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2940–2945.
- Krasileva, K. V, Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2010). Activation of an *Arabidopsis* Resistance Protein Is Specified by the in Planta Association of Its Leucine-Rich Repeat Domain with the Cognate Oomycete Effector. *The Plant Cell*, 22(July), 2444–2458. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075358>
- Kudla, J., Batistic, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *The Plant Cell*, 22, 541–563. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Kumar, V. (2011). Ultrastructural study on the leaf surface of four Mulberry (*Morus sp.*) genotypes and the influence of foliar trichomes on egg layings by *Spilosoma obliqua* (*Lepidoptera arctiidae*). *Redia*, (July), 3–11.
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2010). Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion ? In *The Arabidopsis Book* (pp. 1–34).
- Lang, D., Ullrich, K. K., Murat, F., Fuchs, J., Jenkins, J., Haas, F. B., ... Rensing, S. A. (2018). The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *The Plant Journal*, 93, 515–533. <https://doi.org/10.1111/tpj.13801>
- Lang, D., Weiche, B., Timmerhaus, G., Richardt, S., Riaño-Pachón, D. M., Correa, L. G. G., ... Rensing, S. A. (2010). Genome-Wide Phylogenetic Comparative Analysis of Plant Transcriptional Regulation: A Timeline of Loss, Gain, Expansion, and Correlation with

- Complexity. *Genome Biology and Evolution*, 2, 488–503.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evq032>
- Lawton, M., & Saidasan, H. (2009). Pathogenesis in mosses. *Annual Plant Reviews*, 36, 298–338. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0395>
- Lehtonen, M. T., Akita, M., Frank, W., Reski, R., & Valkonen, J. P. T. (2012). Involvement of a Class III Peroxidase and the Mitochondrial Protein TSPO in Oxidative Burst Upon Treatment of Moss Plants with a Fungal Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(3), 363–371.
- León, I. P. De, & Montesano, M. (2013). Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3178–3200. <https://doi.org/10.3390/ijms14023178>
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Peer, Y. Van De, ... Rombauts, S. (2002). PlantCARE , a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences, 30(1), 325–327.
- Li, J., Brader, G., & Palva, E. T. (2004). The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *The Plant Cell*, 16(February), 319–331. <https://doi.org/10.1105/tpc.016980.1>
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., ... Molina, A. (2008). Repression of the Auxin Response Pathway Increases Arabidopsis Susceptibility to Necrotrophic Fungi. *Molecular Plant*, 1(3), 496–509.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssn025>
- Locato, V., & Gara, L. De. (2018). Programmed Cell Death in Plants: An Overview. In *Plant Programmed Cell Death* (Vol. 1743, pp. 1–8).
- Lopez-Obando, M., Hoffmann, B., Géry, C., Guyon-Debast, A., Téoulé, E., Rameau, C., ... Nogué, F. (2016). Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *Genes, Genomes and Genetics*, 6(November), 3647–3653. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033266>
- Lori, M., Verk, M. C. Van, Hander, T., Schatowitz, H., Klauser, D., Flury, P., ... Bartels, S. (2015). Evolutionary divergence of the plant elicitor peptides (Peps) and their receptors : interfamily incompatibility of perception but compatibility of downstream signalling, 66(17), 5315–5325. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv236>
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., & He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 496–501. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909705107>
- Luhua, S., Hegie, A., Suzuki, N., Shulaev, E., Luo, X., & Cenario, D. (2013). Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/ppl.12013>
- Ma, Y., Walker, R. K., Zhao, Y., & Berkowitz, G. A. (2012). Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 109(48), 19852–19857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205448109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1205448109>
- Mandal, S. M., Porto, W. F., Dey, P., Maiti, M. K., Ghosh, A. K., & Franco, O. L. (2013). The attack of the phytopathogens and the trumpet solo: Identification of a novel plant antifungal peptide with distinct fold and disulfide bond pattern. *Biochimie*, 95(10), 1939–1948. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.027>
- Manosalva, P., Manohar, M., Von Reuss, S. H., Chen, S., Koch, A., Kaplan, F., ... Klessig, D. F. (2015). Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications*, 6(7795), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms8795>
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual Reviews of Phytopathology*, 46, 101–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959.Role>
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion, 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>
- Miller, G., & Mittler, R. (2006). Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? *Annals of Botany*, 98, 279–288. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl107>
- Miller, G., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133, 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x>
- Minami, A., Nagao, M., Arakawa, K., Fujikawa, S., & Takezawa, D. (2003). Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal of Plant Physiology*, 160, 475–483.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Breusegem, F. Van. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2 / ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.08.004>
- Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
- Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Franco-zorrilla, J. M., García-Casado, G., ... Solano, R. (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0033-4>

- Mu, R., Cao, Y., Liu, Y., Lei, G., Zou, H., Liao, Y., & Wang, H. (2009). An R2R3-type transcription factor gene AtMYB59 regulates root growth and cell cycle progression in Arabidopsis. *Cell Research*, 1291–1304. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.83>
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack, C. (2006). The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiology*, 140(January), 249–262. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072348>
- Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Bowman, J. L., Tablin, F., & Crowe, J. H. (2006). Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 1226–1234. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.025>
- Oliver, J. P., Castro, A., Gaggero, C., Cascón, T., Schmelz, E. A., Castresana, C., & Ponce, I. (2009). *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta*, 230, 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0969-4>
- Ortiz-Ramírez, C., Hernandez-Coronado, M., Thamm, A., Catarino, B., Wang, M., Dolan, L., ... Becker, J. D. (2016). A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular Plant*, 9(February), 205–220. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.002>
- Pederson, E. R. A., Warshan, D., & Rasmussen, U. (2019). Genome Sequencing of *Pleurozium schreberi*: The Assembled and Annotated Draft Genome of a Pleurocarpous Feather Moss. *Genes, Genomes and Genetics*, 9(September), 2791–2797. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400279>
- Peng, Y., Wersch, R. Van, & Zhang, Y. (2018). Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(4), 403–409. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR>
- Perroud, P.-F., Haas, F. B., Hiss, M., Ullrich, K. K., Alboresi, A., Amirebrahimi, M., ... Rensing, S. A. (2018). The *Physcomitrella patens* gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *The Plant Journal*, 95, 168–182. <https://doi.org/10.1111/tpj.13940>
- Pétriacq, P., Stassen, J. H. M., & Ton, J. (2016). Spore Density Determines Infection Strategy by the Plant Pathogenic Fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiology*, 170(April), 2325–2339. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00551>
- 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. <https://doi.org/10.4061/2011/719873>
- Ponce de León, I., & Montesano, M. (2013). Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3178–3200. <https://doi.org/10.3390/ijms14023178>
- Ponce de León, I., Oliver, J. P., Castro, A., Gaggero, C., Bentancor, M., & Vidal, S. (2007). *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, 7(52). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-52>

- 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* . *Molecular Plant Pathology*, 13(8), 960–974. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2012.00806.X>
- Possart, A., Xu, T., Paik, I., Hanke, S., Keim, S., Hermann, H.-M., ... Hiltbrunner, A. (2017). Characterization of Phytochrome Interacting Factors from the Moss *Physcomitrella patens* Illustrates Conservation of Phytochrome Signaling Modules in Land Plants. *The Plant Cell*, 29(February), 310–330. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00388>
- Preston, J., Wheeler, J., Heazlewood, J., Li, S. F., & Parish, R. W. (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 40, 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02280.x>
- Qi, T., Wang, J., Huang, H., Liu, B., Gao, H., Liu, Y., ... Xie, D. (2015). Regulation of Jasmonate-Induced Leaf Senescence by Antagonism between bHLH Subgroup IIIe and III d Factors in *Arabidopsis*, 27(June), 1634–1649. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00110>
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J.-M. (2013). *Natural Products: phytochemistry, botany and metabolism*.
- Ravensdale, M., Bernoux, M., Ve, T., Kobe, B., Thrall, P. H., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2012). Intramolecular Interaction Influences Binding of the Flax L5 and L6 Resistance Proteins to their AvrL567 Ligands, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003004>
- Reddy, A. S. N., Ali, G. S., Celesnik, H., & Day, I. S. (2011). Coping with Stresses : Roles of Calcium- and Calcium / Calmodulin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, 23, 2010–2032. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084988>
- Renault, H., Alber, A., Horst, N. A., Lopes, A. B., Fich, E. A., Kriegshauser, L., ... Werck-Reichhart, D. (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications*, 8(March), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms14713>
- Rensing, S. A. (2017). Why we need more non-seed plant models. *New Phytologist*, 216, 355–360. <https://doi.org/10.1111/nph.14464>
- Rensing, S. A., Gof, B., Meyberg, R., Wu, S., & Bezanilla, M. (2020). The Moss *Physcomitrium (Physcomitrella) patens* : A Model Organism for Non-Seed Plants. *The Plant Cell*, 32(May), 1361–1376. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00828>
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., ... Boore, J. L. (2008). The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science*, 64(2008). <https://doi.org/10.1126/science.1150646>
- Reski, R., & Abel, W. O. (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta*, (165), 354–358.
- Richardt, S., Timmerhaus, G., Lang, D., Qudeimat, E., Correa, L. G. G., Reski, R., ... Frank, W. (2010). Microarray analysis of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling. *Plant Molecular Biology*, 72, 27–45. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9550-6>

- Ruibal, C., Castro, A., Carballo, V., Szabados, L., & Vidal, S. (2013). Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16 . 4. *BMC Plant Biology*, 13.
- Rushton, D. L., Tripathi, P., Rabara, R. C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A. K., ... Rushton, P. J. (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00634.x>
- Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F. E., Soyer, J. L., Tellier, A., & Croll, D. (2018). The Genome Biology of Effector Gene Evolution in Filamentous Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 21–40.
- Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S., & Böhmer, M. (2013). Guarding the Green : Pathways to Stomatal Immunity, 26(6), 626–632.
- Schaefer, D. G. (2002). A New Moss Genetics: Targeted Mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual Reviews of Plant Biology*, 53, 477–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135202>
- Schaefer, D. G., & Zryd, J.-P. (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 11(6), 1195–1206.
- Schaller, G. E., Kieber, J. J., & Shiu, S. (2008). Two-Component Signaling Elements and Histidyl-Aspartyl Phosphorelays. In *The Arabidopsis book* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1199/tab.0112>
- Schirawski, J., & Perlin, M. H. (2018). Plant – Microbe Interaction 2017 — The Good , the Bad and the Diverse. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1374). <https://doi.org/10.3390/ijms19051374>
- Schornack, S., Moscou, M. J., Ward, E. R., & Horvath, D. M. (2013). Engineering Plant Disease Resistance Based on TAL Effectors. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102255>
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A. K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., ... Chinchilla, D. (2010). Rapid Heteromerization and Phosphorylation of Ligand-activated Plant Transmembrane Receptors and Their Associated Kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9444–9451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096842>
- Schween, G., Gorr, G., Hohe, A., & Reski, R. (2003). Unique Tissue-Specific Cell Cycle in *Physcomitrella*. *Plant Biology*, 5, 50–58.
- Schween, G., Schulte, J., & Reski, R. (2005). Effect of Ploidy Level on Growth, Differentiation, and Morphology in *Physcomitrella patens*. *The Bryologist*, 108(1), 27–35.
- Schweizer, F., Fernández-calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., ... Reymond, P. (2013). Arabidopsis Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors MYC2, MYC3, and MYC4 Regulate Glucosinolate Biosynthesis, Insect Performance, and Feeding Behavior. *The Plant Cell*, 25(August), 3117–3132. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115139>
- Seetharam, A., Singh, U., Li, J., Bhandary, P., Arendsee, Z., & Wurtele, E. S. (2019). Maximizing prediction of orphan genes in assembled genomes. *bioRxiv*, 37–39.

- Seidl, M. F., & Thomma, B. P. H. J. (2017). Transposable Elements Direct The Coevolution between Plants and Microbes. *Trends in Genetics*, *xx*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.003>
- Senchou, V., Weide, R., Carrasco, A., Bouyssou, H., Pont-Lezica, R., Govers, F., & Canut, H. (2004). High affinity recognition of a *Phytophthora* protein by *Arabidopsis* via an RGD motif. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *61*, 502–509. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3394-z>
- Seo, P. J., & Park, C. (2010). MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*, (Cc), 471–483.
- Seo, P. J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J., Lee, Y. N., Kim, S., ... Park, C.-M. (2009). The MYB96 Transcription Factor Mediates Abscisic Acid Signaling during Drought Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *151*(September), 275–289. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144220>
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F. L., & Métraux, J. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *5*(274), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>
- Shah, J., Zeier, J., & Cameron, R. K. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance, *4*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
- Shin, R., Burch, A. Y., Huppert, K. A., Tiwari, S. B., Murphy, A. S., Guilfoyle, T. J., & Schachtman, D. P. (2007). The *Arabidopsis* Transcription Factor MYB77 Modulates Auxin Signal Transduction. *The Plant Cell*, *19*(August), 2440–2453. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050963>
- Song, C. J., Steinebrunner, I., Wang, X., Stout, S. C., & Roux, S. J. (2006). Extracellular ATP Induces the Accumulation of Superoxide via NADPH Oxidases in *Arabidopsis* 1, *140*(April), 1222–1232. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073072>
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Pelt, J. A. Van, Mueller, M. J., ... Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell*, *15*(March), 760–770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>
- Strauß, T., Poecke, R. M. P. Van, Strauß, A., Römer, P., Minsavage, G. V, Singh, S., ... Lahaye, T. (2012). RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(47), 19480–19485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212415109>
- Strullu-Derrien, C., Kenrick, P., Pressel, S., Duckett, J. G., Rioult, J., & Strullu-derrien, C. (2014). Fungal associations in Horneophyton ligneri from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants : novel insights into ancestral plant – fungus symbioses. *New Phytologist*, *203*, 964–979.
- Szabo, L. J., & Bushnell, W. R. (2001). Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America, 98(14), 7654–7655.

- Takezawa, D., & Komatsu, K. (2011). ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *Journal of Plant Research*, 124, 437–453.
<https://doi.org/10.1007/s10265-011-0410-5>
- Tanaka, K., Cao, Y., Qiu, J., & Liang, Y. (2014). Identification of a Plant Receptor for Extracellular ATP, (September). <https://doi.org/10.1126/science.343.6168.290>
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., & Stacey, G. (2014). Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants, 5(September), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00446>
- Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., & Talbot, N. J. (2012). Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease, 24(January), 322–335.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.092957>
- Theodoris, G., Inada, N., Freeling, M., & As, L. (2003). Conservation and molecular dissection of ROUGH SHEATH2 and ASYMMETRIC LEAVES1 function in leaf development, 100(11), 6837–6842.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Tierens, K. F. M., Broekaert, W. F., Leuven, K. U., & Mercierlaan, K. (1999). Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of Arabidopsis to Infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 121, 1093–1101.
- Tierens, K. F. M., Thomma, B. P. H. J., Bari, R. P., Garmier, M., Eggermont, K., Brouwer, M., ... Cammue, B. P. A. (2002). Esa1, an *Arabidopsis* mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by reactive oxygen generating compounds. *The Plant Journal*, 29(2), 131–140.
- Tomalova, I., Iachia, C., Mulet, K., & Castagnone-Sereno, P. (2012). The map-1 Gene Family in Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp.: A Set of Taxonomically Restricted Genes Specific to Clonal Species. *PLoS ONE*, 7(6), 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038656>
- Ton, J., & Mauch-Mani, B. (2004). b -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*, 38(2004), 119–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02028.x>
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C. J., Tsuda, Y., ... Katagiri, F. (2013). Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE Genetics*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004015>
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3(85), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
- van Wees, S. C. M., Swart, E. A. M. De, Pelt, J. A. Van, van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(15), 8711–8716.

Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(86), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>

Vos, M. De, Denekamp, M., Dicke, M., Vuylsteke, M., van Loon, L. C., Smeekens, S., & Pieterse, C. M. J. (2006). The *Arabidopsis thaliana* Transcription Factor AtMYB102 Functions in Defense Against the Insect Herbivore *Pieris rapae*. *Plant Signaling and Behavior*, 1(6), 305–311.

Walters, D., & Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.09.008>

Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>

Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L., & Mysore, K. S. (2012). Phytosterols Play a Key Role in Plant Innate Immunity against Bacterial Pathogens by Regulating Nutrient Efflux into the Apoplast. *Plant Physiology*, 158(April), 1789–1802. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189217>

Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., ... Leung, J. (2008). An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants. *Molecular Plant*, 1(2), 198-. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm022>

Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis , perception, signal transduction and action in plant stress response , growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111, 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>

Wei, Q., Zhang, F., Sun, F., Luo, Q., Wang, R., Hu, R., & Chen, M. (2017). Plant Science A wheat MYB transcriptional repressor TaMyb1D regulates phenylpropanoid metabolism and enhances tolerance to drought and oxidative stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Science*, 265(September), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.020>

Weng, J., & Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187, 273–285.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An ““ Electronic Fluorescent Pictograph ”” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets, (8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718>

Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R., & Rensing, S. A. (2010). The Molecular and Physiological Responses of *Physcomitrella patens* to Ultraviolet-B Radiation. *Plant Phy*, 153(July), 1123–1134. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154658>

Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., ... Després, C. (2012). The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid.

Cell Reports, (1), 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>

- Xiao, W., Liu, H., Li, Y., Li, X., Xu, C., Long, M., & Wang, S. (2009). A Rice Gene of De Novo Origin Negatively Regulates Pathogen-Induced Defense Response. *PLoS ONE*, 4(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004603>
- Xu, Z., Zhang, D., Hu, J., Zhou, X., Ye, X., Reichel, K. L., ... Yuan, J. S. (2009). Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S11-S3>
- Yadeta, K. A., Valkenburg, D., Hanemian, M., Marco, Y., & Thomma, B. P. H. J. (2014). The Brassicaceae-Specific EWR1 Gene Provides Resistance to Vascular Wilt Pathogens. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088230>
- Yin, Y., & Fischer, D. (2008). Identification and investigation of ORFans in the viral world, 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-24>
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>.From
- Yue, J., Meyers, B. C., Chen, J., Tian, D., & Yang, S. (2012). Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site – leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes, 1049–1063.
- Zhou, H., Lin-wang, K., Wang, F., Espley, R. V, Ren, F., Zhao, J., ... Han, Y. (2019). Activator-type R2R3-MYB genes induce a repressor-type R2R3-MYB gene to balance anthocyanin and proanthocyanidin accumulation. *New Phytologist*, 221, 1919–1934. <https://doi.org/10.1111/nph.15486>
- Zimmer, A. D., Lang, D., Buchta, K., Rombauts, S., Nishiyama, T., Hasebe, M., ... Reski, R. (2013). Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genomics*, 14(498), 1–20.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>