



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Tesis de grado en la Licenciatura en Ciencias Biológicas

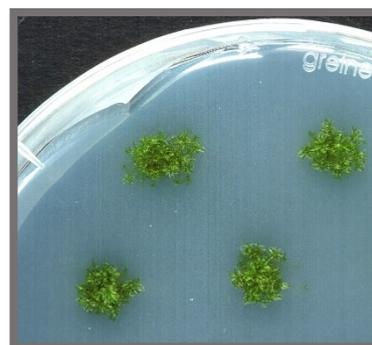
# “Expresión de la proteína de fusión PpCOR413im:FLAG en plantas de *Physcomitrium patens*”

**Bach. Nicasio Montes Ameixeiras**

Tutora: Dra. Cecilia Ruibal

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias



Montevideo, Uruguay

2023

## **Tribunal**

1. Dra. Cecilia Ruibal. Grado 2, Laboratorio de Biología Molecular Vegetal.
2. Dra. Leticia Pérez. Grado 3, Sección Genómica Funciona.
3. Dr. Juan José Marizcurrena. Grado 2, Sección Bioquímica.

## **Agradecimientos**

A mi familia, especialmente a mis padres, por todo el apoyo brindado y esfuerzo realizado para darme la mejor educación.

A mi tutora, Cecilia, un enorme agradecimiento por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto que desencadenó en mi tesis de grado, y por tenerme en cuenta y darme para adelante en muchos momentos durante el transcurso de mi trabajo de tesis.

A todos los integrantes del laboratorio de Biología Molecular Vegetal, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme despejando dudas y dando consejos para llevar a cabo el presente trabajo.

Por último, a los amigos que me deja esta carrera, por su compañía y apoyo en todos estos años, especialmente Agustín, María Pía, Diego, Lucas y Manuel.

## Resumen

El estrés generado por factores abióticos como son las temperaturas extremas y la falta o el exceso de agua, representa frecuentemente la primera causa de pérdida de rendimiento en los cultivos. Las plantas responden a estos tipos de estrés tanto a nivel molecular, celular, como fisiológico. Si bien los distintos factores de estrés inducen en las plantas la expresión de numerosos genes, la mayoría de estos no tienen una función asignada, y por lo tanto se desconoce si cumplen un rol en las respuestas adaptativas al estrés.

*Physcomitrium patens*, constituye un modelo vegetal con grandes ventajas para realizar estudios de genética reversa, por tener una alta frecuencia de recombinación homóloga, haciendo posible la inserción dirigida de ADN mediante reemplazo alélico. Esto, y el hecho de que presenta una alta tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico confieren a este organismo ventajas significativas para el estudio funcional de genes y proteínas involucradas en la tolerancia al estrés.

Nuestro grupo se ha centrado en la búsqueda e identificación de genes nuevos de *P.patens* con posible función en la tolerancia al estrés salino, osmótico, y por altas o bajas temperaturas. En este sentido, se aisló un gen perteneciente a la familia de proteínas ampliamente conservadas en el reino vegetal WCOR413 (Wheat Cold Regulated), denominada PpCOR413im. Se demostró que PpCOR413im tiene localización cloroplástica y se encuentra involucrado en la respuesta adaptativa a la luz, posiblemente mediante la protección del aparato fotosintético durante el estrés.

En el presente trabajo se generaron plantas transgénicas de *P.patens* que sobreexpresen el gen codificante para PpCOR413im fusionado al gen que codifica para la proteína FLAG (PpCOR413im:FLAG). Esta herramienta será utilizada para poder determinar con más exactitud la ubicación subcelular de PpCOR413im dentro del cloroplasto, y poder realizar ensayos de co-inmunoprecipitación, para así determinar con que proteínas se encuentran interactuando PpCOR413im.

# Índice

I. Introducción.....	1
I.1. <i>Physcomitrium patens</i> como organismo modelo.....	3
I.2. Genes COR.....	5
II. Materiales y Métodos .....	7
II.1. Material vegetal y condiciones de cultivo .....	7
II.2. Cepas y cultivos de microorganismos.....	8
II.3. Diseño de construcción de fusión PpCOR413im:FLAG .....	8
II.4. Generación de plantas transgénicas en <i>P.patens</i> .....	9
II.5. Extracción de ADN genómico .....	10
II.6. Análisis por Western Blot .....	10
II.7. Caracterización molecular de plantas generadas .....	11
III. Objetivos .....	12
III.1. Objetivo general:.....	12
III.2. Objetivos específicos: .....	12
IV. Resultados y Discusión.....	12
IV.1. Generación de una construcción génica para la expresión de PpCOR413im:FLAG.....	12
IV.2. Transformación de protoplastos de <i>P.patens</i> con la construcción génica y caracterización molecular .....	13
V. Conclusiones .....	16
VI. Perspectivas .....	17
VII. Referencias.....	18

# I. Introducción

El cambio climático es una gran amenaza para la productividad de los cultivos que afecta la seguridad alimentaria a nivel global. Las actividades humanas han aumentado los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico llevando a un incremento en la temperatura global de 1-2°C y desencadenando un impacto negativo en la producción agrícola y en los ecosistemas (Watts *et al.*, 2021). Este incremento de temperaturas se encuentra acompañado de inundaciones, sequías, temperaturas anómalas, y cambios en las condiciones del suelo que afectan drásticamente el rendimiento de los cultivos (St. Clair y Lynch, 2010; Watts *et al.*, 2021). Por otro lado, el incremento de la población, que se estima que alcance los 8.5 billones de habitantes para el año 2030 (Naciones Unidas, 2020) y el subsecuente aumento en la demanda de alimentos plantean un desafío para la producción agrícola mundial. El fenómeno del cambio climático y el incremento de la población, en conjunto con la competencia por recursos finitos como agua y suelo, hacen de la búsqueda de soluciones para la adaptación y mejora de los cultivos un tema de vital importancia. Maximizar el rendimiento y aumentar el valor nutricional de los cultivos como también mejorar la tolerancia y adaptación frente a condiciones de estrés, son distintas estrategias a considerar para enfrentar las posibles adversidades actuales y futuras.

Las plantas, siendo organismos que no pueden desplazarse, necesitan producir respuestas que les permitan adaptarse a ambientes que cambian continuamente, los cuales a menudo son adversos o generan estrés en su crecimiento y desarrollo. Estas condiciones ambientales adversas incluyen estrés biótico, como infecciones por virus, bacterias y hongos o ataque de plagas herbívoras, y estrés abiótico. El estrés abiótico hace referencia a condiciones climáticas o edáficas subóptimas que afectan negativamente la homeostasis celular y que, en última instancia, perjudican el crecimiento y la aptitud de los cultivos (Mickelbart, *et al.*, 2015). Este tipo de estrés incluye situaciones como exceso o deficiencia de agua, toxicidad debido a iones como Al<sup>3+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> (en particular, exceso de sodio), carencia de iones como Fe<sup>3+</sup>, N, P, S y Zn<sup>2+</sup>, temperaturas extremas y ozono (O<sub>3</sub>). Cómo hacen las plantas para detectar y adaptarse a estos factores son preguntas de gran relevancia biológica. A su vez, el entendimiento de los mecanismos moleculares, en conjunto con las herramientas actuales de edición y modificación genética, pueden permitir la mejora y el mayor entendimiento de los mecanismos de resistencia a los distintos tipos de estrés. De esta forma incrementar el rendimiento de los cultivares y reducir el impacto ambiental de la actividad agrícola. (Jeyasri *et al.*, 2021).

El estrés abiótico, como el estrés por sequía y temperaturas extremas, genera grandes estragos en los rendimientos de los cultivares. Las plantas son capaces de sentir estos estímulos y, mediante cascadas de transducción de señal y activación de distintas vías metabólicas, pueden generar cambios transcripcionales, traduccionales, metabólicos y fisiológicos que se traducen

en la activación de mecanismos de tolerancia y restauración de la homeostasis celular (Zhu, 2016). Cada tipo de estrés provoca respuestas que son, en cierta medida, exclusivas. Esto se debe a que diferentes estímulos, como la sequía, el frío, la salinidad y la alta intensidad de luz, generan perfiles de transcripción distintos, con solo unos pocos genes que se solapan entre los diferentes estímulos (Mittler, 2006; Suzuki 2014). Además, la complejidad de las respuestas de las plantas a diferentes tipos de estrés se incrementa cuando se enfrentan a estímulos combinados, ya que activan genes de respuesta que no se expresan cuando los estímulos se presentan de manera individual (Suzuki 2014). Estos aspectos resaltan la importancia del estudio molecular de la respuesta de las plantas a estrés, y del intento de emular cada vez más las condiciones del laboratorio con las condiciones de campo.

Una señal puede ser detectada por una molécula sensora modificando aspectos de los distintos organelos y activando factores de transcripción que desencadenan la expresión de *sets* génicos particulares. Así, una señal generada por los organelos puede causar cambios en la expresión génica y actividades celulares para restaurar la homeostasis bajo los efectos de estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2018). Existen elementos compartidos entre los distintos mecanismos de respuesta a estrés y patrones repetidos que median la señalización bioquímica frente a estos estímulos. La red CBL-CIPK (en inglés, *calcineurin B-like proteins* y *CBL-interacting protein kinases*) es un sistema de señalización intracelular central frente al estímulo por iones, estrés por sequía, y frío, y tanto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y señalización por calcio y ácido abscísico son protagonistas en los distintos tipos de estrés (Zhang *et al.*, 2018; Zhu, 2016).

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona central en varios procesos fisiológicos vegetales y en respuestas a distintos tipos de estímulos estresantes ambientales. Está involucrada en los procesos de desarrollo de semilla, crecimiento de tallos y raíces, inhibición de la germinación, senescencia, y cumple funciones decisivas en la tolerancia a estrés por sequía, exceso de sales, bajas temperaturas y toxicidad por metales pesados (Sah *et al.*, 2016; Vishwakarma *et al.*, 2017). Se ha observado la acumulación endógena de ABA frente a estos tipos de estrés en distintas especies de plantas y cultivares, notando una mejora en sus respuestas al aplicarse esta fitohormona de manera exógena (Sah *et al.*, 2016; Vishwakarma *et al.*, 2017). Por otro lado, también ejerce un rol en la expresión de distintos grupos génicos, asociados a procesos fisiológicos y respuestas a estrés, como lo son genes que codifican para el aparato fotosintético, genes codificantes para enzimas asociadas al metabolismo y peroxidasas (antioxidantes), factores de transcripción y proteínas COR ("Cold Regulated") (Hajela *et al.*, 1990; Thomashow, 1999; Rook *et al.*, 2006; Vishwakarma *et al.*, 2017).

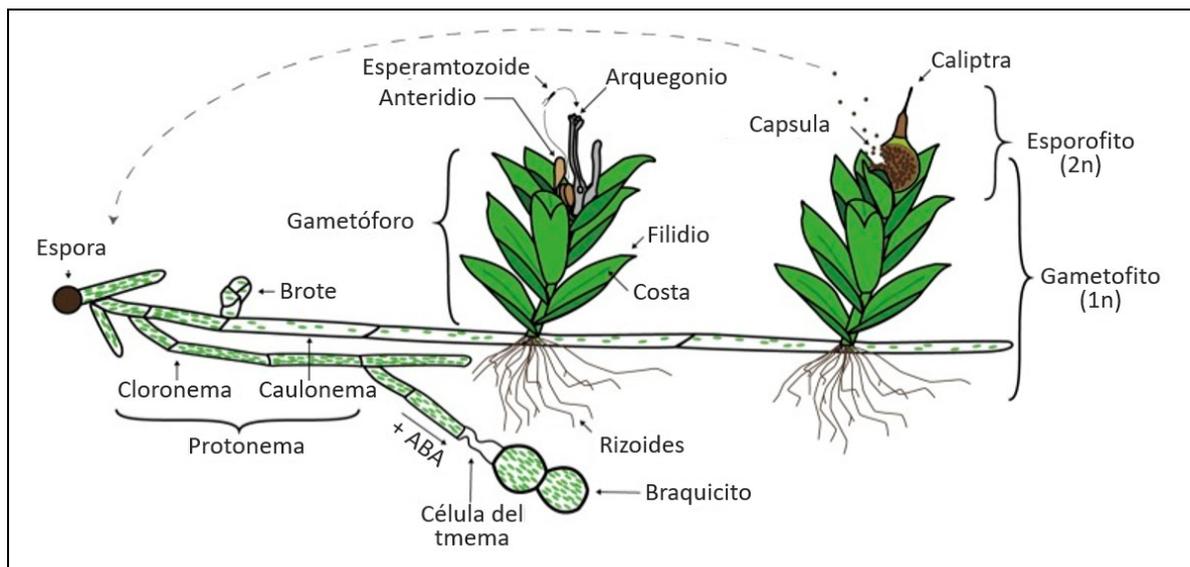
## **I.1. *Physcomitrium patens* como organismo modelo**

*P.patens* Gransden fue colectada y cultivada por primera vez por H. K. L. Whitehouse, quien tomó las primeras muestras de un sitio en Gransden Wood (Huntingdonshire, Inglaterra) en 1962 (Rensing *et al.*, 2020). En los siguientes años se ha empleado a esta planta para generar organismos genéticamente modificados mediante mutagénesis química o radiación. De esta manera, una de las peculiaridades principales de *P.patens* es que esta planta posee uno de los mecanismos de reparación de rupturas de doble hebra en el ADN (DSB, *double strand breaks*) que permite la inserción de secuencias en lugares específicos del genoma. Mientras que la integración de ADN en los genomas de eucariotas superiores ocurre usualmente tras la reparación de DSB por recombinación ilegítima (IR) vía microhomologías y unión de extremos no homólogos (*NHEJ, non-homologous endjoining*), *P.patens* es una excepción a la regla, dado que la reparación de DSB se da por recombinación homóloga (HR) a muy altas frecuencias al emplear ADN exógeno con homología a su genoma (Kamisugi *et al.*, 2006). Así se reportan los primeros mutantes en este organismo asociados a alteraciones en distintos procesos como nutrición, respuesta hormonal, morfología, y respuesta a la gravedad (Rensing *et al.*, 2020). En el trabajo de Schaefer *et al.*, (1991) se reportó por primera vez un protocolo de transformación alternativo a los métodos tradicionales de transgénesis, donde sugerían la posibilidad de integración de construcciones portadas en vectores mediante recombinación homóloga. Sin embargo, no fue hasta el año 1997 en donde el mismo grupo reportó evidencias del mecanismo por recombinación homóloga en esta planta (Schaefer y Zryd, 1997).

En la actualidad y con el avance de la biología molecular y sus herramientas, se han generado plantas genéticamente modificadas de *P.patens* empleando técnicas como ARN de interferencia para la generación de *knock outs* de genes esenciales (Bezanilla *et al.*, 2003, 2005; Nakaoka *et al.*, 2012) y hasta con la tecnología CRISPR-Cas (Collonier *et al.*, 2017). Incluso se ha utilizado a esta planta como huésped alternativo para la producción de proteínas recombinantes, gracias a su fácil y barato cultivo, su seguridad, y su capacidad de generar modificaciones postraduccionales complejas, como la glicosilación proteica (Reski *et al.*, 2015). Haciendo uso de dicho modelo vegetal, se han producido proteínas de gran valor comercial, que van desde productos del metabolismo secundario, proteínas humanas para el tratamiento de distintas enfermedades y cáncer, y hasta proteínas empleadas en la industria del perfume y cosmética (Reski *et al.*, 2015).

*P.patens* es una briofita avascular monodioica que se reproduce a partir de esporas (Rensing *et al.*, 2020). Al igual que todas las plantas terrestres posee un ciclo de vida haplodiplonte, en el que el gametofito haploide y el esporofito diploide son multicelulares. Sin embargo, al tratarse de un musgo, durante su crecimiento vegetativo predomina el estado haploide (Figura 1), opuesto a lo que sucede en plantas vasculares (Rensing *et al.*, 2020). Esta es una característica

que la hace un modelo interesante para el trabajo en genética y biología molecular. Dado que transcurre la mayor parte de su ciclo de vida en estado haploide, el aislamiento y selección de mutantes se facilita, ya que no es necesario realizar retrocruzas para la obtención de líneas isogénicas (Reski y Frank, 2005). A su vez, la ausencia de fenómenos de dominancia y recesividad durante la fase haploide dominante, permite que los análisis genéticos sean más simples que en especies con una fase diploide dominante (Cove, 2005).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Physcomitrium patens*. Presenta alternancia de generaciones entre la fase dominante haploide (gametofito) y la fase diploide (esporofito). Imagen tomada de Rensing *et al.*, (2020).

Dado su pequeño tamaño, *P.patens* se puede cultivar en placas de Petri y obtener nuevas colonias a partir de pequeñas partes de tejido por lo que cuenta con la ventaja de ser fácilmente manipulable *in vitro*. A su vez, puede crecer en medios puramente minerales sin el agregado de otros compuestos orgánicos como antibióticos, fuentes de carbono y reguladores de crecimiento (Reski *et al.*, 2015), y puede cultivarse a partir de una única espora o protoplasto generando colonias en dos a tres meses de tiempo (Ashton y Cove, 1977). Por otro lado, cuenta con los genomas nuclear, plasmídico y mitocondrial secuenciados (Rensing *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta el último ensamblado genómico, *P.patens* cuenta con 27 cromosomas nucleares, y la anotación genómica más reciente revela más de 32000 genes y 86000 transcritos codificantes para proteínas (Rensing *et al.*, 2020).

Desde un punto de vista evolutivo, los musgos se sitúan a medio camino entre las algas unicelulares y las plantas con semillas complejas, que divergieron hace alrededor de mil millones de años (Lang *et al.*, 2008) y presentan grandes similitudes con las plantas superiores, como también características únicas. Por un lado, las vías de señalización para las fitohormonas auxinas, citoquininas y etileno se encuentran conservadas en musgos y plantas

vasculares como también, en un alto grado, la respuesta a estrés abiótico mediante ABA y factores de transcripción ortólogos (Müller *et al.*, 2015). A su vez, también existen genes conservados asociados a la formación de células conductoras de agua (funcionales en el esporofito de plantas vasculares y en el gametofito de plantas avasculares), genes involucrados en el cierre de estomas (únicamente operando en el esporofito de musgos), y genes asociados al desarrollo de cloroplastos (Müller *et al.*, 2015). En contraste, al tratarse de un musgo, *P.patens* es una planta poiquilohídrica, es decir, carece de la habilidad de prevenir la desecación, por lo cual ha desarrollado mecanismos eficientes de reparación homóloga del ADN, adaptación a alta intensidad lumínica y ciclos de deshidratación y rehidratación (Lang *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, tiene un metabolismo complejo debido a la redundancia génica y a vías enzimáticas no encontradas en plantas con semilla, como también cuenta con una mayor presencia de genes involucrados en el metabolismo secundario (Lang *et al.*, 2008, Reski *et al.*, 2015). Por último, es un modelo vegetal que destaca por su alto grado de resistencia a distintos tipos de estrés abiótico. Comparado con otras plantas, *P.patens* es altamente tolerante al estrés salino, osmótico y al estrés por deshidratación (Frank *et al.*, 2005). En un estudio realizado en 2005, Frank *et al.*, demostró que estas plantas son capaces de resistir concentraciones de sorbitol y cloruro de sodio de hasta 500mM y 600mM respectivamente, como también de recuperar el 92% del peso fresco luego de un tratamiento de deshidratación (Frank *et al.*, 2005). Este último aspecto, agrega otro punto de interés para el uso de *P.patens* como modelo de estudio para los mecanismos de estrés abiótico, y define a la especie como tolerante a la sequía (Frank *et al.*, 2005). En un trabajo reciente, Khandelwal y colaboradores (2010) demostraron que cuando se pretratan plantas de *P.patens* con ABA y luego son deshidratadas totalmente, estas plantas son capaces de recuperarse de la desecación cuando se vuelven a rehidratar. La generación de líneas de *P.patens* donde los genes codificantes para los factores de transcripción ABI3 fueron deletados, mostró que las vías de expresión de genes regulados tanto por ABA como por los factores de transcripción ABI3, se encuentran involucrados en la protección celular al déficit de agua y son esenciales para la recuperación de la desecación en las briofitas (Khandelwal *et al.*, 2010). Estos estudios en su conjunto le atribuyen al ABA una función crucial en las respuestas de tolerancia a diversos factores de estrés en *P.patens*.

## **I.2. Genes COR**

Los genes COR son una serie de genes que se identificaron por primera vez en *Arabidopsis thaliana* en asociación al proceso de aclimatación al frío (Thomashow *et al.*, 1999). Este proceso consiste en la exposición de plantas a bajas temperaturas no congelantes y la subsecuente adquisición de tolerancia a temperaturas bajo cero. La estabilización de las membranas lipídicas es un punto clave durante este proceso debido a que son los sitios principales en sufrir

daño por congelamiento (Thomashow *et al.*, 1999). Este daño en las membranas está asociado a la deshidratación causada por la exposición a bajas temperaturas, y también se pueden producir otros fenómenos negativos asociados a temperaturas bajo cero como producción de ROS, ruptura celular asociada a adhesiones celulares y desnaturalización de proteínas (Thomashow *et al.*, 1999). Durante el fenómeno de aclimatación al frío se produce la acumulación de proteínas COR pertenecientes a distintas familias, inclusive la familia de las proteínas LEA que pueden cumplir un rol durante la aclimatación al frío en la estabilización de las membranas lipídicas (Thomashow *et al.*, 1999). Otros mecanismos posibles involucrados en la estabilización pueden ser cambios en la composición lipídica, acumulación de sacarosa y otros azúcares simples, y activación mecanismos antioxidantes y expresión de chaperonas (Thomashow *et al.*, 1999).

Una de las familias de genes COR, poco caracterizada, es la de la familia COR413. Estos genes codifican para proteínas transmembrana de función desconocida (Breton *et al.*, 2003). Las proteínas COR413 se dividen en dos subclases en función de la localización intracelular predicha. Un grupo de proteínas se ubican en la membrana tilacoidal o membrana interna del cloroplasto (COR413-MT/MI) y otro grupo en la membrana plasmática (COR413-MP) (Breton *et al.*, 2003).

Los genes COR413 se han descrito en varias especies de plantas, como *Arabidopsis thaliana*, *P.patens*, arroz, sorgo, tomate, algodón, trigo, colza, *Xerophyta viscosa* y *Chrysanthemum*. En algunas de estas, asociados a una mejora frente a condiciones de baja temperatura y también a otros tipos de estrés abiótico como estrés osmótico, estrés salino, calor y tolerancia a la desecación (Ruibal *et al.*, 2020). A su vez, se observó que los genes pertenecientes a esta familia se expresan positivamente por ABA, bajas temperaturas, y tratamientos de deshidratación (Ruibal *et al.*, 2020).

La sobreexpresión simultánea de los genes XvSAP1 y PsCOR413pm2 pertenecientes a la familia COR413, resultó en un aumento en la tolerancia a la salinidad, estrés osmótico, calor y bajas temperaturas en *A.thaliana* (Garwe *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2018). De manera similar, la sobreexpresión de un gen codificante de una proteína cloroplástica de la familia COR413 de tomate (SICOR413IM1) llevó a un aumento en la tolerancia a la sequía en plantas de tabaco (Ma *et al.*, 2017).

En *P.patens* se identificaron cinco genes que codifican para proteínas de la familia COR413. Por comparación de secuencia con otras proteínas de la misma familia pertenecientes a otras especies, cuatro de las proteínas identificadas se vieron asociadas a proteínas COR ubicadas en la membrana plasmática, y una única proteína asociada a proteínas COR de la membrana tilacoidal/membrana interna del cloroplasto (Ruibal *et al.*, 2020). El gen codificante para la única proteína COR cloroplástica, denominado PpCOR413im, fue aislado de una librería enriquecida

en genes regulados positivamente por ABA (Ruibal *et al.*, 2020). Dicho gen codifica para una proteína de 258 aminoácidos y 27.02 kDa con un único dominio transmembrana COR413 conservado y un potencial péptido de tránsito al cloroplasto (Ruibal *et al.*, 2020).

Ensayos transitorios en protoplastos de *Physcomitrium* y en plantas de *Arabidopsis* estables que sobreexpresan la proteína de fusión PpCOR413im:GFP, pudieron demostrar que esta proteína se localiza en los cloroplastos de las células vegetales (Ruibal *et al.*, 2020). Sin embargo, no se pudo visualizar con exactitud la localización dentro de este organelo, debido a las técnicas de microscopía utilizadas. Basándose en esta localización cloroplástica y en las similitudes estructurales entre PpCOR413im y AtCORIM-1, podría tratarse de una proteína integral de la membrana interna del cloroplasto (Okawa *et al.*, 2008; 2014), aunque todavía queda por dilucidar si es así. Mediante la generación de un mutante knockout por recombinación homóloga en *Physcomitrium*, Ruibal *et al.*, demostraron que la interrupción de PpCOR413im afectó el crecimiento y desarrollo de las plantas luego de tratamientos con altas intensidades de luz. La localización subcelular de PpCOR413im llevó a sugerir que este tipo de proteínas puede desempeñar una función estructural en los cloroplastos, al preservar la estabilidad de la membrana de los mismos bajo estrés. Para comprender mejor esta hipótesis, en esta publicación, los autores utilizaron microscopía electrónica para investigar si la interrupción de PpCOR413im generó alteraciones en la ultraestructura de estos organelos. Los resultados demuestran que los cloroplastos de las plantas salvajes crecidas en condiciones normales presentan un sistema de membranas internas bien estructurado, con presencia de varias granas tilacoidales y pocos gránulos de almidón en el estroma. Sin embargo, los cloroplastos de las plantas mutantes en las mismas condiciones presentaron varios gránulos de almidón y pocas granas tilacoidales bien formadas, mostrándose en una orientación más relajada y desorganizada. Esta aparente distorsión en la ultraestructura de los cloroplastos observada en el mutante para el gen PpCOR413im es consistente con el rol estructural de esta proteína en la estabilización de la membrana de los cloroplastos (Ruibal *et al.*, 2020).

En este trabajo de tesis, se generaron plantas de *P.patens* transgénicas que sobreexpresan el gen PpCOR413im fusionado a la proteína FLAG, mediante transformación de protoplastos con polietilenglicol. Este trabajo, enmarcado en un proyecto CSIC I+D, será muy importante para poder continuar con el estudio de esta proteína de respuesta al estrés.

## **II. Materiales y Métodos**

### **II.1. Material vegetal y condiciones de cultivo**

*Physcomitrium patens* Grandsen tipo salvaje (Schaefer *et al.*, 1991) se utilizó para la transformación estable. Los cultivos vegetales tanto en estado de protonema como de gametofito folioso (en forma de colonias) se mantuvieron y subcultivaron *in vitro* en medio

Hoagland's (1,6g/L) + BCDAT (1mM MgSO<sub>4</sub>; 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,5; 10mM KNO<sub>3</sub>; 45μM FeSO<sub>4</sub>; 4mM tartrato de amonio) + 1mM CaCl<sub>2</sub> y 10g/L de agar, sobre discos de celofanes estériles según fue descrito por Ashton y Cove (1977). Para la micropropagación se cortaron las colonias con pinzas estériles y los fragmentos de plantas se transfirieron a medio nuevo. La generación de protonema se realizó mediante la maceración en mortero estéril con 2mL de agua doblemente destilada estéril, o mediante la utilización de un equipo automático ultraturrax. Las plantas crecieron a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas luz y un flujo de fotones de 50mol/m<sup>2</sup>.seg.

Las plantas transformantes se regeneraron en el antibiótico de selección higromicina a una concentración final de 25μg/mL.

## II.2. Cepas y cultivos de microorganismos

Se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli* (*E. coli*), incubada en medio Luria-Bertani [(LB) 1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl] líquido o sólido (LB 1% agar). Para la selección de bacterias transformantes con el vector de destino se agregó Ampicilina (100μg/mL) a los distintos cultivos.

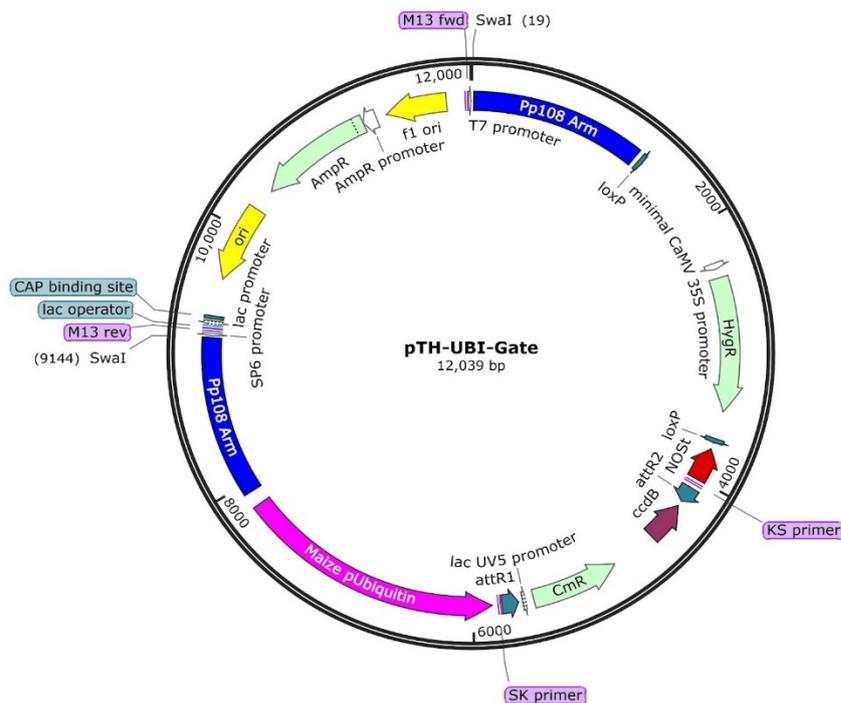
## II.3. Diseño de construcción de fusión PpCOR413im:FLAG

La secuencia codificante del gen PpCOR413im fusionada al tag FLAG se sintetizó utilizando los servicios de empresa GenScript (<https://www.genscript>). Esta secuencia, clonada en el vector pBlueScript KS (+), se sintetizó agregando los sitios flanqueantes attL1 (5' gtaaaacgacggccag 3') y attL2 (5' gtcatagctgttctctg 3'), para la posterior recombinación por el sistema Gateway (Figura 2).



**Figura 2.** Representación gráfica de la secuencia de PpCOR413im con el tag FLAG. Se visualizan los sitios attL1 y attL2 de recombinación por Gateway y el sitio de hibridación de los primers M13 forward y reverse. La secuencia tiene un largo de 1089 pares de bases.

La secuencia se amplificó mediante la utilización de primers M13 [F: 5' gtaaaacgacggccag 3', R: 5' caggaaacagctatgac 3'] y se realizó la reacción de recombinación del producto de PCR con la enzima LR clonasa (Gateway) en el vector de destino pTH-UBI (<https://sites.dartmouth.edu/bezanillalab>, figura 3). Este vector contiene los sitios del locus 108 del genoma de *P.patens*, los cuales quedarán flanqueando la secuencia de fusión, permitiendo la inserción por recombinación homóloga en este locus. Además, contiene el gen de resistencia para el antibiótico higromicina en la planta y el promotor constitutivo de la ubiquitina de maíz.



**Figura 3.** Vector de destino pTH-UBI-Gate. El gen COR413 fusionado a flag se encontrará bajo la regulación del promotor de ubiquitina de maíz. A su vez, el vector contiene los sitios Pp108 con homología al locus Pp108 presente en el cromosoma 20 de *P.patens*. Sitio donde, por recombinación homóloga, se insertará la construcción deseada.

Para el chequeo de la correcta incorporación del vector final en bacterias electrocompetentes se realizó PCR empleando primers específicos para la secuencia codificante de PpCOR413im [F: (c) 5' tgatggtaccgatggcctctcacatcgt 3', R: 5' cacagcggccgcgaaaattcaatcac 3'], y el primer directo (F) para PpCOR413im con el primer reverso que hibrida en la secuencia del terminador NOS [(d) 5' ttgttttctatcgcgtattaaatgt 3']. Se esperan tamaños de amplicones de 780pb y 1070pb respectivamente para cada par de primers.

#### II.4. Generación de plantas transgénicas en *P.patens*

La generación de protoplastos de *P.patens* y la subsecuente transformación se realizó según Schaefer *et al.* 1991. Primero se generaron protoplastos de protonemas con dos a cinco pasajes y 5 a 7 días de antigüedad usando driselasa al 0.2% (m/v) en una solución de D-manitol 0.44M, e incubándose a 22°C durante toda la noche en oscuridad. Luego se aislaron los protoplastos utilizando filtros de 100µm y se sometieron a tres lavados con 10mL de solución CaPW (8% m/v D-manitol, 0.73% m/v CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), mediante centrifugación a 80xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los protoplastos aislados se resuspenden en solución 3M (8% D-manitol m/v, 1.5% v/v MgCl<sub>2</sub>, 0.1% MES monohidrato pH 5.6), a una concentración final

de  $1.6 \times 10^6$  protoplastos/mL, y se incubaron con 15  $\mu$ g de plásmido de ADN linealizado (digerido con la enzima de restricción SwaI). Se mezclan con 300  $\mu$ l de polietilenglicol 8000 40% (m/v) y se incuban a 45°C durante 5 minutos en baño de agua. Luego de 4 agregados consecutivos con 1 mL de CaPW, los protoplastos se mezclan con 300  $\mu$ l de medio líquido de regeneración de protoplastos (PRML) [8% m/v D-manitol, 2% v/v CaCl<sub>2</sub> 500mM en medio Hoagland's] y 2.5 mL de medio de regeneración de protoplastos superior (PRMT) [8% m/v D-manitol, 2% v/v CaCl<sub>2</sub> 500mM, 0.5% m/m agar, en medio Hoagland's], para luego incubarse durante 7 días a 22°C en medio de regeneración de protoplastos base (PRMB) [8% m/v D-manitol, 1% m/m agar, en medio Hoagland's]. Finalizado este tiempo, se transfirieron a medio Hoagland's suplementado con 25  $\mu$ g/mL de higromicina durante 14 días. Las colonias emergentes resistentes se transfirieron nuevamente durante 14 días a placas con medio normal sin selección, para luego transferirse una vez más a medio con selección. Las colonias resistentes se analizaron finalmente en cuanto a la correcta incorporación de la construcción de fusión en el locus deseado.

## **II.5. Extracción de ADN genómico**

Para la extracción de ADN genómico se molieron aproximadamente 100mg de colonias de *P.patens* salvajes y mutantes con nitrógeno líquido, se agregaron 700  $\mu$ L de buffer de extracción (2% w/v de CTAB; Tris 1M pH 8; EDTA 0.5M; NaCl 3M; 0.1mg de ARNasa; 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol) + 7  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol y se incubó a 65°C en baño de agua durante 30 minutos (mezclando cada 10 minutos por inversión). Se deja enfriar y se agregan 600  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (relación 24:1), y se mezcla por inversión durante 15 minutos. Se centrifuga durante 10 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se agrega 1 volumen de isopropanol. Luego de incubar por lo menos durante 1 hora a -20°C, se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm, se descarta el sobrenadante y se agregan 300  $\mu$ L de etanol 70%. Se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 14000 rpm, se descarta el sobrenadante, se seca el pellet y se resuspende con 70  $\mu$ L de agua bidestilada

## **II.6. Análisis por Western Blot**

Se extrajeron proteínas solubles de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook et al., 1989), el cual consistió en moler el material vegetal en un mortero previamente enfriado, trabajando a 4°C con buffer de extracción (50mM Tris pH 7.2, 250mM sacarosa, 5mM EDTA, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1mM PMSF). Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C. Se aisló el sobrenadante y se realizó una centrifugación adicional con las mismas características que la anterior.

Para determinar la concentración proteica de los extractos obtenidos se utilizó el reactivo de Bio-Rad (dye reagent concentrate Coomassie brilliant blue G-250), y se siguió el protocolo descrito por Bradford (Bradford, 1976), basado en la afinidad de las proteínas por el azul de Coomassie. Se preparó una solución concentrada de albúmina bovina (BSA) como proteína estándar, y a partir de esta solución madre se prepararon varias diluciones con concentraciones finales de 1, 2, 4, 8, 16 y 25 µg/µL. Se pipetearon 0,8 mL de estas diluciones en tubos limpios y se añadieron 0,2 mL de reactivo Bradford. Para valorar las muestras se añadieron entre 5 y 10 µL de éstas más 0,2 mL de reactivo Bradford, y se completó con agua destilada. Se determinó la absorbancia a 595 nm, tanto de la curva patrón de calibración como de las muestras. La concentración de proteína de las muestras se calculó extrapolando a partir de los valores de absorbancia de la recta patrón, teniendo en cuenta el volumen de muestra añadido.

Para el ensayo de Western Blot 10 µg de proteínas solubles fueron separadas en un gel 10% poliacrilamida y bloteadas en membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, GE Healthcare) durante toda la noche. Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.4) con 5% w/v de leche descremada en polvo y 0.2% de Tween-20 por una hora a temperatura ambiente. Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo comercial anti-FLAG producido en ratón (Sigma Aldrich, F3165) diluido 1/4000 en TBS + 0.1% Tween. Se utilizó el anticuerpo secundario IRDye 800CW (cabra anti-conejo, LI-COR), diluido 1/5000. Las proteínas fueron visualizadas en un G-Box. Las membranas fueron luego incubadas con 0.5% Ponceau Red durante 10 minutos y lavadas con agua destilada, visualizándose de esta manera la subunidad mayor de la proteína Rubisco, utilizada como control de carga de las muestras.

## **II.7. Caracterización molecular de plantas generadas**

La presencia del gen que codifica para la resistencia al antibiótico higromicina en el genoma de *P.patens* fue confirmado mediante la utilización de primers específicos [(a) F: 5' gagcctgacctattgcatctc 3' (b) R: 5' gatgttgccgacctctgtatt 3'], que generan un amplicón esperado de 442 pb. La incorporación de la construcción génica PpCOR413im:FLAG en el locus 108 fue confirmada por PCR utilizando un primer directo que hibrida en la secuencia codificante del gen PpCOR413im [(c) 5' tgatggtaccgatggcctctcacatcgt 3'] y un primer reverso que hibrida en el terminador NOS [(d) 5' ttgtttctatcgcgtattaaatgt 3'], obteniéndose un amplicón esperado de 1070 pb.

Además, la correcta expresión de la proteína de fusión fue confirmada mediante ensayos de Western blot a partir de muestras de proteínas totales extraídas de plantas salvajes y transgénicas controles, utilizando el anticuerpo específico anti-FLAG.

## III. Objetivos

### III.1. Objetivo general:

El objetivo general de esta tesis es generar plantas transgénicas de *P.patens* que sobreexpresen el gen *PpCOR413im* fusionado a FLAG. Esta herramienta será utilizada para conocer con exactitud la localización de PpCOR413im dentro del cloroplasto, y sobre todo, para poder determinar las proteínas que podrían interactuar con PpCOR413im mediante co-inmunoprecipitación, las cuales nos darán idea del rol que cumple en los cloroplastos.

### III.2. Objetivos específicos:

1. Generación de una construcción génica para la expresión de PpCOR413im:FLAG
2. Transformación de protoplastos de *P.patens* con la construcción génica
3. Caracterización molecular del transgénico generado

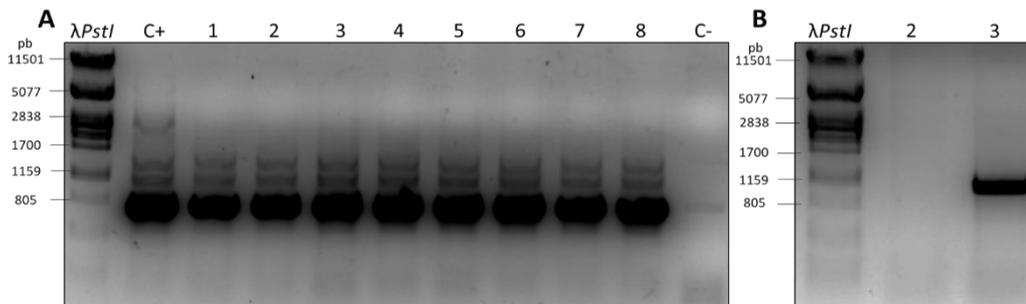
## IV. Resultados y Discusión

### IV.1. Generación de una construcción génica para la expresión de PpCOR413im:FLAG

Con el fin de determinar con que proteínas interactúa PpCOR413im y en que compartimento del cloroplasto se encuentra localizada esta proteína, es que en este proyecto de tesis se generó una línea de *P.patens* estable que expresa la proteína de fusión PpCOR413im:FLAG, controlada bajo el promotor constitutivo de ubiquitina. Mediante esta herramienta se podrán realizar ensayos de inmunoprecipitación y estudios por Western blot utilizando anticuerpos anti-FLAG. Para la generación de estas líneas, se utilizaron los servicios de la empresa GenScript (<https://www.genscript>). Se sintetizó la secuencia codificante de PpCOR413im (sin el codón STOP) en marco con la secuencia codificante para FLAG, y se agregaron los sitios flanqueantes attL1 (5' gtaaaacgacggccag 3') y attL2 (5' gtcatagctgttctcg 3'), para la posterior recombinación por el sistema Gateway. Esta secuencia fue clonada por la misma empresa en el vector pBlueScript KS (+) como fue descrito en materiales y métodos (ver figura 2).

Una vez obtenido el vector con la secuencia sintética, se realizó un PCR utilizando los primers universales M13 (ver materiales y métodos), se purificó y se realizó una reacción de recombinación con la enzima LR de gateway, utilizando el vector de destino pTH-UBI-Gate (<https://sites.dartmouth.edu/bezanillalab>). Se transformaron células de bacterias electrocompetentes de *E.coli* y se obtuvieron ocho colonias resistentes a ampicilina. Estas fueron reestriadas y se realizó una caracterización para determinar si el fragmento de fusión de interés se clonó en el vector de destino. Se realizó PCR a partir de ADN plasmídico de las bacterias empleando primers específicos que hibridan en la secuencia codificante del gen

PpCOR413im. Los resultados del ensayo por PCR se observan en la figura 4A, donde para las ocho colonias analizadas se observó una banda de gran intensidad de 780 pares de bases, las cuales tienen el tamaño esperado. Como control positivo se utilizó el plásmido pBluescript KS(+) con la secuencia sintetizada.



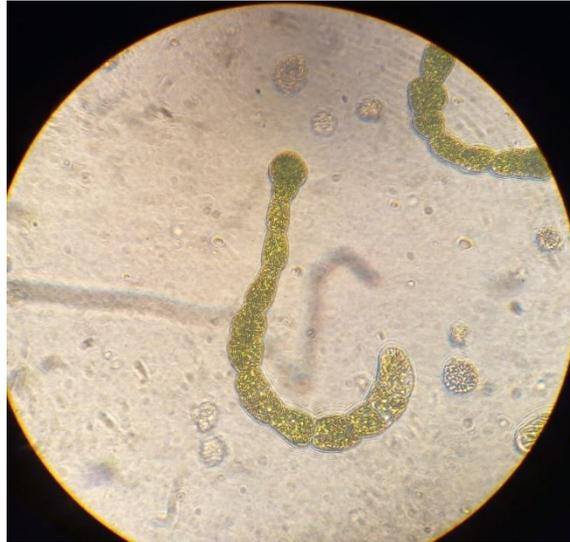
**Figura 4. (A)** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR de ocho colonias (1-8) de *E.coli* transformadas con el vector pTH-UBI-Gate con la incorporación de la secuencia PpCOR413im:FLAG. Se emplearon primers que hibridan en la secuencia codificante de PpCOR413im. Tamaño de amplicón esperado: 780pb. C+: vector pBluescript KS (+) con la secuencia de fusión sintetizada. C-: vector vacío. **(B)** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR de las colonias dos y tres de *E.coli* transformadas con el vector pTH-UBI-Gate con la incorporación de la secuencia PpCOR413im:FLAG. Se emplearon primers que hibridan en la secuencia codificante de PpCOR413im y en el terminador tNOS y se esperaba un tamaño de amplicón de aproximadamente 1000 pares de bases.

A continuación, se seleccionaron dos colonias (colonias #2 y #3), y se realizó otro chequeo por PCR empleando primers específicos que hibridan en la región codificante de PpCOR413im y en una región del vector de destino, como lo es el terminador tNOS (figura 4B). De esta forma, se pudo determinar la presencia de la construcción génica en las colonias de *E.coli* en pTH-UBI-Gate. De las dos colonias analizadas, solo para la colonia tres se observó una banda del tamaño esperado (1070 pares de bases).

Esta colonia se envió a secuenciar mediante los servicios de la empresa Macrogen, corroborando la correcta inserción de PpCOR413im:FLAG en el vector de destino.

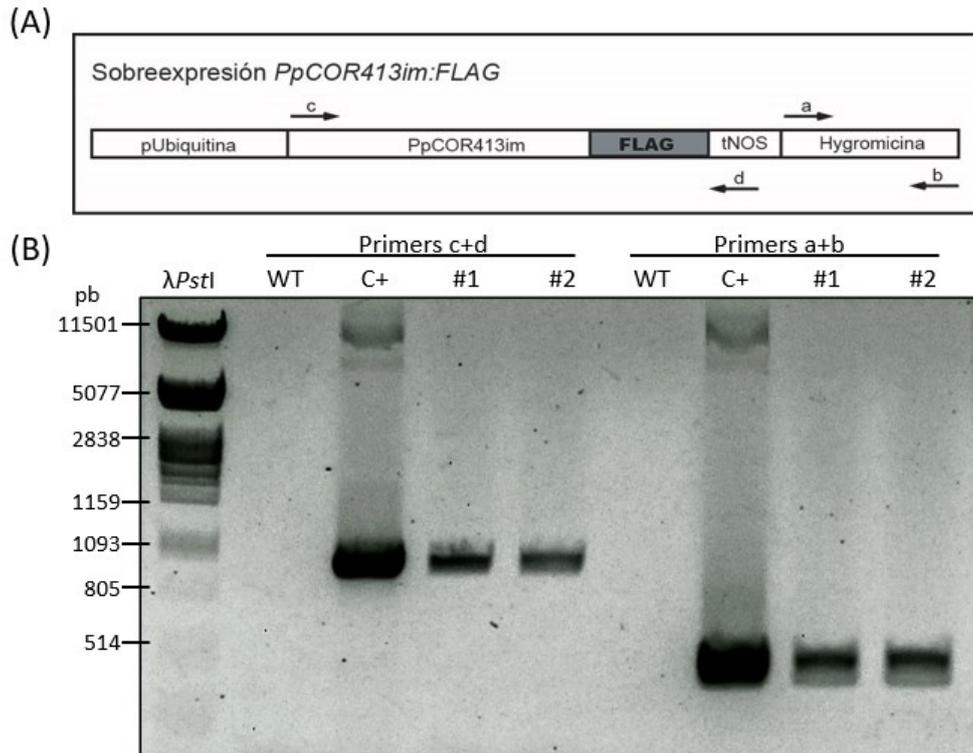
## **IV.2. Transformación de protoplastos de *P.patens* con la construcción génica y caracterización molecular**

Con el fin de generar plantas que sobreexpresen la proteína de fusión PpCOR413im:FLAG, se aprovechó la capacidad de *P.patens* para integrar eficientemente ADN foráneo mediante el proceso de recombinación homóloga, y se transformaron protoplastos según describió Schaefer et al. en 1991, utilizando polietilenglicol (PEG) como agente químico para la permeabilización de la membrana plasmática. La regeneración de estos protoplastos fue exitosa, y se pudo observar el crecimiento de dos colonias individuales en presencia de higromicina (figura 5).



**Figura 5.** Protoplastos de *P.patens* en la fase de regeneración durante la primer semana post proceso de transformación, creciendo en medio con el antibiótico de selección higromicina.

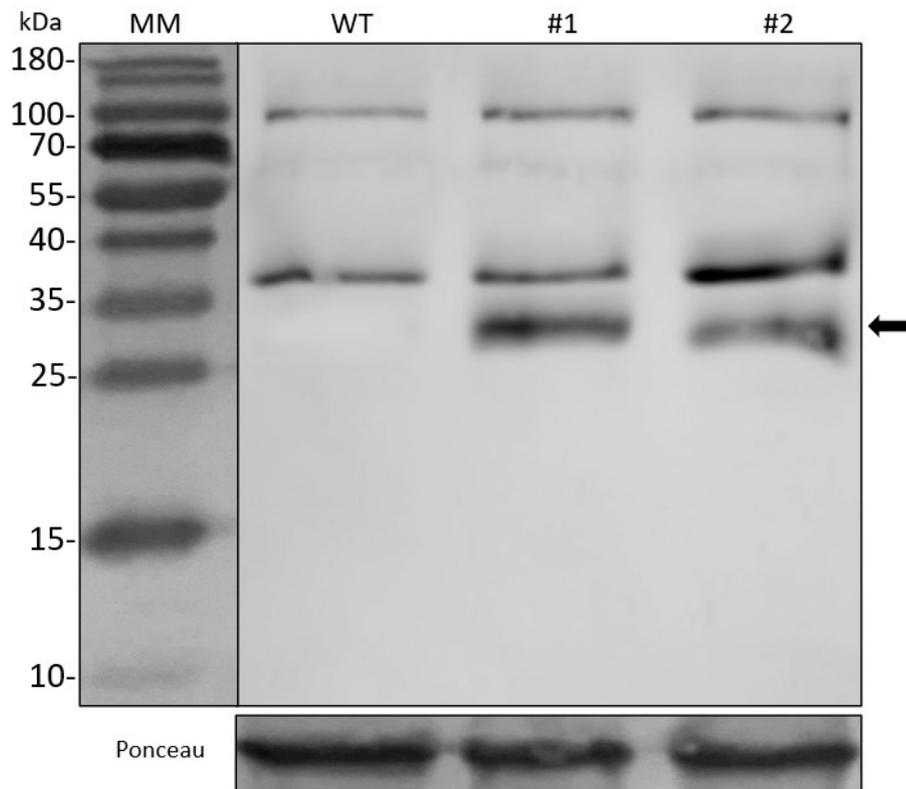
La caracterización molecular fue el paso inicial para luego poder utilizar estas líneas como herramienta para estudios posteriores. Para ello, en primera instancia, se realizaron análisis por PCR para poder demostrar que el gen de fusión PpCOR413im:FLAG está presente en colonias de *P.patens* luego del proceso de transformación. Se realizaron diferentes PCRs utilizando combinaciones de primers diseñados en la construcción transformada (figura 6), para lo cual se realizó extracción de ADN genómico a partir de colonias de plantas salvajes y sobreexpresantes. Haciendo uso de estos ADN genómicos se realizó por un lado un PCR con primers específicos para el gen de resistencia a higromicina (primers a+b) y por otro lado un PCR con primers específicos que hibridan en la secuencia codificante de PpCOR413im y en el terminador tNOS (primers c+d). Los resultados se observan en la figura 6B. Cuando se realizó el PCR con la combinación de primers c+d y la combinación de primers a+b, en ambos sobreexpresantes (#1 y #2) se pudieron observar bandas de 1070 pb y de 442 pb respectivamente, los cuales coinciden con los tamaños esperados predichos para cada amplicón. De igual forma las mismas bandas se observaron en el control positivo, en el que se empleó como molde para la reacción el vector pTH-UBI-Gate con el inserto PpCOR413im:FLAG. En todos los casos, no se observaron bandas cuando se utilizó como molde el ADN genómico extraído a partir de plantas salvajes, lo cual indicaría que las bandas obtenidas para las líneas #1 y #2 no se deben a posibles amplificaciones inespecíficas. Dichos resultados demuestran la presencia de las secuencias codificantes de la proteína de fusión y del antibiótico higromicina, y por ende evidencian la presencia de la construcción para la sobreexpresión de PpCOR413im:FLAG en las líneas #1 y #2.



**Figura 6. (A)** Diagrama de la construcción para la sobreexpresión de *PpCOR413im:FLAG*, que corresponde a la construcción esperada a introducirse en el genoma de plantas de *P.patens*. *PpCOR413im:FLAG* se encuentra bajo la regulación del promotor ubiquitina de maíz y el terminador NOS, y la construcción porta el gen de resistencia a higromicina. Con flechas negras y letras en minúscula se diagraman los primers empleados para los chequeos del inserto por PCR. **(B)** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR a partir de ADN genómico de dos líneas sobreexpresantes (#1 y #2). Se utilizaron las combinaciones de primers a+b para la amplificación del gen de resistencia a higromicina, y c+d para la amplificación de la secuencia *PpCOR413im:FLAG*. A modo de control positivo (C+) se utilizó el vector pTH-UBI-Gate con el inserto *PpCOR413im:FLAG* y como control negativo (Wt) se empleó ADN genómico de colonias salvajes.

Con el fin de confirmar la correcta expresión de la proteína de fusión, se realizó un Western blot a partir de proteínas solubles de plantas de *P.patens* sobreexpresantes y salvajes (ver materiales y métodos). Para ello, se corrieron 10µg de proteínas totales, previamente cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando reactivo de Bradford, en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%. Las proteínas se blotearon en una membrana de nitrocelulosa durante toda la noche y al otro día se realizó la detección mediante el uso de un anticuerpo primario específico comercial anti-FLAG y un anticuerpo secundario infrarrojo (ver materiales y métodos). Como se puede ver en la figura 6C, se pudo detectar la presencia de la proteína FLAG en las muestras de ambas líneas sobreexpresantes, cuyo tamaño coincide con la fusión de dicho tag con la proteína *PpCOR413im* (28 kDa). Se observaron bandas de peso molecular superior correspondientes a uniones inespecíficas del anticuerpo anti FLAG. Para

asegurarse la igualdad de carga en la concentración de proteínas transferidas a la membrana, se utilizó la tinción con Ponceau Red de la membrana, de manera que se visualizó la proteína Rubisco en todos los carriles y de igual intensidad. Estas observaciones evidencian la correcta sobreexpresión de la proteína de fusión PpCOR413im:FLAG en las líneas #1 y #2 generadas.



**Figura 7.** Western blot a partir de proteínas solubles de dos líneas sobreexpresantes (#1 y #2) y salvajes (Wt) empleando anticuerpos contra el tag FLAG. Se utilizó la tinción Ponceau para marcar la subunidad mayor de la enzima Rubisco a modo de control de carga. Para cada línea #1 y #2 se observó una banda (flecha negra) de entre 32-35kDa correspondiente al tamaño esperado para PpCOR413im:FLAG. Se observan bandas de peso superior correspondientes a uniones inespecíficas del anticuerpo anti FLAG.

## V. Conclusiones

*P.patens* es, en efecto, una herramienta muy útil para el estudio de genes por genética reversa. Es un modelo vegetal fácil de manipular y propagar *in vitro*, con un ciclo de vida rápido y con pocos requerimientos en sus medios de cultivo. Su alta tasa de recombinación homóloga facilitan la generación de plantas *knock out* o sobreexpresantes, con un protocolo de transformación que no representa grandes desafíos y que permite la generación de colonias regenerantes en relativamente poco tiempo.

En el presente trabajo se lograron generar dos líneas transgénicas sobreexpresantes de la proteína de fusión PpCOR413im:FLAG, obteniéndose las primeras colonias regenerantes resistentes a antibiótico en un poco más de tres semanas. Las mismas presentaron elementos de la construcción foránea, como fue observado en los ensayos por PCR y fueron capaces de expresar una proteína fusionada a FLAG, observado en ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-FLAG.

## **VI. Perspectivas**

A partir de las líneas transgénicas generadas se podrán realizar distintos ensayos para continuar con la caracterización del gen *PpCOR413im*. Por un lado, los cloroplastos pueden ser fragmentados y separados en sus distintos compartimientos mediante gradientes de concentración y centrifugación (Bouchnak *et al.*, 2018). Una vez obtenidas las distintas fases correspondientes al estroma, tilacoides y a la envoltura, se podrá determinar la presencia de PpCOR413im en alguna de estas fases mediante inmunoblot haciendo uso de un anticuerpo específico anti-FLAG. Por otro lado, se podrán someter a los sobreexpresantes a distintos estímulos estresantes y comparar los rasgos fenotípicos con plantas salvajes. Se ha observado que la sobreexpresión de ciertos genes de la familia COR413 resultaron en una mayor resistencia o tolerancia a estrés por sequía, estrés osmótico, altas y bajas temperaturas (Garwe *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018), por lo que se podría proponer la hipótesis de que las plantas sobreexpresantes de PpCOR413im generadas en el presente trabajo presenten una mayor resistencia o tolerancia a al menos alguno de dichos estímulos estresantes. Por último, se podrán emplear estas líneas sobreexpresantes para realizar ensayos de co-inmunoprecipitación para poder determinar con que proteínas puede estar interactuando PpCOR413im, revelando posibles funciones de dicha proteína en el cloroplasto.

## VII. Referencias

- Ashton, N.W., Cove, D.J. (1977). The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molec. Gen. Genet.* 154, 87–95. <https://doi.org/10.1007/BF00265581>
- Bezanilla, M., Pan, A., & Quatrano, R. S. (2003). RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*, 133 (2), 470-474. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024901>
- Bezanilla, M., Perroud, P. F., Pan, A., Klueh, P., & Quatrano, R. S. (2005). An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 7(3), 251–257. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837597>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Breton, G., Danyluk, J., Charron, J. B., & Sarhan, F. (2003). Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 132(1), 64–74. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015255>
- Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., White, C., Schaefer, D. G., & Nogu e, F. (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant biotechnology journal*, 15(1), 122–131. <https://doi.org/10.1111/pbi.12596>
- Cove D. (2005). The moss *Physcomitrella patens*. *Annual review of genetics*, 39, 339–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.110214>
- Frank, W., Ratnadewi, D., & Reski, R. (2005). *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220(3), 384–394. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1351-1>

- Garwe, D., Thomson, J. A., & Mundree, S. G. (2006). XVSAP1 from *Xerophyta viscosa* improves osmotic-, salinity- and high-temperature-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Biotechnology journal*, 1(10), 1137–1146. <https://doi.org/10.1002/biot.200600136>
- Hajela, R. K., Horvath, D. P., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1990). Molecular Cloning and Expression of cor (Cold-Regulated) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 93(3), 1246–1252. <https://doi.org/10.1104/pp.93.3.1246>
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Satish, L., Pandian, S. K., Chen, J. T., Ahmar, S., Wang, X., Mora-Poblete, F., & Ramesh, M. (2021). An Overview of Abiotic Stress in Cereal Crops: Negative Impacts, Regulation, Biotechnology and Integrated Omics. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1472. <https://doi.org/10.3390/plants10071472>
- Kamisugi, Y., Schlink, K., Rensing, S. A., Schween, G., von Stackelberg, M., Cuming, A. C., Reski, R., & Cove, D. J. (2006). The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic acids research*, 34(21), 6205–6214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl832>
- Khandelwal, A., Cho, S. H., Marella, H., Sakata, Y., Perroud, P. F., Pan, A., & Quatrano, R. S. (2010). Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5965), 546. <https://doi.org/10.1126/science.1183672>
- Lang, D., Zimmer, A. D., Rensing, S. A., & Reski, R. (2008). Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in plant science*, 13(10), 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.07.002>
- Ma, X., Wang, G., Zhao, W., Yang, M., Ma, N., Kong, F., Dong, X., & Meng, Q. (2017). SICOR413IM1: A novel cold-regulation gene from tomato, enhances drought stress tolerance in tobacco. *Journal of plant physiology*, 216, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.03.016>
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P. M., & Bailey-Serres, J. (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature reviews. Genetics*, 16(4), 237–251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>
- Müller, S.J., Gütle, D.D., Jacquot, JP. *et al.* (2016). Can mosses serve as model organisms for forest research?. *Annals of Forest Science* 73, 135–146. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0468-7>

-Mittler R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>

Naciones Unidas Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División Poblacional (2022). World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.

-Nakaoka, Y., Miki, T., Fujioka, R., Uehara, R., Tomioka, A., Obuse, C., Kubo, M., Hiwatashi, Y., & Goshima, G. (2012). An inducible RNA interference system in *Physcomitrella patens* reveals a dominant role of augmin in phragmoplast microtubule generation. *The Plant cell*, 24(4), 1478–1493. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098509>

-Rensing, S. A., Goffinet, B., Meyberg, R., Wu, S. Z., & Bezanilla, M. (2020). The Moss *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. *The Plant cell*, 32(5), 1361–1376. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00828>

-Reski, R., & Frank, W. (2005). Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics--Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 4(1), 48–57. <https://doi.org/10.1093/bfpg/4.1.48>

-Reski, R., Parsons, J., & Decker, E. L. (2015). Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant biotechnology journal*, 13(8), 1191–1198. <https://doi.org/10.1111/pbi.12401>

-Ruibal, C., Castro, A., Fleitas, A. L., Quezada, J., Quero, G., & Vidal, S. (2020). A Chloroplast COR413 Protein From *Physcomitrella patens* Is Required for Growth Regulation Under High Light and ABA Responses. *Frontiers in plant science*, 11, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00845>

-Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y., & Bevan, M. W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, cell & environment*, 29(3), 426–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01477.x>

-Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in plant science*, 7, 571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>

-Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Plainview, N.Y.: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Schaefer, D., Zryd, J. P., Knight, C. D., & Cove, D. J. (1991). Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular & general genetics: MGG*, 226(3), 418–424. <https://doi.org/10.1007/BF00260654>
- Schaefer, D. G., & Zrýd, J. P. (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 11(6), 1195–1206. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11061195.x>
- St.Clair, S.B., Lynch, J.P. (2010). The opening of Pandora's Box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. *Plant Soil* 335, 101–115. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0328-z>
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *The New phytologist*, 203(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Thomashow M. F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 50, 571–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., & Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>
- Watts, N., Amann, M., Arnell, N., Ayeb-Karlsson, S., Beagley, J., Belesova, K., Boykoff, M., Byass, P., Cai, W., Campbell-Lendrum, D., Capstick, S., Chambers, J., Coleman, S., Dalin, C., Daly, M., Dasandi, N., Dasgupta, S., Davies, M., Di Napoli, C., Dominguez-Salas, P., Costello, A. (2021). The 2020 report of The Lancet Countdown on health and climate change: responding to converging crises. *Lancet (London, England)*, 397(10269), 129–170. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32290-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32290-X)
- Zhang, Y., Lv, Y., Jahan, N., Chen, G., Ren, D., & Guo, L. (2018). Sensing of Abiotic Stress and Ionic Stress Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3298. <https://doi.org/10.3390/ijms19113298>

-Zhou, A., Liu, E., Li, H., Li, Y., Feng, S., Gong, S., & Wang, J. (2018). PsCor413pm2, a Plasma Membrane-Localized, Cold-Regulated Protein from *Phlox subulata*, Confers Low Temperature Tolerance in *Arabidopsis*. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2579. <https://doi.org/10.3390/ijms19092579>

-Zhu J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>