



Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área: Biología

Sub-área: Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

“Evaluación de la resistencia a patógenos en *Physcomitrella patens* y *Arabidopsis thaliana* mediante la sobreexpresión de un posible factor de transcripción con dominio AP2/ERF”

Guillermo Reboledo

Orientadora: Dra. Inés Ponce de León

**Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

Tribunal de Tesis:

Presidente: Omar Borsani

Vocales: Sabina Vidal y Ana Ramón

Septiembre 2015

Índice:

ÍNDICE:	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO	5
1.1.1 Respuesta de defensa	6
1.1.1.1 PAMP-Triggered Immunity	9
1.1.1.2 Effector-Triggered Immunity	10
1.1.1.3 Vías de señalización y respuestas PTI y ETI.....	12
1.1.2 Factores de transcripción con dominio APETALA 2/ proteína de unión a elementos de respuesta al etileno (AP2/ERF).....	15
1.2 PHYSCOMITRELLA PATENS COMO SISTEMA MODELO	19
2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	27
3.1.1 <i>Physcomitrella patens</i>	27
3.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.2 CEPAS Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS	27
3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	27
3.2.2 Cepas de <i>Pectobacterium sp</i>	29
3.2.3 <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	30
3.2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	31
3.3.1 Oligonucleótidos	31
3.3.2 Amplificación de la secuencia CDS de PpAP2.....	31
3.4 VECTORES	32
3.4.1 pGEM [®] -T Easy (Promega, Madison, USA)	32
3.4.2 pENTR [™] 2B	32
3.4.3 pTHUbi-Gateway	33
3.4.4 pUB-Dest	34
3.5 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	35
3.5.1 Obtención de ADN plasmídico	35
3.5.2 Obtención de ARN a partir de tejidos vegetales.....	36
3.5.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	37
3.5.4 Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes.....	37
3.5.5 Obtención de ADN a partir de gel de agarosa.....	37
3.5.6 Análisis por Northern blot	37
3.6 MODIFICACIONES EN EL ADN	38
3.6.1 Enzimas de restricción.....	38
3.6.2 Defosforilación de vectores	38
3.6.3 Ligaciones.....	38
3.7 CONSTRUCCIONES PARA LA SOBREENSECCIÓN DE PpAP2 EN PHYSCOMITRELLA PATENS Y ARABIDOPSIS THALIANA	39
3.7.1 Construcción para la sobreexpresión en <i>Physcomitrella patens</i>	39
3.7.2 Construcción para la sobreexpresión en <i>Arabidopsis thaliana</i>	40

3.8 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS.....	41
3.8.1 Transformación de <i>Physcomitrella patens</i>	41
3.8.2 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.9 ANÁLISIS MOLECULARES DE LAS LÍNEAS QUE SOBREENPRESAN PpAP2.....	42
3.9.1 Análisis de las líneas de <i>Physcomitrella patens</i> generadas.....	42
3.9.2 Análisis de la ploidía relativa por citometría de flujo en transformantes de <i>Physcomitrella patens</i>	42
3.10 TRATAMIENTOS CON MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS.....	43
3.11 EVALUACIÓN DE LAS LÍNEAS DE PHYSCOMITRELLA PATENS.....	44
3.11.1 Ensayo de daño celular en <i>Physcomitrella patens</i>	44
3.11.2 Tinciones para visualizar los fitopatógenos.....	44
3.11.3 Visualización de cambios a nivel de la pared celular.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 COMPARACIÓN DE PpAP2 CON OTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS EN P. PATENS Y PLANTAS VASCULARES.....	45
4.1.1 Secuencia proteica de PpAP2.....	45
4.1.2 Comparación con otras proteínas con dominio AP2 de <i>P. patens</i>	45
4.1.3 Comparación interespecífica entre la proteína PpAP2 y otras proteínas de plantas vasculares.....	46
4.2 EXPRESIÓN DE PpAP2 EN RESPUESTA A FITOPATÓGENOS.....	48
4.3 SOBREENPRESIÓN DEL GEN PpAP2.....	48
4.3.1 Construcción de los vectores de sobreexpresión de PpAP2 para <i>P. patens</i> y <i>A. thaliana</i>	48
4.3.1.1 PpAP2-pGEM.....	49
4.3.1.2 PpAP2-pENTR.....	50
4.3.1.3 PpAP2-pTHUbi.....	53
4.3.1.4 PpAP2-pUB-DEST.....	56
4.3.2 Transformación de protoplastos de <i>Physcomitrella patens</i>	58
4.3.2.1 Análisis de la ploidía relativa por citometría en las líneas de <i>Physcomitrella patens</i>	60
4.3.2.2 Análisis de los transformantes haploides mediante “Northern blot”.....	62
4.3.2.3 Análisis de la susceptibilidad de las plantas de <i>P. patens</i> que sobreexpresan PpAP2 en respuesta a fitopatógenos comparado con plantas salvajes.....	62
4.3.2.4 Respuesta de defensa asociada a la pared celular.....	66
4.3.2.5 Visualización de <i>B. cinerea</i> en tejidos de <i>P. patens</i> de plantas salvajes, líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4.....	67
4.3.3 Obtención de plantas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
4.3.3.1 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
4.3.3.2 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
4.3.3.3 Fenotipo de los transformantes que sobreexpresan PpAP2.....	70
5. DISCUSIÓN.....	72
5.1 OBTENCIÓN DE SOBREENPRESANTES DEL GEN PpAP2 EN PHYSCOMITRELLA PATENS.....	72
5.1.1 La sobreexpresión de PpAP2 no altera el desarrollo de <i>Physcomitrella patens</i>	72
5.1.2 Las líneas que sobreexpresan PpAP2 son menos susceptibles al daño por patógenos.....	73
5.2 OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES DE ARABIDOPSIS THALIANA.....	75
6. CONCLUSIONES.....	76
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	77
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

Agradecimientos

A Inés por recibirme como pasante y tenerme bajo su tutela, por su buena y pronta disposición, orientación, ayuda o motivación siempre que lo necesité.

A Lucina y Alex quienes me ayudaron a adquirir los conocimientos básicos que luego utilizaría y desarrollaría para realizar mi tesis.

A Carina por permitirme realizar mi trabajo de maestría en su laboratorio y al departamento de Biología Molecular del IIBCE en general, que desde el primer día me integraron al equipo y ayudaron en todo lo que necesité.

A Alfo, Ceci, Pao, Ricky, Laus y Ana por aguantar mis gustos musicales y prenderse a las charlas, divagues sin sentido durante los tiempos muertos de los ensayos, los almuerzos o simplemente porque así se daba.

A Pierre-Francois Perroud, Universidad de Washington, USA, por el plásmido pTHUbi-Gateway. Al Servicio de Citometría de Flujo del IIBCE, en especial a Federico por todo el tiempo dedicado.

A Fer, Inés y especialmente a Pablo por estar siempre ahí apoyando, compartiendo, son los mejores.

Pero por sobre todo, deseo agradecer enormemente a mis padres, Julio y Carmen a quienes les debo la persona que soy hoy en día, su apoyo incondicional y su interés en mi trabajo aunque muchas veces no entendieran de qué iba. Gracias por estar, no podría haberlo logrado sin ustedes. A mi hermano Gonza de quien siempre recibí su apoyo también.

Agradezco el apoyo financiero brindado por: PEDECIBA, Beca de maestría ANII y proyecto FCE_2_2011_1_6095

Resumen

Los factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia APETALA2/*Ehtylene Responsive Factor* (AP2/ERF) se encuentran conservados en plantas y participan en las respuestas de defensa frente a estrés biótico y/o abiótico. A partir de la técnica “*Suppression subtractive hybridization*” (SSH) nuestro grupo de investigación logró identificar un gen inducido en plantas de *Physcomitrella patens* (*P. patens*) tratadas con elicitores de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, que codifica para un posible factor de transcripción con dominio AP2/ERF. Este gen, el cual denominamos PpAP2, también se induce en plantas de *P. patens* inoculadas con el hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*). Luego de identificado y caracterizado PpAP2 nos planteamos su sobreexpresión en *P. patens* y en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, modelo de planta vascular) como forma de analizar si la expresión constitutiva de PpAP2 aumenta la resistencia a patógenos. Para ello se construyeron plásmidos específicos y se generaron plantas transformantes que sobreexpresan PpAP2 en *P. patens* y *A. thaliana*. De esta forma obtuvimos cuatro líneas transformantes para *P. patens* de las cuales dos, pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4, mostraron un alto nivel de expresión constitutiva de PpAP2. A su vez, estas líneas sobreexpresantes presentaron una disminución significativa en el daño celular causado por los patógenos *B. cinerea* y el filtrado celular de *P.c. carotovorum*, como corroboraron los ensayos de muerte celular por azul de Evans y la microscopia con tinción de safranina. Las tinciones con Solofenil Flavina 7 gfe revelaron un menor crecimiento del micelio de *B. cinerea* en los tejidos de los transformantes pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 en comparación con plantas salvajes. De manera complementaria se identificó otro hongo patógeno, *Colletotrichum gloeosporioides*, capaz de infectar *P. patens* y causar síntomas de enfermedad. Las dos líneas que sobreexpresan PpAP2 presentan menos síntomas causados por *C. gloeosporioides* que las plantas salvajes. En *Arabidopsis* no fue posible realizar ensayos de susceptibilidad a patógenos dado que la sobreexpresión de PpAP2 produce plantas enanas con alteraciones en el desarrollo. En este trabajo se demuestra que la sobreexpresión de un posible factor de transcripción PpAP2 aumenta la resistencia a patógenos en la planta *P. patens*.

1. Introducción

En la agricultura se utiliza una gran variedad de pesticidas para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos. Estos agroquímicos son tóxicos para el medio ambiente y los seres vivos, además de generar poblaciones de patógenos resistentes. Como forma de disminuir la aplicación de estos químicos en los cultivos, se han desarrollado líneas de investigación en biotecnología tendientes a generar plantas más resistentes mediante la incorporación, en el genoma de la planta, de genes que promuevan la resistencia a patógenos. Los tipos de genes que se han utilizado varían, desde genes que codifican para proteínas con actividad insecticida o antimicrobiana hasta factores de transcripción responsables de aumentar la expresión de una batería de genes involucrados en la defensa. Estas aproximaciones han permitido generar plantas de maíz, arroz, tabaco, papa, vid, tomate, etc. más resistentes a bacterias y hongos que sobreexpresan proteínas relacionadas con la defensa (Ahmad et al. 2012; Alan et al. 2004).

1.1 Interacción planta patógeno

Aunque algunos componentes individuales de las vías de señalización del sistema inmune entre animales y plantas comparten ciertos motivos proteicos (*Toll-like receptors*, *nucleotide-binding site* y *Toll-interleukin 1 [IL-1] receptor*; TLR, NBS y TIR por sus siglas en inglés respectivamente), existen grandes diferencias entre ellos en cuanto a los mecanismos de defensa que activan frente al estrés biótico o abiótico (Ausubel 2005). Los animales pueden alejarse de las condiciones externas que son adversas o en caso de haber una infección combatirla por medio de células especializadas que recorren al organismo a través del sistema circulatorio, hasta llegar al lugar de la infección, en lo que se conoce como respuesta del sistema inmune. Las plantas en cambio deben ser capaces de hacer frente al estrés abiótico en el lugar donde se encuentran y de responder ante una infección en el tejido de la planta donde se genere sin la posibilidad de un sistema circulatorio que lleve células especializadas a combatir dicha infección (Bonas et al. 2002; Dangl et al. 2001). Para ello cada célula de la planta tiene que tener la capacidad de responder ante una infección. Pareciera así que las plantas presentarían cierta desventaja a la hora de defenderse ante los patógenos, pero de hecho se encuentran continuamente expuestas a ellos y en la gran mayoría de los casos salen exitosas de dichas interacciones. Lo anterior se debe en gran parte a barreras preformadas que poseen las plantas como la cutícula, la pared celular o compuestos con actividad antimicrobiana. Una vez que el patógeno logra infectar, la planta rápidamente reconoce al patógeno y activa una respuesta de defensa que involucra la transducción de señales, la activación de genes de

defensa específicos y la producción de metabolitos con actividades antimicrobianas. Durante la coevolución las plantas y los microorganismos patógenos desarrollaron varias estrategias para disminuir la posibilidad de una infección en el caso de las plantas, o para interferir e inactivar las defensas de la planta en el caso de los microorganismos.

1.1.1 Respuesta de defensa

Los patógenos de plantas tienen un arsenal y estrategias variadas para lograr infectar los tejidos vegetales. Las bacterias por ejemplo suelen ingresar a la planta a través de heridas o aberturas naturales de intercambio gaseoso o de agua con el medio ambiente, como los estomas o los hidátodos respectivamente. Una vez dentro del tejido las bacterias comienzan a colonizar los espacios intracelulares, ganando terreno, creando biofilms y liberando enzimas que digieren la pared celular disminuyendo así las defensas físicas de la planta. Los hongos también producen enzimas que degradan la pared celular y toxinas, y además poseen la capacidad de penetrar directamente en el tejido mediante la producción de apresorios que generan presión en el lugar donde estos se forman entrando a la fuerza de forma mecánica y rompiendo las paredes celulares. A su vez el crecimiento de las hifas del hongo puede ocurrir sobre, entre o a través del tejido de la planta haciendo que el mismo sea muy eficaz en su infección. Los hongos y oomicetes son capaces de formar estructuras invaginadas en la membrana plasmática de las células de la planta llamadas haustorios los cuales tienen función de alimentación. Lo anterior se logra porque entre la membrana plasmática del haustorio, la matriz extracelular y la membrana plasmática del huésped se forma una interface por donde se da el pasaje de nutrientes de la célula vegetal al haustorio (Jones et al. 2006).

Si los patógenos logran pasar a través de las barreras físicas de la planta, estos entran en contacto con la membrana plasmática de las células vegetales. Es allí donde se da el reconocimiento del patógeno produciendo las diferentes respuestas de defensa asociadas al mismo.

El sistema de defensa de las plantas actúa a dos niveles dentro de la célula vegetal. El primer nivel se da mediante los receptores transmembrana de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptor*, PRR) los cuales son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) (Boller et al. 2009). Los PAMPs son componentes esenciales de los patógenos como ser la flagelina en bacterias o la quitina en los hongos. Los PRRs también pueden identificar patrones moleculares asociados al

daño (*Danger-Associated Molecular Patterns*, DAMPs) producidos en la planta por los patógenos. Ejemplos de DAMPs son los fragmentos de pared celular o de cutícula. El reconocimiento de los PAMPs o DAMPs mediada por los PRR desencadena la llamada inmunidad disparada por PAMPs (*PAMP-Triggered Immunity*, PTI). Durante la evolución los patógenos han generado moléculas capaces de interferir con los mecanismos de defensa de la planta, denominadas efectores responsables de la susceptibilidad disparada por efectores (*Effector-Triggered Susceptibility*, ETS). Las plantas reconocen a los efectores causantes de la susceptibilidad mediante proteínas con dominios NB-LRR (*Nucleotide Binding* (NB) y *Leucine Rich Repeat* (LRR)) codificadas por los genes de resistencia a enfermedad (genes R) (Dangl and Jones 2001). Este reconocimiento ocurre dentro de la célula y activa lo que se conoce como inmunidad disparada por efectores (*Effector-Triggered Immunity*, ETI). La ETI se considera como una respuesta PTI más acelerada y amplificada (Thomma et al. 2011). Resumiendo lo anterior, sería posible representar al sistema inmune de las plantas como un modelo “zigzag” compuesto de cuatro fases (Figura 1). En la Fase I, los PAMPs/ MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) y DAMPs son reconocidos por los receptores PRR desencadenando la PTI. En la Fase II los patógenos exitosos liberan efectores que contribuyen a la virulencia del mismo. Los efectores son liberados para lograr disminuir la respuesta de defensa de la planta en lo que se conoce como susceptibilidad disparada por efectores (*Effector-Triggered Susceptibility*, ETS) interfiriendo con las vías de señalización y disminuyendo la intensidad de la PTI o ETI. En la Fase III la planta produce proteínas de resistencia R capaces de reconocer dichos efectores, logrando una respuesta más rápida, exacerbada, potente y duradera que la PTI llamada ETI. Estas proteínas R son capaces de identificar los efectores, la molécula modificada por ellos o al efector unido a su molécula blanco en lo que se conoce como el modelo de gen para gen (*gene-for-gene*). Durante la ETI se desencadena la respuesta hipersensible (HR), donde el sistema inmune de la planta provoca la muerte celular en el sitio donde se dio la infección. Durante la Fase IV el patógeno es capaz de generar, diversificar o conseguir nuevos genes efectores (por transferencia horizontal de genes, mutaciones o recombinación) que logren evadir las proteínas de defensa R suprimiendo la ETI. Es en esta parte donde la selección natural favorece aquellas plantas con nuevas proteínas R que logren reconocer al nuevo efector y así volver a disparar la ETI una vez más, repitiéndose así la Fase IV una y otra vez (Bonas et al. 2002; Jones et al. 2006).

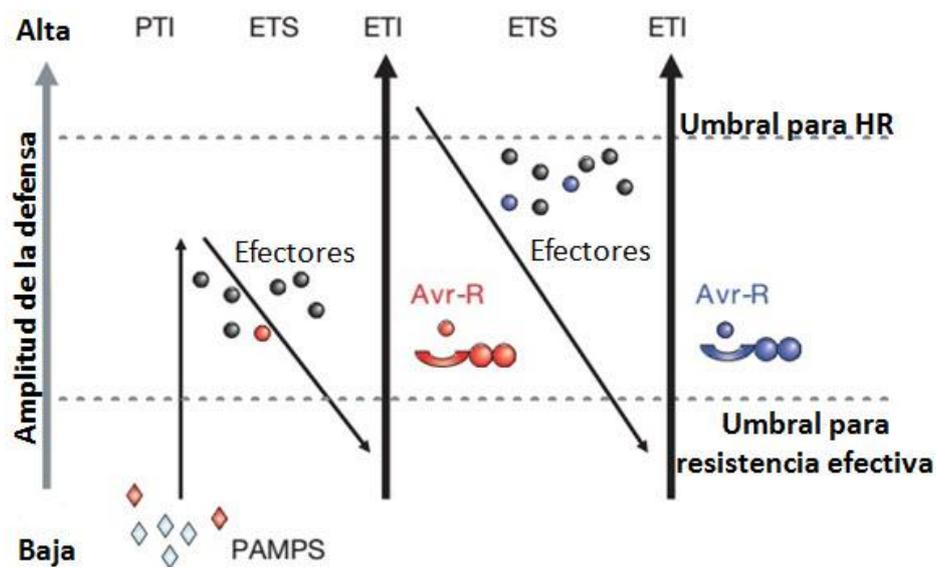


Figura 1. Esquema del modelo zigzag donde se aprecian las interacciones entre receptores PRR y R con los elicitores (PAMPs y distintos Efectores respectivamente) para dar lugar a los diferentes tipos de respuesta del sistema inmune de la planta (PTI, ETS y ETI). Cuando un efector es reconocido por una proteína R el mismo pasa a denominarse proteína de avirulencia o Avr (*avirulence protein*). En caso de que la amplitud de la respuesta de defensa sobrepasara el umbral superior puede dispararse la llamada respuesta hipersensible (HR) provocando muerte celular en el sitio de infección. Imagen modificada a partir de Jones y Dangl 2006.

La resistencia sistémica adquirida (*Systemic-Acquired Resistance*, SAR) es la forma en que la planta responde ante un estímulo por PTI o ETI preparándola para un posible segundo ataque por patógenos. El comienzo de la respuesta SAR se asocia a la reprogramación masiva de la transcripción la cual es dependiente del cofactor de transcripción NPR1 (*nonexpresser of PR genes 1*) y sus factores de transcripción asociados como TGAs (Dong 2004; Pieterse and Van Loon 2004). Durante la SAR participan varias moléculas señal, incluyendo el ácido salicílico (SA), metil salicílico (MeSA), el ácido azelaico (AzA) y el glicerol-3-fosfato (G3P) (Chanda et al. 2011; Fu et al. 2013; Jung et al. 2009; Malamy et al. 1990; Métraux et al. 1990; Park et al. 2007). Estas señales llevan a la expresión sistémica de genes antimicrobianos PR (*pathogenesis-related*) en tejidos distales al sitio de infección para proteger el resto de la planta de infecciones secundarias. Éste tipo de respuesta sistémica produce en la planta una resistencia no específica y por lo tanto de amplio espectro contra patógenos como hongos, oomicetes, virus y bacterias. Los efectos del SAR pueden durar semanas o meses e inclusive y probablemente toda la temporada de crecimiento de la planta en lo que se conoce como memoria inmune (Kuc 1987). Mientras que la ETI propicia la muerte celular programada (*programed cell death*, PCD) la SAR promueve la supervivencia de la célula (Fu et al. 2013). La respuesta SAR también puede ser producida por aplicación exógena de la hormona de defensa SA o sus análogos

sintéticos como el ácido 2,6-dicloroisonicotinico (INA) y benzotiadiazole S-metil ester (BTH) (Durrant et al. 2004). Sin embargo, aunque se sabe que la ETI puede activar la respuesta SAR a través de la síntesis local o sistémica de SA, es poco probable que esta hormona sea la señal sistémica que induce la SAR en tejidos distantes. Esto se evidencia en experimentos de injerto donde el pie pertenece a una planta transgénica que expresa *nahG*, la cual no acumula SA, y aun así es capaz de generar una señal sistémica que active el SAR en hojas sistémicas de tallos injertados de plantas salvajes. En estos ensayos se logró demostrar además que el SA es necesario en los tejidos sistémicos para activar la SAR (Gaffney et al. 1993; Vernooij et al. 1994). La búsqueda de la señal de activación del SAR es intensa y recientemente han surgido nuevos candidatos como ser algunos aminoácidos debido a cambios en su homeostasis inducidos durante la ETI (Fu et al. 2013; Pajerowska-Mukhtar et al. 2012). Jong et al. 2004 vieron que en un mutante de *Arabidopsis* en *ald1* (*agd2-like defense response protein 1*), el cual carece de una aminotransferasa, se ve comprometida la biosíntesis del SA y la respuesta SAR, por lo que de identificarse el sustrato para esta enzima se podría llevar al descubrimiento de la señal inicial para activar la respuesta SAR.

1.1.1.1 PAMP-Triggered Immunity

Los receptores transmembrana PRRs pueden ser de dos tipos; receptores transmembrana del tipo quinasa (*Receptor-Like Kinase*, RLK) o receptores transmembrana del tipo proteína (*Receptor-Like Protein*, RLP), este último parece carecer de un dominio interno de señalización. La familia de genes que codifican para receptores quinasa ha sufrido una gran expansión en plantas, no así la de los receptores del tipo proteína (Lehti-Shiu et al. 2009; G. Wang et al. 2008). Estos tipos de receptores intervienen en el reconocimiento extracelular de MAMPs, incluyendo motivos extracelulares de microorganismos como ser la flagelina en bacterias, AvrXa21 de *Xantomonas*, la quitina y xilanas en hongos, los cuales son reconocidos por los receptores FLS2, Xa21, CEBiP y LeEIX1/2 respectivamente, y heptaglucanos en oomicetes o fragmentos de cutícula o pared celular provenientes de la misma planta. Además los PRRs son capaces de reconocer moléculas intracelulares del patógeno como el factor de elongación Tu (*elongation factor Tu*, EF-Tu) o la proteína de shock por frío CSP (*Cold-Shock Protein*) (Nicaise et al. 2009; Schwessinger et al. 2008; Zipfel 2009). Otras moléculas son reconocidas como PAMPs por activar la respuesta PTI, pero hasta la fecha no se ha identificado un receptor PRR que los reconozca. Entre estas moléculas se encuentran los peptidoglicanos (PGNs), los lipopolisacáridos (LPS), el motivo de unión al ARN de la proteína de choque por

frío en bacterias (RNP-1), moléculas *harpins*, proteínas del tipo Nep1 (de *necrosis-and ethylene-inducing peptide 1*) y el sideróforo pseudobactin (Engelhardt et al. 2009; Erbs et al. 2008; Felix et al. 2003; Gust et al. 2007; Meziane et al. 2005; Newman et al. 2007; Qutob et al. 2006; Watt et al. 2006). El reconocimiento de PAMPs más entendido y estudiado en plantas es el del receptor FLS2 y su unión directa con la flagelina de bacterias para luego ensamblar y activar un complejo de señalización. La mayoría de los receptores PRRs requieren del receptor quinasa rico en leucinas BAK1 (*brassinosteroid insensitive 1-associated kinase*) para funcionar (Chinchilla et al. 2007; Heese et al. 2007). La excepción a lo anterior es el receptor de la quitina de hongos CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*) (Miya et al. 2007; Wan et al. 2008). Si bien BAK1 no tiene un rol directo en la percepción de los elicitores, FLS2 rápidamente forma complejos con BAK1 luego de un evento de elicitación. Como resultado de esta interacción ocurre la fosforilación de ambas proteínas (Schulze et al. 2010). Debido a que BAK1 es central en la regulación de la inmunidad en plantas se convierte en blanco de moléculas efectoras por parte de patógenos virulentos (Shan et al. 2008). Un potencial regulador del complejo FLS2-BAK1 es la proteína citoplasmática quinasa inducida por botrytis 1 (*botrytis-induced kinase 1*, BIK1) ya que *bik1* aumenta su expresión luego del tratamiento con patógenos o elicitores en hojas de *A. thaliana* (Veronese et al. 2006). Sin embargo, otros mediadores de esta vía de señalización pueden ser las MAPKs o proteínas quinasas dependiente de calcio (*calcium-dependent protein kinases*, CDPKs) (Asai et al. 2002; Boudsocq et al. 2010).

1.1.1.2 Effector-Triggered Immunity

El mecanismo de defensa mediado por ETI es la segunda forma de sensar los patógenos en la planta y se basa en el reconocimiento intracelular de proteínas efectoras (Chisholm et al. 2006; Jones et al. 2006). Estas proteínas efectoras suelen causar la supresión de la respuesta PTI provocando la multiplicación del patógeno y el desarrollo de la enfermedad en la planta. Cepas fitopatógenas individuales codifican para unos 20-30 efectores los cuales se encuentran altamente regulados y son secretados directamente en el citoplasma de las células vegetales a través de una estructura del tipo aguja llamada sistema de secreción tipo III (TTSS) (Cunnac et al. 2009). Se han encontrado grandes variaciones entre efectores provenientes de cepas bacterianas relacionadas, y los efectores parecen actuar de forma redundante y ser intercambiables, muchos de los cuales interfieren de forma directa con la respuesta PTI desactivando los receptores PRR o interfiriendo en su cascada de señalización (Kvitko et al.

2009; Zhou et al. 2008). Los efectores bacterianos se caracterizan por tener actividad molecular o enzimática con capacidad de modificar y alterar el reconocimiento intracelular de sus moléculas blanco por parte de las proteínas R (Grant et al. 2006). El reconocimiento de patógenos a través de la presencia de efectores o moléculas modificadas se explica mediante el modelo conocido como “*gen-para-gen*” (Figura 2) el cual se basa en el reconocimiento directo o indirecto de los mismos. En la forma directa las proteínas NB-LRR reconocen los efectores del patógeno asociándose físicamente con ellos (Catanzariti et al. 2006, 2010; Dodds et al. 2004, 2006; Jia et al. 2000). Este tipo de interacción parece resultar a partir de una coevolución antagonista entre los componentes que participan en el huésped y el patógeno (Dodds et al. 2010). En el reconocimiento indirecto (modelos “*guard/decoy*” y “*bait-switch*”) los efectores deben interactuar con una proteína accesoria para ser detectados por las proteínas NB-LRRs. El efector induciría un cambio en la proteína accesoria, una molécula similar a su blanco o ser utilizado como cofactor para permitir su reconocimiento por parte de las proteínas NB-LRR (van der Hoorn et al. 2008). En el modelo de guardia (“*guard*”) la proteína NB-LRR se encuentra “vigilando” a la proteína accesoria que resulta ser blanco del efector, en el momento en que el efector modifica la proteína accesoria ésta será reconocida por la proteína NB-LRR iniciando la vía de señalización para activar la respuesta ETI. Este modelo es capaz de explicar cómo un solo NB-LRR puede reconocer más de un efector, como es el caso de la proteína NB-LRR RPM1 (Dangl et al. 2001; Axtell et al. 2003; Mackey et al. 2003). El tercer modelo conocido como de “*bait-switch*” posee dos etapas. En la primera etapa el efector se une a la proteína accesoria (carnada, “*bait*”) que se encuentra asociada a una proteína NB-LRR. En la segunda etapa el efector, unido a la proteína accesoria que funciona como cofactor en la reacción, es reconocido por el dominio LRR de la proteína NB-LRR. Esta interacción entre el efector y la proteína NB-LRR es lo que funciona como interruptor o “*switch*” activando la señalización para dar comienzo a las respuestas ETI (Collier et al. 2009).

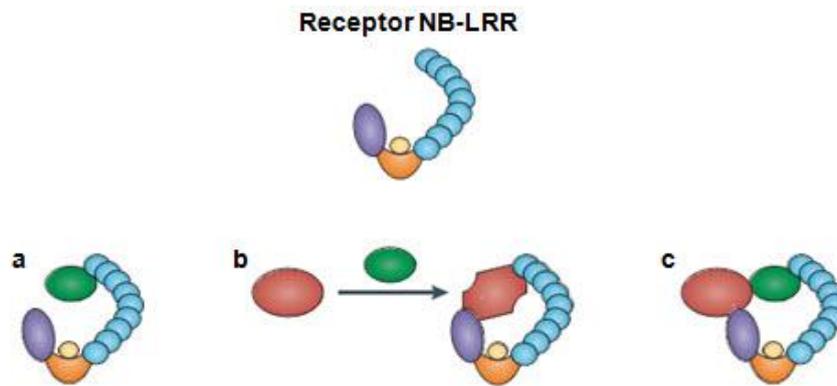


Figura 2. Representación del modelo gen-para-gen de reconocimiento directo e indirecto. Muestra las diferentes formas de interacción entre efectores (ovalo verde), proteínas blanco de efectores modificadas o no (rojo) y los receptores NB-LRR. **a, b** y **c** corresponden a los modelos de reconocimiento directo, guardia/señuelo y *bait-switch* respectivamente. El receptor NB-LRR presenta un dominio LRR carboxi-terminal (celeste), un dominio NB central (naranja) que une ATP o ADP (ovalo amarillo) y un dominio Toll amino-terminal, receptor interleuquina-1, proteína de resistencia (TIR) o “coil-coiled” (ovalo púrpura). Imagen modificada a partir de Dodds et al. 2010.

1.1.1.3 Vías de señalización y respuestas PTI y ETI

Los acontecimientos que ocurren luego del reconocimiento del patógeno por PRRs o NB-LRRs suelen ser parecidos. Dentro de las primeras respuestas se da un rápido flujo de iones de calcio, un estallido de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs). Posteriormente hay una reprogramación de la expresión de genes, deposición de calosa en sitios de la pared celular por donde se está dando la infección y muy a menudo una muerte celular localizada (HR). Existe una superposición importante entre perfiles de expresión de genes producida por la mayoría de los PAMPs (Boller et al. 2009). Dado que los patrones de expresión bajo los tipos de respuestas PTI y ETI son muy parecidas entre sí, se infiere que las respuestas son prácticamente las mismas, pero varían en magnitud (Tao et al. 2003).

Las vías por MAPK son un componente de la transducción de señales común en eucariotas que transfieren señales desde los receptores extracelulares a respuestas celulares. Una cascada MAPK típica consiste en un complejo modulador de una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) que fosforila a una MAPK quinasa (MAPKK), la cual fosforila a una MAPK. Esta vía regula la actividad de varios sustratos como ser factores de transcripción y proteínas quinasas. Es importante destacar que las cascadas MAPK se encuentran tanto en respuestas PTI como en ETI (Pitzschke et al. 2009). Ha sido posible caracterizar una cascada MAPK luego del reconocimiento de la flagelina por los receptores PRR en *A. thaliana* que comprende la

activación de las MAPKKs MKK4 y MKK5, luego las MARKs MPK3 y MPK6, lo cual da lugar a la activación de los factores de transcripción del tipo WRKY (llamados así por un dominio aminoacídico conservado con los residuos WRKY en el extremo N-terminal y una estructura de dedos de Zinc en el extremo C-terminal). La cascada finaliza con la expresión de genes de defensa (Asai et al. 2002; Eulgem et al. 2000; Rushton et al. 1996).

Un evento que ocurre tempranamente luego de una infección por patógenos es el llamado estallido oxidativo (“*oxidative burst*”) que consiste en la producción y acumulación de ROS como ser $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Doke et al. 1996; Low et al. 1996; Tenhaken et al. 1995). Es probable que la generación de ROS se deba a la acción de las oxidasas de NADPH y oxalato, así como también por las peroxidasas de la pared celular durante la respuesta de defensa de la planta (Bolwell et al. 1995; Tenhaken et al. 1995; Zhang et al. 1995). El estallido oxidativo se produce en dos instancias, la primera ocurre en minutos tanto en interacciones susceptible como resistentes, mientras que en la segunda la acumulación de ROS es de mayor duración y ocurre dentro de unas pocas horas luego de la infección y solo en una interacción resistente (Baker et al. 1995; Levine et al. 1994). Las ROS cumplen una función importante en la respuesta de defensa de la planta, tal es el caso para los aniones superóxido y el H_2O_2 . Éste último se encuentra en elevadas concentraciones durante la HR en las zonas adyacentes a la pared celular por donde las bacterias invaden (Bestwick et al. 1997). A su vez, se demostró que el H_2O_2 posee actividad antimicrobiana directa (Peng et al. 1992), y contribuye al reforzamiento de la pared celular por medio de la estimulación de la lignificación y unión cruzada de glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (Bradley et al. 1992; Brisson et al. 1994). El H_2O_2 no solo actúa en la defensa de forma directa como agente antimicrobiano o por reforzamiento de la pared celular, sino que también pueden funcionar como segundo mensajero para inducir genes relacionados a la defensa y la muerte celular por HR (Jeffery L. Dangl et al. 1996; Doke 1983a, 1983b; Doke et al. 1988; Green et al. 1995; Levine et al. 1994).

Las hormonas también cumplen un rol importante en las vías de señalización y en la respuesta de defensa de la planta ante patógenos. Su función es la de activar la expresión de ciertos genes de defensa y la de funcionar como reguladores finos de las vías de señalización y respuesta de defensa de la planta. Las hormonas más importantes que se destacan son el SA, el etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA). Mientras que en términos generales el SA se encuentra relacionado a la defensa contra patógenos biótrosos y hemibiótrosos (Glazebrook 2005; Halim et al. 2007;

Spoel et al. 2007), se cree que las hormonas ET y JA trabajan juntas, aunque no siempre, para aumentar la defensa de la planta frente a patógenos necrótrofos (Glazebrook 2005; Spoel et al. 2007). Es posible usar genes asociados a las vías del SA o JA/ET como marcadores para determinar el rol de cada vía en la interacción entre el huésped y el patógeno. Alguno de estos genes son PDF1.2 que codifica para una defensina (Penninckx et al. 1996; Thomma et al. 1998), PR-4, proteína “*hevein-like*” que se une a la quitina, PR-3, una quitinasa, y THI2.1 (Epple et al. 1995; Norman-Setterblad et al. 2000). Por lo general las vías del SA y la de JA/ET funcionan de forma antagónica (Leslie et al. 1988; Spoel et al. 2003, 2007), aunque se han registrado casos en que se evidencia una cooperación entre ambas vías (Adie et al. 2007; Wasternack et al. 1994). El SA media un cambio en el potencial redox celular lo que provoca la reducción del oligómero formado por NPR1s a su forma monomérica. Este NPR1 monomérico es translocado al núcleo para funcionar como un coactivador transcripcional de genes de respuesta al SA como PR-1, mediante la potenciación de la unión del factor de transcripción TGA a los promotores de elementos de respuesta al SA (Loake et al. 2007; Van Oosten et al. 2008). En la vía de señalización del JA el complejo ligasa ubiquitina E3-SCF^{COI1} y las proteínas represoras “*jasmonate ZIM-domain*” (JAZ) forman un complejo, evitándose la transcripción de genes de respuesta al JA (Katsir et al. 2008). Luego de la acumulación del JA, se forma la isoleucina-JA (JA-Ile) que se une a la proteína F-box COI1 en el complejo SCFCOI1, marcando de esta manera al represor JAZ para ser ubiquitinizado y degradado por el proteosoma 26S. Como resultado se obtiene la activación de los genes de respuesta al JA a través de los factores de transcripción como MYC2, ERF1 y ORA59 (Lorenzo et al. 2005; Pré et al. 2008). En cuanto a lo que respecta a la vía del ET se sabe que esta hormona es percibida por un receptor de membrana como el ETR1 (Kendrick et al. 2008). Luego de la percepción de ET se detiene la represión de la señalización por parte de CTR1 (regulador negativo) lo que permite que se active la vía de señalización a través de EIN2 (regulador positivo) para dar lugar a la activación de reguladores positivos críticos de la expresión de genes de respuesta al ET, como EIN3. Lo anterior sucede porque la degradación por parte del proteosoma 26S- E3 ubiquitin ligasa SCF^{EBF1/2} dependiente se ve inhibida, permitiendo que los factores de transcripción del tipo EIN3 activen otros factores de transcripción como ERF1 resultando en la expresión de genes de respuesta al ET (Pieterse et al. 2009).

Además del SA, JA y ET, otras hormonas como las auxinas, citoquininas, giberilinas, brasinosteroides y ácido abscísico (ABA) participan en la respuesta de defensa de la planta

(Asselbergh et al. 2008; Mauch-Mani et al. 2005; Nakashita et al. 2003; Navarro et al. 2006, 2008; Shan et al. 2008; Siemens et al. 2006; Walters et al. 2006; Wang et al. 2007). El hecho de que se vean involucrados tantos reguladores del crecimiento en la inmunidad de la planta sugiere que el control de su crecimiento, desarrollo y defensa se encuentran intercomunicados en una red de vías de señalización de hormonas. Esta regulación podría ser responsable de permitir que las plantas se adapten rápidamente al estrés biótico o abiótico y a utilizar sus recursos de una forma costo-eficiente.

1.1.2 Factores de transcripción con dominio APETALA 2/ proteína de unión a elementos de respuesta al etileno (AP2/ERF)

La superfamilia de factores de transcripción APETALA2/*Ethylene Responsive Factor* (AP2/ERF) fue inicialmente definida como específica de plantas, sin embargo con la aparición de nuevas tecnologías y de nuevas bases de datos fue posible encontrarlas en protistas, cianobacterias y fagos (Wessler 2005). Una de las hipótesis que explican esto está relacionada con la aparición de esta superfamilia en plantas debido a una transferencia horizontal de genes, proveniente de bacterias o virus, que codifican para proteínas con dominios AP2 (Licausi et al. 2010).

Para su clasificación las proteínas AP2/ERF que contienen al menos un dominio de unión al ADN, llamado AP2, fueron divididas en tres familias separadas llamadas ERF, AP2 y RAV. La mayoría de las proteínas que presentan un único dominio AP2 y cuya secuencia genómica contiene un pequeño número de intrones son asignadas a la familia ERF (Nakano et al. 2006). En cambio la familia AP2 está conformada por una mayoría de proteínas con dos dominios AP2 repetidos en tándem y un número pequeño de proteínas con un único dominio AP2 que muestra una mayor similitud a los dominios contenidos en proteínas con doble dominio AP2 que a aquellos dominios AP2 encontrados en proteínas ERF. A su vez, la familia AP2 caracterizada por un doble dominio AP2 se subdivide en los grupos AP2 y ANT (por AINTEGUMENTA) según la secuencia aminoacídica del doble dominio AP2 y la secuencia de localización nuclear (Shigyo et al. 2004). La familia RAV se compone por proteínas que poseen un dominio ERF asociado a un dominio de unión al ADN B3 (Swaminathan et al. 2008). Además de las categorizaciones anteriores existe una clase llamada “*Soloist*”, las cuales son proteínas que poseen una secuencia que también forma parte de la familia AP2/ERF y aunque esta proteína contiene un único dominio AP2 su secuencia y estructura génica divergen

fuertemente de aquellas presentes en los factores de transcripción ERF (Licausi et al. 2010; Nakano et al. 2006; Zhuang et al. 2008) (Figura 3). A lo largo del tiempo se ha mantenido el acrónimo ERF sin embargo su respuesta ante el etileno como regulador del crecimiento no es una característica universal de esta superfamilia de proteínas. Además su elemento conservado de unión al ADN no se ve directamente afectado por la señalización por etileno.

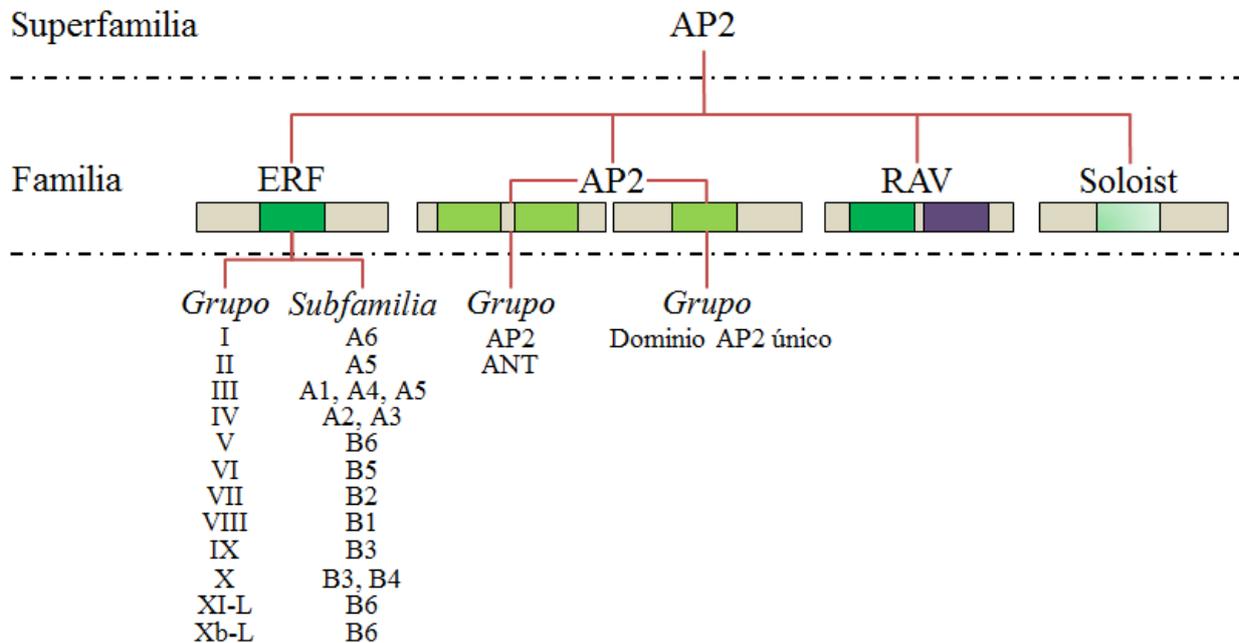


Figura 3. Esquema que muestra la estructura y composición de la superfamilia AP2/ERF. Las distintas tonalidades de los diferentes recuadros verdes representan dominios AP2/ERF mientras que el recuadro violeta representa un dominio de unión al ADN del tipo B3.

La familia ERF puede subdividirse según la similitud de sus dominios AP2. De esta forma surgieron dos subfamilias, una perteneciente a las proteínas de unión a elementos de respuesta a deshidratación (*Dehydration-Responsive Element Binding-proteins*, DREB) y la otra a los ERFs, cada uno separable en seis subfamilias (A1-A6 y B1-B6 respectivamente, Figura 3) (Sakuma et al. 2002). Unos años más tarde la misma superfamilia volvió a evaluarse por Nakano et al. 2006 quienes propusieron una nueva clasificación basándose en la estructura intrón-exón de genes ERF y la aparición de motivos adicionales subdividiéndose así en doce grupos que coincidían substancialmente con la clasificación en subfamilias realizadas por Sakuma et al. 2002.

La estructura tridimensional del dominio de unión al ADN, AP2 de la superfamilia AP2/ERF, se caracteriza por estar formada por 60 residuos de aminoácidos los cuales debido a sus

propiedades le confieren una estructura tridimensional organizada en una capa de tres láminas beta seguida por una hélice alfa en paralelo (Allen et al. 1998) (Figura 4). La distinción entre los dominios DREB y ERF dentro de la familia ERF se realiza a partir de la identidad de los residuos en sitios específicos de su dominio AP2 (Sakuma et al. 2002). El reconocimiento por parte de las proteínas AP2/ERF de secuencias de ADN específicas se da a través de las láminas beta (Figura 4) y por lo tanto cambios aminoacídicos realizados en esa estructura repercutirán en diferentes afinidades y especificidades para ambas subfamilias. Se ha visto que varias proteínas DREB se unen al elemento A/GCCGAC, el cual se asocia a genes de respuesta a ABA, sequía y frío (Stockinger et al. 1997; Yamasaki et al. 2013). En cambio, miembros de la subfamilia ERF se unen específicamente a elementos AGCCGCC (conocidos como caja GCC) *in vitro*. Estas cajas GCC suelen encontrarse en promotores de genes que responden al etileno, patógenos y heridas (Ohme-Takagi et al. 1995). De igual manera se ha reportado que algunos miembros de ambas familias son capaces de unirse a elementos DRE y GCC (Sun et al. 2008) o incluso a elementos de ADN novedosos que divergieron significativamente a partir de estos dos (Shaikhali et al. 2008; Welsch et al. 2007).

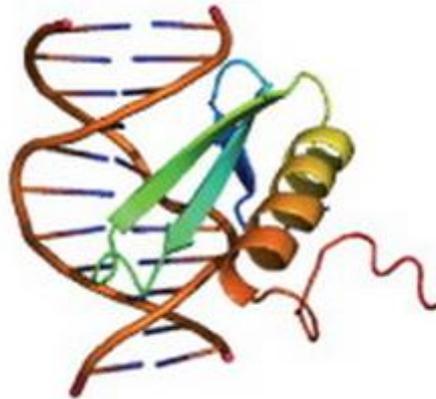


Figura 4. Interacción de la estructura tridimensional de un factor de transcripción del tipo AP2/ERF con uno de los surcos mayores de una hélice doble cadena de ADN por intermedio del plano de las tres láminas beta. Imagen modificada de Yamasaki et al. 2013.

Los factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia AP2, pueden clasificarse como activadores o represores dependiendo de si activan o suprimen la transcripción de genes blanco. Aquellos considerados como represores pueden ser subclasificados como represores activos o pasivos. Los activos presentan un dominio de represión (RD) que confiere actividad represora al factor de transcripción o al dominio de unión al ADN y cuando se une a la región del

promotor es capaz de prevenir activamente la transcripción del gen blanco. Por el contrario los represores pasivos no poseen un dominio RD, suprimen la transcripción compitiendo con activadores transcripcionales por la secuencia blanco de unión en el ADN (Licausi et al. 2013). Los factores de transcripción clasificados como activadores presentan dominios de activación, pero este dominio no presenta un motivo de secuencia distintivo sino que tienden a ser ricos en residuos aminoacídicos ácidos (Ohta et al. 2000).

Las proteínas ERFs fueron originalmente aisladas como factores de transcripción que se unen a la región del promotor de genes de respuesta al estrés biótico o abiótico y a las hormonas etileno, jasmónico y ABA, también relacionadas al estrés. Se tiene la concepción de que el grupo formado por factores de transcripción del tipo ERFs confieren tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico cuando se le expresa de forma constitutiva en diferentes plantas y condiciones. Varios ERFs son capaces de activar la transcripción de genes de defensa, genes PR, incluyendo la osmotina, quitinasa y β -1,3-glucanasa (Licausi et al. 2013). De todos los ERFs los más estudiados hasta el momento son los factores de transcripción ERF1 y su homólogo ERF-IX los cuales se inducen en la respuesta a patógenos en *A. thaliana* (Li et al. 2011; Zhang et al. 2012). En cambio los ERFs pertenecientes al grupo de las proteínas DREB son los más estudiados en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, los cuales son inducidos rápidamente ante el estrés por frío y cuando se expresan constitutivamente mejoran la tolerancia al mismo (Jaglo-Ottosen et al. 1998; Kasuga et al. 1999; Liu et al. 1998). En otros casos, genes de la familia ERF resultaron conferir tolerancia no a un único tipo de estrés sino a múltiples tipos de estrés cuando son expresados constitutivamente en la planta (Fukao et al. 2011; Mito et al. 2011; Seo et al. 2010; Yi et al. 2004).

La necesidad de conocer más sobre los factores de transcripción del tipo AP2/ERF proviene del interés en generar plantas más resistentes a estrés biótico y abiótico. Un mayor manejo de las vías de señalización y de respuesta a los diferentes tipos de estrés proporcionaría además la posibilidad de tener un mejor manejo o control de plagas y la posibilidad de utilizar nuevas tierras para sembrar, tierras donde antes no era posible debido a sequías, bajas temperaturas o inundaciones. Ejemplos de lo anterior pueden encontrarse en trabajos realizados por Xu et al. 2006 y Xu et al. 2011 en los cuales se obtuvieron cultivos capaces de resistir inundaciones por cruzamientos con plantas salvajes y plantas cisgénicas o transgénicas que sobreexpresan genes ERF. Sin embargo en ocasiones se ha observado que la sobreexpresión constitutiva de un regulador transcripcional como ser un ERF puede llevar a un crecimiento atrofiado de la planta

(Pré et al. 2008), limitando de esta forma su aplicación biotecnológica. De igual forma sería posible el uso de genes que tuviesen impacto negativo en el desarrollo de la planta pero positivo en cuanto al manejo de estrés si se usa un promotor huésped específico e inducible por estrés en vez de promotores de expresión constitutiva.

1.2 Physcomitrella patens como sistema modelo

El musgo *P. patens* pertenece al filo briofita y como tal se cree que divergieron hace unos 475 millones de años atrás, a partir de un alga verde como ancestro en común, como grupo de plantas terrestres que empezaron a colonizar la tierra. Más adelante, hace aproximadamente 420 millones de años surgieron las primeras plantas vasculares (traqueofitas) las cuales siguieron evolucionando y divergiendo hasta el presente creándose así cuatro *subphylums* de los cuales el *Pteropsida* es el más conocido por representar al grupo más grande del reino vegetal. Las *Pteropsidas* comprenden tres clases, las *Filicineas* (helechos), las *Gimnospermas* (coníferas) y las *Angiospermas* (plantas con flor). Lo anterior se encuentra esquematizado en el cladograma de la figura 5. Lo anterior coloca a *P. patens* en una posición ideal para realizar estudios comparativos sobre la evolución de los procesos biológicos en plantas terrestres.

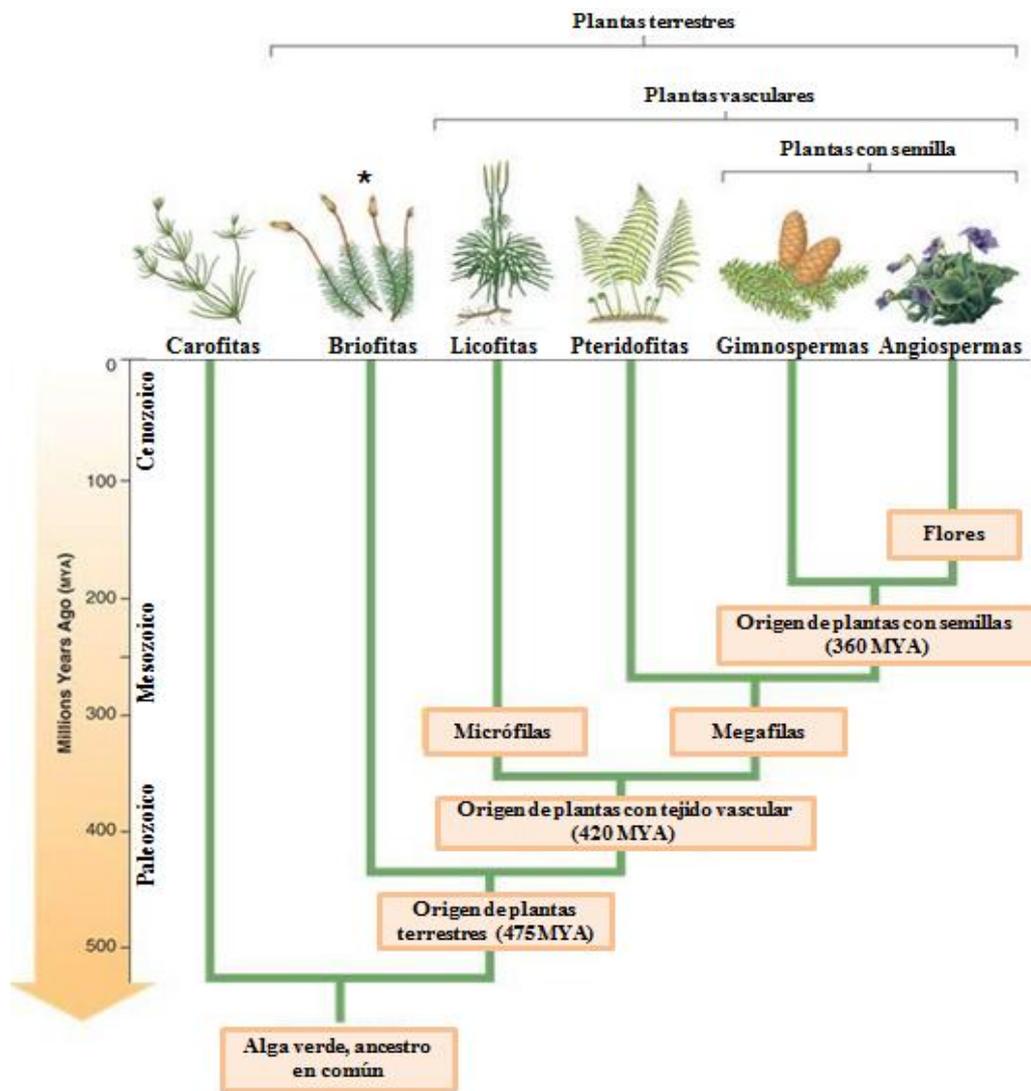


Figura 5. Cladograma de plantas donde se muestra la evolución de éstas a partir de un alga verde como ancestro en común. (Briofitas; *): Clado en el que se encuentran ubicados los musgos. (MYA): Unidad de medida en millones de años atrás. Figura modificada a partir de la obtenida en <https://classconnection.s3.amazonaws.com/64/flashcards/897064/jpg/bio41321475618417.jpg>

Al igual que los helechos y las plantas con semilla los musgos presentan lo que se conoce como alternancia de generaciones. Esto se debe a que poseen una fase haploide que produce gametos mediante la formación de gametofitos y una fase diploide que produce esporas haploides por meiosis a través de la generación de esporofitos. Sin embargo, al contrario de las plantas con semillas y de los helechos, en *P. patens* el gametofito es la fase dominante lo que significa que la mayor parte del tiempo la planta se encuentra en su fase haploide. Ya sea a partir de tejido adulto, fragmentos de este o a partir de esporas el primer tipo de filamento que surge es el cloronema. El cloronema es uno de los dos tipos de filamentos que componen el protonema, fase primaria de crecimiento en los musgos. Como características el cloronema presenta células

con muchos cloroplastos y división perpendicular al eje axial del filamento por una pared celular entre células adyacentes. Su crecimiento es polarizado y se da de forma apical. El caulonema, segundo tipo de filamento que forma parte del protonema, surge a partir de la zona apical del cloronema y presenta menor densidad de cloroplastos y menor cantidad de clorofila, y las paredes que separan células adyacentes en el caulonema son oblicuas. Es a partir de brotes laterales del caulonema que surgen las yemas que darán lugar a los gametóforos, que están formados por tallos con hojas avasculares en forma de monocapa y rizoides. Los gametóforos crecen hacia arriba en dirección a la fuente de luz (fototropismo positivo). Los esporofitos son la segunda fase de crecimiento y es donde se producirán las esporas. En el caso de *P. patens* tanto los gametos masculinos como femeninos son producidos por la misma planta (Cove et al. 1997). En la figura 6 se encuentra una breve descripción del ciclo de vida de *P. patens*.

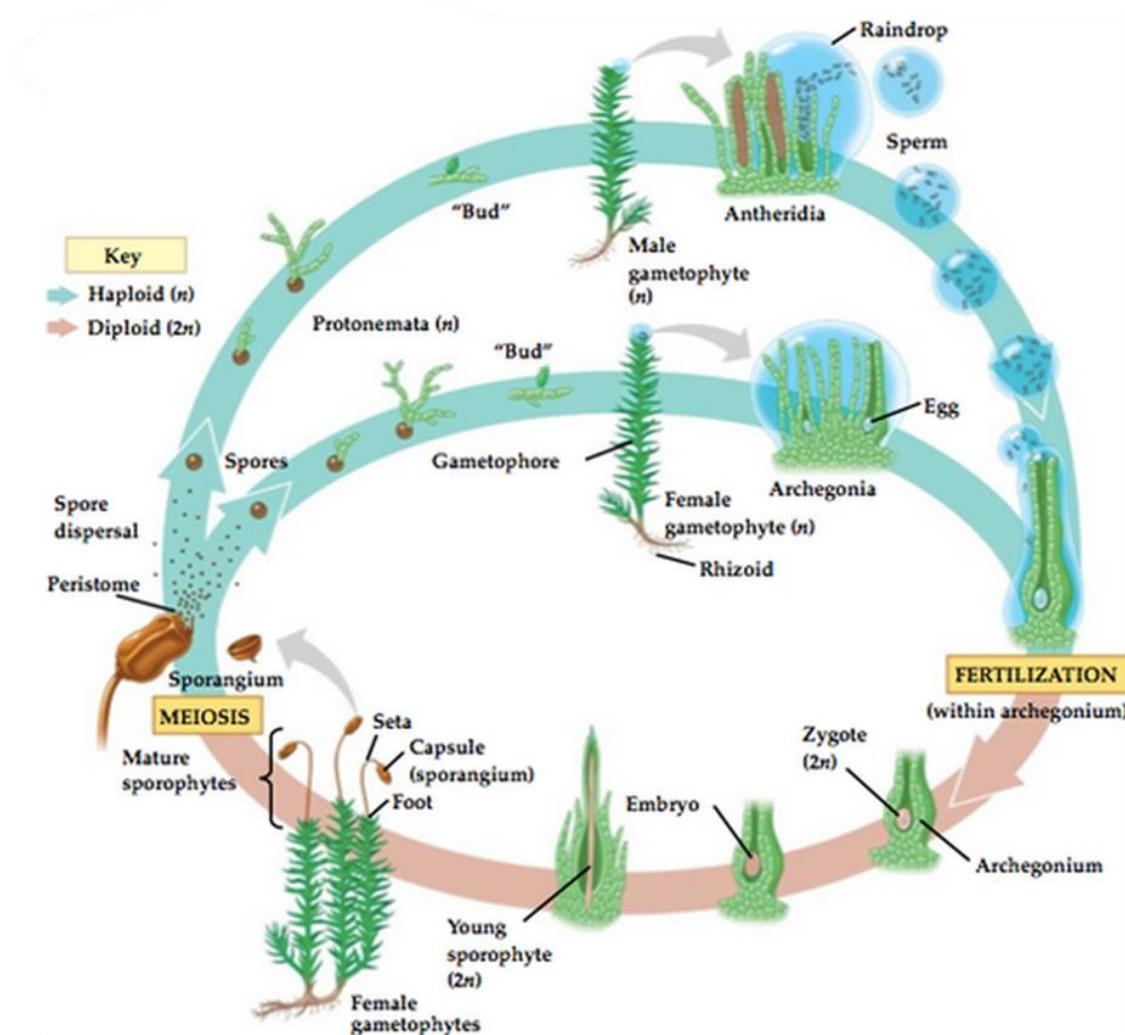


Figura 6. Ciclo de vida de las briofitas basado en musgos. Se muestra la alternancia de generaciones entre fases haploide (n) y diploide ($2n$). Luego de la germinación de las esporas se forma un tejido filamentosos llamado protonema compuesto por el caulonema (filamento amarronado con pocos cloroplastos) y el cloronema (filamento verde con gran cantidad de cloroplastos). A partir del protonema surgen las yemas o brotes ("bud")

que darán lugar a los gametofitos donde se formarán las estructuras reproductivas masculinas (anteridios) y femeninas (arquegonios). El agua es el medio de transporte de los anterozoides (células sexuales masculinas flageladas) hacia el interior del arquegonio donde se encuentra la oosfera (célula sexual femenina). Luego de la fecundación se formará el cigoto (2n) quien dará lugar al embrión el cual empezará a formar el esporofito. Una de las partes del esporofito es el esporangio dentro del cual las células se separan primero por mitosis y luego por meiosis volviendo a ser células haploides. Estas células haploides serán las futuras esporas las cuales al terminar de madurar y al darse las condiciones necesarias (alta humedad o lluvia) serán liberadas al ambiente, dispersándose para comenzando el ciclo nuevamente. Figura obtenida y modificada a partir de <https://quizlet.com/12873985/bio-lecture-12-flash-cards/>

Las características de *P. patens* que la hacen un buen sistema modelo para estudiar procesos biológicos de plantas se relacionan con su patrón relativamente sencillo de desarrollo, su facilidad para realizar análisis de linaje celular, y la presencia de respuestas similares ante factores de crecimiento de plantas y estímulos ambientales con respecto a otras plantas terrestres (Schaefer 2002). Los tejidos de *P. patens* pueden propagarse continuamente *in vitro*, lo cual requiere de poco espacio. Los tejidos pueden además regenerarse a partir de protoplastos o después de la rotura mecánica de tejidos (Ishikawa et al. 2011; Sugimoto et al. 2011). *P. patens* presenta un genoma de 460 Mb conformado por 27 cromosomas (Schaefer and Zrýd 2001). *P. patens* puede ser transformada mediante la incorporación de ADN a protoplastos mediante polietilenglicol (PEG) dando lugar a transformantes estables (Prigge et al. 2010; Schaefer et al. 1991). El hecho de que su fase dominante sea haploide es relevante porque permite ver directamente los efectos de mutaciones recesivas sin necesidad de hacer retrocruzas. Además es una planta cuyos tejidos se encuentran formados por una monocapa de células lo que facilita su observación en el microscopio, el seguimiento de procesos biológicos y el patrón de desarrollo a nivel de una única célula (Schaefer and Zrýd 2001). A su vez es posible crear cepas somáticas diploides mediante la fusión de protoplastos a partir de dos cepas diferentes usando como marcadores selectivos auxotrofias complementarias o resistencia a antibióticos. Estos híbridos permitirían hacer pruebas de dominancia, por ejemplo cuando el fenotipo mutante es recesivo, y los análisis por complementación son posibles (Featherstone et al. 1990). Otra característica de *P. patens* que le ha otorgado mucho valor para ensayos genéticos es la capacidad de realizar estudios de genética reversa, aprovechando que su genoma está secuenciado y que presenta una alta frecuencia de recombinación homóloga, comparable a la de las levaduras, lo cual permite realizar “*Knockouts*”, mutaciones puntuales o sustituciones de genes (Cove et al. 1997; Kamisugi et al. 2006; Rensing et al. 2008; Schaefer 2002). Lo anterior se logra mediante la creación de vectores que pueden ser de inserción, por lo general utilizados para realizar “*Knockouts*”, o silenciamiento génico (Figura 7A), o vectores de

reemplazo alélico, los cuales pueden ser usados para generar “*Knockouts*”, sustituir unos genes por otros o insertar secuencias con mutaciones puntuales (Figura 7B).

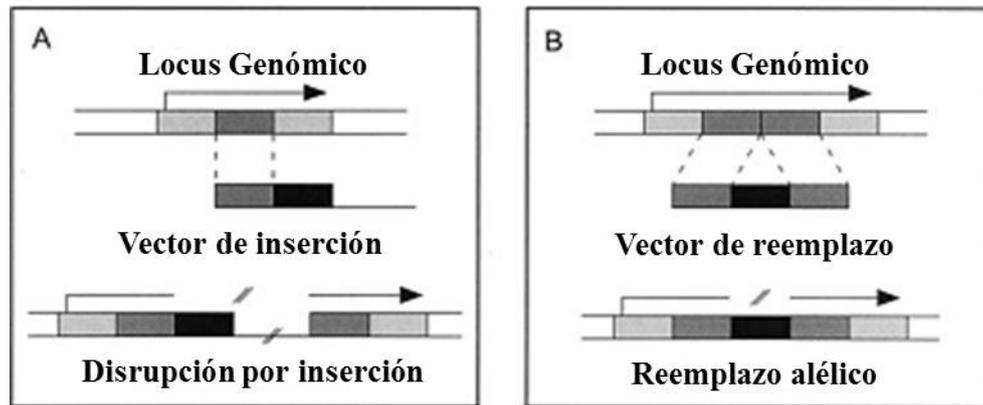


Figura 7. Diseño típico de vectores usados en la transformación de *P. patens*. (A). El vector de inserción cuenta con un fragmento genómico (gris oscuro) al lado de un marcador de selección (negro). La integración dirigida se caracteriza por la inserción de una o varias copias del vector a través de recombinación homóloga con las secuencias genómicas. La mutación resultante es una inactivación del gen por inserción. (B). El vector de reemplazo lleva un marcador de selección (negro) inserto entre dos secuencias genómicas. La integración ocurre a través de dos eventos de recombinación homóloga. El resultado es la pérdida de función del gen por reemplazo alélico. Modificado de Schaefer and Zrjyd 2001.

El hecho de que *P. patens* pueda ser infectado por patógenos que atacan importantes cultivos de plantas podría permitir diseccionar los mecanismos de acción que se están dando en dicha interacción y entender en más detalle la forma en que los patógenos causan enfermedades y cómo las plantas responden a ello activando mecanismos de defensa complejos. En este sentido nuestro grupo de investigación se ha centrado en identificar patógenos de amplio rango de hospedero que infectan *P. patens* y analizar las respuestas de defensa activadas luego de la infección. Dentro de los patógenos que causan importantes daños en cultivos y que también infectan a *P. patens* encontramos al hongo *Botrytis cinerea*, los oomicetes *Pythium irregulare* y *Pythium debaryanum* y la bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*P.c. carotovorum*) que infectan y se multiplican en los gametofitos causando amarronamiento, necrosis y maceración del tejido (Oliver et al. 2009; Ponce de León et al. 2007). En general las respuestas de defensa activadas en *P. patens* en respuesta a la infección son similares a las de las plantas vasculares, entre ellas, acumulación de ROS, HR, fortalecimiento de la pared celular y activación de la expresión de genes de defensa (Oliver et al. 2009; Ponce de León et al. 2007; Lawton and Saidasan 2009). Se sabe que tanto en respuesta a la inoculación con *B. cinerea* como con ambas especies de *Pythium*, al igual que con tratamientos con filtrado celular de *P. c. carotovorum*, que contiene enzimas que degradan la pared celular, *P. patens* induce la

expresión de algunos genes de defensa como ser lipoxigenasas (*LOX*), fenilalanina amonioliasa (*PAL*), chalcona sintasa (*CHS*) y la proteína relacionada con la patogenicidad 1 (*PR-1*) (Oliver et al. 2009; Ponce de León et al. 2007). La enzima PAL es central en la síntesis de fenilpropanoides, incluyendo la síntesis de monómeros de lignina, fitoalexinas y la producción de SA, mientras que la enzima CHS es la primera enzima en la vía de síntesis de flavonoides (Dixon et al. 1995). Por otro lado, las enzimas LOX están involucradas en la síntesis de ácidos grasos oxigenados conocidas como oxilipinas, incluyendo el JA y aldehídos, que tienen gran importancia para las funciones de defensa de las plantas vasculares frente a infecciones por microorganismos e insectos (Feussner et al. 2002). Resulta interesante destacar que el JA no se sintetiza en *P. patens* y por lo tanto otro tipo de moléculas, incluyendo otro tipo de oxilipinas, pueden ser importantes en la respuesta de defensa de este musgo (Ponce de León et al. 2012, 2015). El aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas del tipo dirigentes (DIR), ocurre luego de la infección de *P. patens* con *B. cinerea* detectándose a su vez la acumulación de compuestos fenólicos en la pared celular adyacente al sitio de infección por donde penetra el hongo (Ponce de León et al. 2012). Se piensa que las proteínas DIR median la unión de monolignoles para formar lignanos y ligninas (Davin et al. 2000) las cuales participarían en la respuesta de defensa frente a patógenos (Chakravarthy et al. 2010; Coram et al. 2008). Dado que *P. patens* no sintetiza lignina, DIR probablemente está involucrada en el acoplamiento de monolignoles que darán lugar a compuestos del tipo lignina (Ponce de León et al. 2012). Otras respuestas inducidas por el tratamiento con patógenos de *P. patens* son el colapso citoplasmático, la acumulación de compuestos autofluorescentes y desintegración de cloroplastos, los cuales están asociados a la repuesta HR (Ponce de León et al. 2007, 2012). El conocimiento generado hasta la fecha sobre las respuestas de defensa que se activan en este musgo luego de la infección con microorganismos patógenos, demuestra que si bien varios de los mecanismos que se activan son similares entre *P. patens* y plantas vasculares, otros no lo son, por lo que resulta interesante seguir generando conocimiento en esta planta.

En el laboratorio se generó una biblioteca de expresión diferencial mediante la técnica “*Suppression substrative hybridization*” (SSH) (Cho et al. 2007; Diatchenko et al. 1996) de plantas control versus plantas tratadas con el filtrado de cultivo (CF) de *P.c. carotovorum*. A partir de este trabajo se identificó un gen inducido por elicitores de *P.c. carotovorum* que codifica para un posible factor de transcripción con dominio AP2/ERF al cual denominamos

PpAP2. En este trabajo de tesis nos proponemos profundizar en el estudio de la función de PpAP2.

2. Objetivos generales y específicos

Como objetivo general se propone analizar si la sobreexpresión de PpAP2 en *Physcomitrella patens* y *Arabidopsis thaliana* aumenta la resistencia a patógenos.

Los objetivos específicos comprenden:

- 1) Analizar si la sobreexpresión del factor de transcripción PpAP2 de *Physcomitrella patens* altera la susceptibilidad a patógenos en este musgo comparado con plantas salvajes.
- 2) Analizar si la sobreexpresión del factor de transcripción PpAP2 de *Physcomitrella patens* en *Arabidopsis thaliana* altera la susceptibilidad a patógenos comparado con plantas salvajes.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

3.1.1 *Physcomitrella patens*

El musgo *P. patens* Gransden tipo salvaje (wild-type; wt) (D. Schaefer et al. 1991) fue utilizado en todos los estudios de este trabajo. Los cultivos de *P. patens* tanto en estado de protonema como en forma de colonia fueron mantenidos y subcultivados *in vitro* en placas de Petri con medio sólido 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 Na₂MoO₄·2H₂O 0.025 mg/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L (1mM), KH₂PO₄ 0.25 g/L (1.8 mM) pH 6.5, KNO₃ 1.01 g/L (10 mM), FeSO₄ 12.5 mg/L (45 μM), CaCl₂ 1 mM, tartrato de amonio 5 mM] con agar 10 g/L, (Ashton et al. 1977) y en algunos casos cubiertos con discos de celofán estéril. *P. patens* fue crecido a 22-24°C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. La micropropagación del material vegetal se realizó con material estéril en una cámara de flujo laminar.

3.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de líneas sobre-expresantes y para la comparación fenotípica, se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Las plantas de *Arabidopsis* fueron crecidas *in vitro* en placas con medio MS (Murashige et al. 1962) con la mitad de concentración (1/2 MS) pH 5.7, 0.7% agar en un cuarto de crecimiento con 100 μmol m⁻²seg⁻¹ de intensidad lumínica y fotoperiodo 16 h luz/8 oscuridad a 24°C. Se esterilizó la superficie de las semillas sumergiéndolas primero en EtOH al 70% por un máximo de cinco minutos y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 7% y *Tween* 20 al 0,05% durante 15 minutos con agitación. Por último se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril de cinco minutos cada uno y se procedió a sembrar las semillas en el medio ya mencionado. Las semillas se estratificaron durante dos días en heladera a 4°C y se transfirieron al cuarto de crecimiento.

3.2 Cepas y cultivo de microorganismos

3.2.1 *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas DH10B, DH5α y la DB3.1 de *E. coli*. Los cultivos de *E. coli* se incubaron en medio Luria-Bertani (LB) [1% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl] líquido o sólido (LB 1,5% agar) a 37°C o.n. (“*over night*”) a no ser que se especifique otra temperatura.

Se obtuvieron células quimiocompetentes de la cepa DH10B de *E. coli* mediante tratamiento en frío con buffer CCMB80 [KOAc 10 mM pH7, CaCl₂.2H₂O 11.8 g/L (80 mM), MnCl₂.4H₂O 4.0 g/L (20 mM), MgCl₂.6H₂O 2.0 g/L (10 mM), 10% glicerol 100mL/L] (Modificado de “http://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_cells”). Para preparar células quimiocompetentes la cepa DH10B fue incubada en medio LB a 20°C hasta obtener una densidad óptica de 0.3 a 600 nm. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1/3 del volumen del cultivo inicial con buffer CCMB80 y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1/25 del volumen inicial con buffer CCMB80 y se incubó durante 20 minutos en hielo. Se congelaron alícuotas de 100 µL y 200 µL en nitrógeno líquido. Las células quimiocompetentes se almacenaron a -80°C y fueron chequeadas con ADN plasmídico de concentración conocida. La eficiencia de transformación de las células quimiocompetentes que se utilizaron en este trabajo fue de 1×10^6 ufc/mL. Las células de *E.coli* transformadas fueron incubadas en LB con Ampicilina (Amp) 100 µg/mL o con Kanamicina (Km) 30 µg/mL dependiendo del plásmido con las que se transformaron.

Para las transformaciones de células quimiocompetentes de *E.coli* se incubó el plásmido o 10 µL de mezcla de ligación con 100 µL de células quimiocompetentes durante 15 min en hielo y se realizó el shock térmico a 42°C por 1 min. A continuación se añadió 0.9 mL de medio LB, se incubó durante 1 h a 37°C con agitación, y finalmente se sembró el cultivo en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

También se obtuvieron células electrocompetentes de las cepas DH10B y DH5α de *E. coli*. Estas cepas fueron incubadas en medio LB a 37°C con agitación a 300 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0.5-0.7. Se enfrían las células en hielo por 20 minutos. Para todos los pasos siguientes, las células se mantuvieron a 4°C, los recipientes que se usaron con las células fueron preenfriados y los pasos de centrifugación se realizaron todos a 4000g por 15 min y a 4°C. Luego de crecidas las células se pasó el cultivo a una botella estéril de centrífuga de 500 mL, y se centrifugó como se dijo anteriormente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 mL de glicerol 10% preenfriado en hielo, se centrifugó y se volvió a descartar el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 250 mL de glicerol 10%, se centrifugó, y el pellet se resuspendió en 20 mL de glicerol 10%. Finalmente se volvió a centrifugar y el

pellet se resuspendió en un volumen final de 2 ml de glicerol 10% preenfriado. Se hicieron alícuotas de 100 y 200 μ L.

En el caso de las transformaciones de células electrocompetentes de *E. coli* se incubó el plásmido o 10 μ L de mezcla de ligación con 100 μ L de células electrocompetentes durante 10 minutos en hielo y se aplicó un pulso eléctrico en el electroporador (BIO-RAD, Gene Pulser®/*E. coli* Pulser™ Systems, 2.5 kV, 200 Ω , 25mF). Luego se le agregaron rápidamente 0.9 mL de LB a la cuba, se homogenizó cuidadosamente y se transfirió a un eppendorf preenfriado para luego ser incubado por una hora a 37°C con agitación, y finalmente se sembró el cultivo en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

Se realizaron transformaciones rápidas con la cepa DB3.1 de *E. coli* para clonar los plásmido con el gen letal *ccdB*. Para ello se dejaron crecer unas horas en un eppendorf células de *E. coli* DB3.1, obtenidas a partir de colonias aisladas en placa, en un mL a 37°C y con agitación. Se centrifugó a 5000 rpm y a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el medio de cultivo y se resuspendió el pellet en 0.5 mL de CaCl₂ 0.1 M previamente enfriado. Se volvió a centrifugar a 4°C y a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se repitió este último paso una vez más, luego se resuspendió el pellet en 100 μ L de CaCl₂ 0.1 M frío. Se mantuvo en hielo hasta que se hizo la transformación la cual se realizó de igual forma que para las células quimiocompetentes.

3.2.2 Cepas de *Pectobacterium* sp

Se utilizaron los elicitores de las cepa SCC1 productora de la molécula “harpin” (HrpN) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*P. c. carotovorum*) ex *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Rantakari et al. 2001) y de la cepa SCC3193 de *Pectobacterium wasabiae* que no produce HrpN. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB por 16 h a 28°C. Para obtener el filtrado de cultivo (CF) se inoculó un cultivo líquido de LB que se incubó con agitación a 28°C hasta alcanzar una densidad de 1×10^8 ufc/mL (densidad óptica de 1.9-2.0 a 600 nm). El cultivo bacteriano fue centrifugado a 3000g por 10 minutos, y el sobrenadante fue esterilizado por filtración (0,22 μ m) y conservado en alícuotas a -20°C.

3.2.3 *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloesporioides*

Ambos hongos fueron crecidos en medio “*Potato Dextrose Agar*” (PDA) [PDB comercial (Applichem); 1.5% agar]. Las esporas se recogieron a partir de cultivos de aproximadamente tres semanas, resuspendidas en H₂O mQ (bidestilada) y se contaron en una cámara Improved-Neubauer. Para inocular las plantas se utilizaron dos concentraciones, 5×10^5 esp/mL y 2.5×10^5 esp/mL.

3.2.4 *Agrobacterium tumefaciens*

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), cepa C58C1, fue crecida a 28°C en medio YEP conteniendo triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), glucosa 0.1%, agarosa 1% (solo en caso de cultivo en placa) y NaCl 0.5% (p/v); todo ello ajustado a pH 7.0 con NaOH y esterilizado en el autoclave.

Se hicieron células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*. Se sembró en una placa de LB con rifampicina (Rif) 50 µg/mL la cepa C58C1 y se dejó incubando durante la noche a 28°C. Al otro día se inoculó una colonia aislada en un matraz de 100 mL conteniendo 5 mL de LB y Rif 50 µg/mL, se dejó incubando con agitación a 28°C durante la noche. Al otro día se inocularon los 5 mL de cultivo en un matraz de un litro, conteniendo 200 mL de LB-Rif 50 µg/mL. Se incubó de 5 a 6 horas a 28°C con agitación para luego centrifugar el cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet bacteriano fue resuspendido 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. Por último se resuspendió el pellet en 2 mL de LB y se alicuotó de a 100 µL o 200 µL en tubos eppendorf congelando instantáneamente en nitrógeno líquido durante cinco minutos. Las muestras fueron guardadas en freezer a -70°C.

Para la transformación de *A. tumefaciens* se prosiguió de la siguiente manera; Se descongeló una alícuota de células quimiocompetentes en hielo. Se le añadió 0.1-1µg de ADN o el producto de ligación, se dejó cinco minutos en hielo y luego se colocó cinco minutos en nitrógeno líquido (o en etanol 95% a -80°C). Por último se incubó a 37°C por cinco minutos. Se añadió un mL de LB al tubo eppendorf y se incubó a 28°C durante una hora en agitación. Se plaquearon alícuotas de 300 µL en medio LB-Agar con los antibióticos rifampicina 50 µg/mL y espectinomicina 100 µg/mL (este último por el vector pUB-Dest utilizado en la transformación).

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en el equipo *PERKIM ELMER*, GeneAmp PCR System 2400.

3.3.1 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en la presente tesis se encuentran detallados en la siguiente tabla (Tabla 1).

Oligonucleótido	Secuencia	T _m
OEAP2 5' fw	5'-CAGGTAATGCAGTCGAGCATAC-3'	62°C
OEAP2 3' rv	5'-TCACCTGTCTAAGACAACC-3'	56°C
Prom-Ubi	5'-ACCCTGTTGTTTGGTGTAC-3'	53.1°C

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la secuencia CDS de PpAp2 (OEAP2 5' fw y OEAP2 3' rv) y la verificación del sentido de la inserción en el vector pTHUbi-Gateway (Prom-Ubi).

3.3.2 Amplificación de la secuencia CDS de PpAP2

Dado que el gen PpAP2 no contiene intrones, la amplificación de la secuencia codificante (CDS) se realizó a partir de ADN genómico de *Physcomitrella patens*, utilizando los cebadores OEAP2 5' fw y OEAP2 3' rv. La reacción de PCR se realizó utilizando 5 µL de ADN genómico de *P. patens* (100 ng), 2.5 µL de cada cebador (0.8 µM cada uno), 0.4 µL de dNTPs (0.2 mM de cada uno), 5 µL de 10X *Taq* Buffer, 5 µL de 25 mM MgCl₂ (2 mM finales), 0.5 µL de *Taq* DNA polimerasa (5 U/µL) y se lleva a 50 µL finales con H₂O de PCR. Las condiciones para la amplificación fueron; 94°C por cinco minutos para la fase de desnaturalización inicial, 40 ciclos con temperaturas sucesivas de 94°C, 52°C y 72°C, todas de 30 segundos de duración. Por último se programó una fase final de extensión a 72°C por cuatro minutos. El producto de amplificación fue corrido en un gel de agarosa 0.8% (m/v), luego purificado del gel con “*QIAquick*[®] *Gel Extraction Kit*” y ligado al vector pGEM[®]-T Easy (*Promega*, Madison, USA). El producto obtenido de esta ligación fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH10B. De las colonias transformadas que crecieron en medio LB-Agar con selección, se realizó una extracción plasmídica por lisis alcalina y los plásmidos fueron digeridos con *EcoRI*, para confirmar la presencia del inserto.

3.4 Vectores

Se utilizó la cepa DB3.1 para clonar los vectores que tienen el gen letal *ccdB* (pENTRTM2B y pUB-Dest), la cepa DH10B para pTHUbi-Gateway y la cepa DH5 α para el plásmido final pUB-Dest con la secuencia CDS de PpAP2 integrada. Los vectores utilizados en esta tesis fueron los siguientes.

3.4.1 pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, USA)

El vector fue utilizado para clonar fragmentos de ADN amplificados por la enzima *Taq* polimerasa. Dicha enzima agrega una adenina en el extremo 3' del nuevo fragmento generando un extremo cohesivo y complementario a la timina en el extremo 5' del vector (Figura 8).

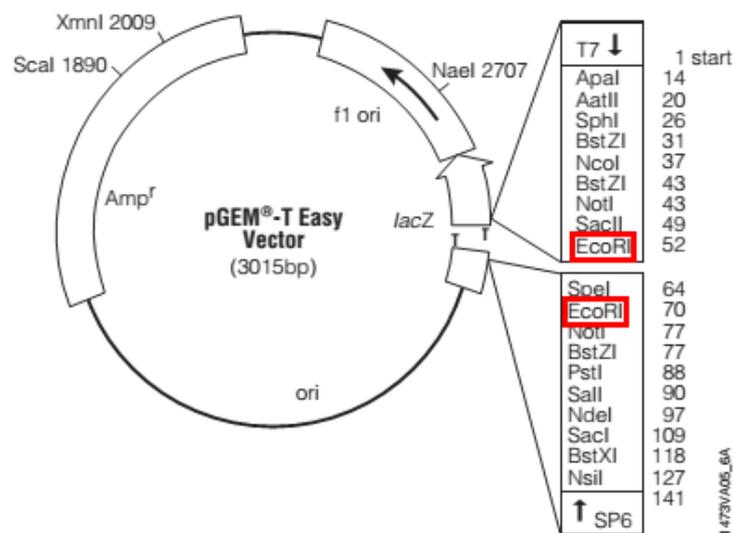


Figura 8. Puntos de referencia del mapa de restricción y secuencia del vector pGEM[®]-T Easy. En recuadros rojos se muestra la enzima de restricción usada en este vector y los sitios donde corta.

3.4.2 pENTRTM2B

Este vector fue utilizado para clonar la secuencia de interés escindida del plásmido pGEM[®]-T-Easy. Para ello, se digirió el vector PpAP2-pGEM con *EcoRI* y se linealizó el vector pENTRTM2B (Figura 9) con la misma enzima. Se seleccionó este plásmido para trabajar debido a que proporciona la posibilidad de utilizar la tecnología Gateway. Dicha tecnología es un método universal de clonado basado en las propiedades de recombinación sitio específicas del bacteriófago lambda. Permite mover secuencias de ADN de forma rápida, precisa y eficiente entre distintos vectores. Para ello uno de los requisitos que los vectores Gateway deben tener es la presencia de dos secuencias de recombinación sitio-específicas (*attL1* y *attL2*) necesarias

para que se dé la recombinación con las secuencias attR1 y attR2 respectivamente, del vector destino a utilizar. Para catalizar esta reacción se utiliza el mix enzimático LR Clonasa™ específico para la recombinación entre secuencias attL y attR. Este mix está compuesto por proteínas del factor de integración al huésped (IHF, *integration host factor*), integrasa (Int) y escisionasa (Xis).

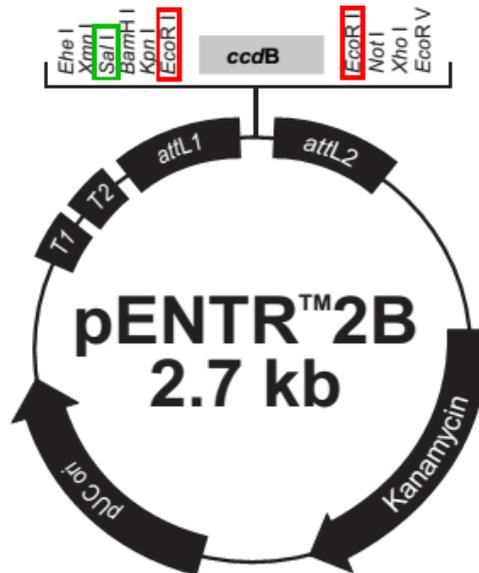


Figura 9. Mapa de restricción del vector pENTR™2B. Los recuadros de color muestran las enzimas que se utilizaron y los sitios de corte. attL1 y attL2 son las secuencias de recombinación sitio-específicas, T1 y T2 representan las secuencias de terminación de la transcripción 1 y 2 respectivamente. La secuencia pUC ori es un origen de replicación de alto número de copias, mantiene el plásmido en cepas de *E. coli*. La selección de los transformantes se hace con el antibiótico kanamicina. *ccdB* gen letal para selección negativa de los transformantes.

3.4.3 pTHUbi-Gateway

Vector final de tecnología Gateway utilizado en la transformación de *P. patens* para sobreexpresar el gen PpAP2 (Figura 10). El gen de interés quedará bajo el control del promotor constitutivo de la ubiquitina proveniente de maíz (Anterola et al. 2009). El vector pTHUbi fue cedido por Pierre-Francois Perroud, Universidad de Washington, USA. Posee un “casette” de selección que confiere resistencia a higromicina (Hyg) y contiene una región 5’ y una 3’ homologas al locus 108 de *P. patens*, el cual es una región no codificante presente en copia única en el genoma (Schaefer et al. 1997).

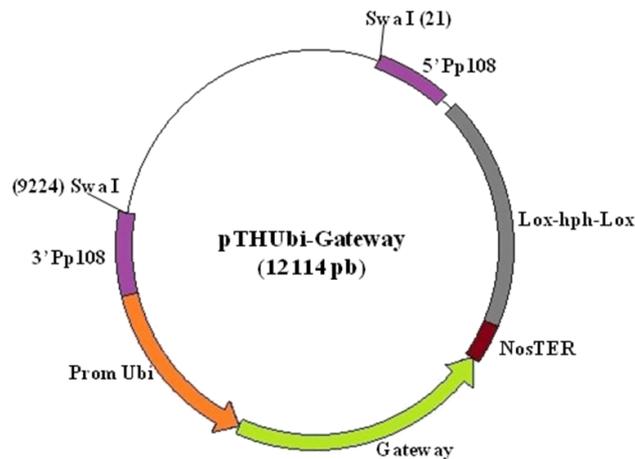


Figura 10. Vector pTHUbi-Gateway. Se esquematizan las secuencias que lo componen y sitios donde digiere la enzima (*Swa I*) que se utiliza para la transformación de *P. patens*.

3.4.4 pUB-Dest

Vector utilizado para sobreexpresar PpAP2 en *A. thaliana*. El gen de interés quedará bajo el control del promotor constitutivo de la ubiquitina-10 de *Arabidopsis* (Grefen et al. 2010). El vector pUB-Dest fue cedido por Sabina Vidal (Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Uruguay). Confiere resistencia al antibiótico espectinomina (SpR) o estreptomicina (SmR) en bacterias y a glufosinato (BarR) en plantas. Al igual que los vectores pENTR-2B y pTHUbi el pUB-Dest utiliza la tecnología Gateway para incorporar el gen interés en su secuencia (punto 3.4.2). Para ello en la región Gateway del vector se encuentran las secuencias de recombinación sitio-específicas attR1 y attR2. El fragmento que será introducido en las células de la planta se ve delimitado por dos secuencias cortas llamadas LB y RB (*left border* y *right border* respectivamente) y se compone por la secuencia que contiene el gen de interés (PpAP2), el gen de resistencia al glifosato, el promotor pUBQ-10 y el terminador T35S (Figura 11).

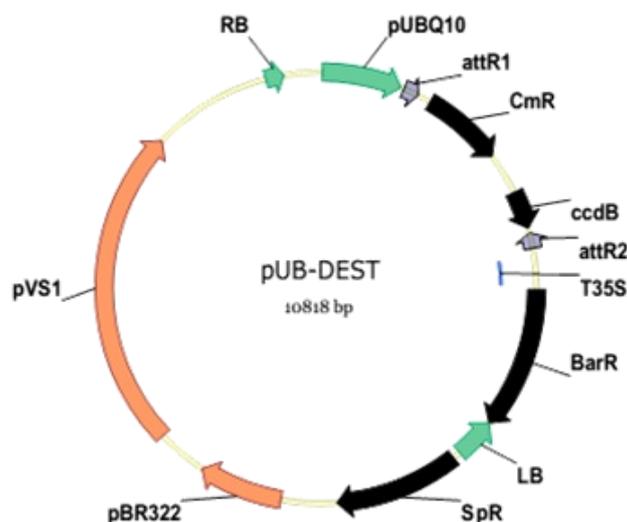


Figura 11. Mapa del vector final pUB-Dest. Se esquematizan las secuencias que lo componen, la resistencia al antibiótico espectinomicina (Sp^R) para usar en *A. tumefaciens* y al herbicida BASTA® (Bar^R) en plantas. RB y LB, secuencias de borde derecho e izquierdo respectivamente. pBR322, origen de replicación de copia alta en *E. coli*. pVS1, secuencia de replicación para mantener el plásmido en *A. tumefaciens*. attR1 y attR2 son las secuencias de recombinación sitio-específicas utilizadas por la tecnología Gateway.

3.5 Preparación y análisis de ácidos nucleicos

3.5.1 Obtención de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala se realizaron a partir de cultivos líquidos de 3-5 mL en medio LB y el antibiótico correspondiente. Las muestras fueron centrifugadas durante un minuto a 13000 rpm y el *pellet* bacteriano fue resuspendido 300 μ L de buffer I (tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10mM, RNasa 100 μ g/mL). Se agregaron 300 μ L de buffer II (NaOH 200 mM, SDS 1%) y se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se agregó 300 μ L de buffer III (acetato de potasio 3.0 M pH 5.5) y se incubó cinco minutos en hielo. Luego se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. El ADN plasmídico fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos, se lavó el *pellet* con etanol (EtOH) 70% y se resuspendió en 50 μ L de H_2O o Tris-HCl 1mM. También se utilizó el kit comercial de extracción *GenCatch™ Plasmid DNA Miniprep* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA). Las extracciones a mayor escala se realizaron a partir de cultivos bacterianos de 100 mL y se utilizó el kit comercial *GenCatch™ Plasmid DNA Midiprep* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA).

Para la extracción de ADN plasmídico de *A. tumefaciens* se utilizó el siguiente protocolo de extracción; se inoculó una colonia en 5 mL de LB Rif-Sm (50 µg/mL y 100 µg/mL respectivamente). Se dejó incubando durante la noche con agitación a 28°C en tubos de 50 mL. Luego se pasaron 1.5 mL de cultivo a un tubo eppendorf y se centrifugó para bajar las células descartando luego el sobrenadante. Este paso se repite hasta que se termine de procesar todo el cultivo. Se resuspendió el *pellet* en 100 µL de solución I fría (Tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 10 Mm pH=8, 20% sacarosa, debe añadirse lisozima 4mg/mL y ARNasa antes de usar). Se mantiene 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió 200 µL de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló y se incubó 10 minutos en hielo. Se añadieron 150 µL de solución III (acetato de sodio 3 M pH=4.8), se mezcló y se incubó durante 30 minutos en hielo. Se centrifugó siete minutos y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, se agregó un volumen de fenol cloroformo, se vortexeó y se centrifugó dos minutos. Se descartó la fase superior y se repitió el procedimiento dos veces más. Al final se obtienen aproximadamente 250 µL. Por último se precipitó el ADN añadiendo 1/10 del volumen de acetato de amonio (AcONH₄) 7.5 M y dos volúmenes de etanol 100%. Se dejó precipitando durante 30 minutos a -20°C, se centrifugó a 13000 rpm y 4°C por 30 minutos y el *pellet* se resuspendió en 20 µL de Tris-HCl 1mM.

3.5.2 Obtención de ARN a partir de tejidos vegetales

Las extracciones de ARN total de *P. patens* fueron realizadas siguiendo el método de aislamiento de ARN vegetal (Farrell, 1993). Tres a cuatro placas de colonias de *P. patens* de aproximadamente tres semanas fueron maceradas en nitrógeno líquido y resuspendidas en 2.5 mL de fenol y 5 mL de buffer NTES (NaCl 0.1M, Tris-HCl 0.01M pH 7.5, EDTA 1mM, SDS 1%). Las muestras se vortexearon durante tres minutos, luego se agregaron 2.5 mL de cloroformo y se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y los ácidos nucleicos fueron precipitados con 0.1 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH 96% a -20°C durante la noche. Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C y los *pellets* se resuspendieron en 750 µL de H₂O DEPC. El ARN fue precipitado con LiCl 2M incubando las muestras a 4°C durante la noche. Luego se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el ARN se precipitó incubando las muestras con 0.1 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH 96% a -20°C durante la noche. Finalmente se resuspendió en H₂O tratada con 0.1% de DEPC (H₂O DEPC). Se estimó

la concentración utilizando un *Nanodrop* modelo *Nanodrop1000 spectrophotometer Thermo scientific*.

3.5.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las corridas electroforéticas de ADN se realizaron en geles de agarosa 1% teñidos con BrEt 500ng/mL, utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). A las muestras se les agregó *loading buffer* 1X (0.05% bromofenol blue, 0.05% xylene cyanol FF, 6% glicerol) previo a la corrida. Para estimar el tamaño y la concentración de los fragmentos se incluyó en cada corrida un marcador de peso molecular. El marcador utilizado fue el ADN del fago Lambda λ digerido con *PstI*.

3.5.4 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes

Se mezclaron 10 μ g de ARN total con una solución conteniendo formaldehído 2.2M, formamida al 50% (v/v), 1X buffer MOPS pH 7.0 [0.2M MOPS (ácido 3-Nmorfolinopropansulfónico), 0.05M NaAc, 0.01M EDTA] y BrEt 70ng/ μ L. Posteriormente los ARNs se desnaturalizaron a 55°C durante 15 min y luego fueron separadas en geles de agarosa desnaturalizante con formaldehído 2.2M utilizando buffer MOPS 1X para la corrida. Se sacó una foto luego de la corrida como referencia de la cantidad de ARN cargado de cada muestra en el gel desnaturalizante.

3.5.5 Obtención de ADN a partir de gel de agarosa

La recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando los kits comerciales GenCatch™ Gel Extraction Kit (*Epoch Biolabs*, Missouri City, USA) o QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*, Hilden, Alemania) según recomendaciones del fabricante.

3.5.6 Análisis por Northern blot

5 μ g de ARN total fueron separados en geles de agarosa desnaturalizante y transferidos a membranas de nylon (*Hybond-N⁺*, *Amersham*, GE Health Care, Buckinghamshire NA) mediante capilaridad en solución SSC 20X [1X SSC (*Standard Saline Citrate*) contiene NaCl 0.15 M y Citrato de sodio 0.015 M] (Sambrook et al. 1989). A continuación el ARN fue fijado a la membrana mediante horneado a 120°C durante 45 minutos.

Las membranas fueron prehibridadas durante 2 horas e hibridadas toda la noche a 65°C con una solución conteniendo 5X SSC, SDS 0.2%, 0.125 g de leche descremada en polvo, y 20 µg/mL de espermatozoides de salmón desnaturalizado. Se marcaron 80 ng de los fragmentos de ADN previamente desnaturalizados con [α -³²P] dCTP 20 µCi, 3000 Ci/mmol (MP Biomedicals, USA) usando el kit *Amersham Rediprime II DNA Labeling System* (GE Health Care, Buckinghamshire NA). Las sondas se purificaron con columnas de exclusión cromatográfica *Illustra MicroSppin G-25 Columns* (GE Health Care, Buckinghamshire NA). y se dejó proceder la hibridación toda la noche. Las membranas fueron lavadas a 65°C, dos veces durante 40 minutos con 5X SSC, SDS 0.5% y dos veces con 1X SSC 0.5%. El revelado de placas *Image plate* (IP) se realizó utilizando el equipo *Fluorescent Image Analyzer FLA-9000* (FUJIFILM). Los fragmentos de ADN de PpAP2 y PpDIR (dirigente) utilizados para la síntesis de la sonda se obtuvieron a partir de la digestión del plásmido pGEM-T Easy conteniendo estos genes, con la enzima de restricción *EcoRI*.

3.6 Modificaciones en el ADN

3.6.1 Enzimas de restricción

Se utilizaron enzimas de restricción y buffers de *Fermentas* o *New England Biolabs*. Las digestiones se realizaron según recomendaciones del proveedor. Dependiendo del uso posterior, los fragmentos se purificaron utilizando los kits comerciales *GenCatchTM Gel Extraction Kit* o *GenCatchTM PCR Cleanup* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA).

3.6.2 Defosforilación de vectores

Para evitar la religación del vector luego del tratamiento con las enzimas de restricción es necesario eliminar el grupo fosfato en la posición 5'. Para esto se realizaron defosforilaciones con 10 U de CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) (New England Biolabs) y 1X buffer, incubando durante 1 hora a 37°C. Posteriormente el ADN fue limpiado usando el kit *GenCatchTM PCR Cleanup* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA).

3.6.3 Ligaciones

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 20 µL utilizando la relación molar vector: inserto 1:3 y colocando 75 ng de vector en buffer de ligación y 5 unidades de T4 ADN ligasa (*Fermentas*). Se incubó durante la noche a 16°C.

3.7 Construcciones para la sobreexpresión de PpAP2 en Physcomitrella patens y Arabidopsis thaliana

3.7.1 Construcción para la sobreexpresión en *Physcomitrella patens*

La secuencia CDS de PpAP2 se obtuvo según fue explicado en el punto 3.3.2. Una vez obtenida se ligó al vector pGEM-T Easy (3.6.3). Luego de generada la construcción PpAP2-pGEM-T se utilizó la enzima *EcoRI* para escindir el gen PpAP2 y digerir el vector pENTRTM2B (3.6.1), generando extremos cohesivos compatibles. Dicho vector se defosforiló y purificó de gel (puntos 3.6.2 y 3.5.5 respectivamente) para luego realizar la reacción de ligación entre éste y la CDS del gen PpAP2 purificada a partir de gel (3.5.5). La selección se realizó en medio LB-Agar suplementado con Kanamicina 30 µg/mL. Los clones obtenidos fueron reaislados en iguales condiciones para luego hacer minipreparaciones de ADN plasmídico según paso 3.5.1. El sentido en el cual se insertó la secuencia CDS del gen PpAP2 en la nueva construcción (PpAP2-pENTR) fue corroborado por reacción de digestión con la enzima *Sall*. Esta enzima permitió discernir el sentido de la inserción del gen PpAP2 de acuerdo al patrón de restricción diferencial que se obtiene si el mismo se ligó en sentido 5'→3' o 3'→5' al vector. Para seguir con la construcción del plásmido para la sobreexpresión de PpAP2, se eligió uno de los clones que cumplía con el patrón de restricción esperado para un fragmento incorporado en sentido 5'→3'. Luego, se realizó la reacción de recombinación entre PpAP2-pENTR y pTHUbi-Gateway de la siguiente forma. Se recombinaron 150 ng del vector pTHUbi-Gateway (1 µL) con 150 ng del plásmido PpAP2-pENTR (0.5 µL) utilizando 1 µL de buffer de reacción Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Invitrogen, San Diego, CA). Se incubó a 24°C toda la noche, se le agregó 1 µL de proteinasa K y se incubó 10 min a 37°C. Se transformaron células DH5α electrocompetentes con la totalidad del volumen de la reacción y los transformantes se seleccionaron en medio LB-Agar suplementado con ampicilina 100 µg/mL. Las colonias así obtenidas fueron analizadas por PCR utilizando los oligonucleótidos Prom-Ubi y OEAP2 3'rv detallados en la Tabla 1. Aquellos clones positivos se enviaron a secuenciar para corroborar la secuencia CDS de PpAP2 y luego se seleccionó uno de ellos para transformar protoplastos de *P. patens*. La construcción de este plásmido se realizó como se esquematiza en la figura siguiente (Figura 12):

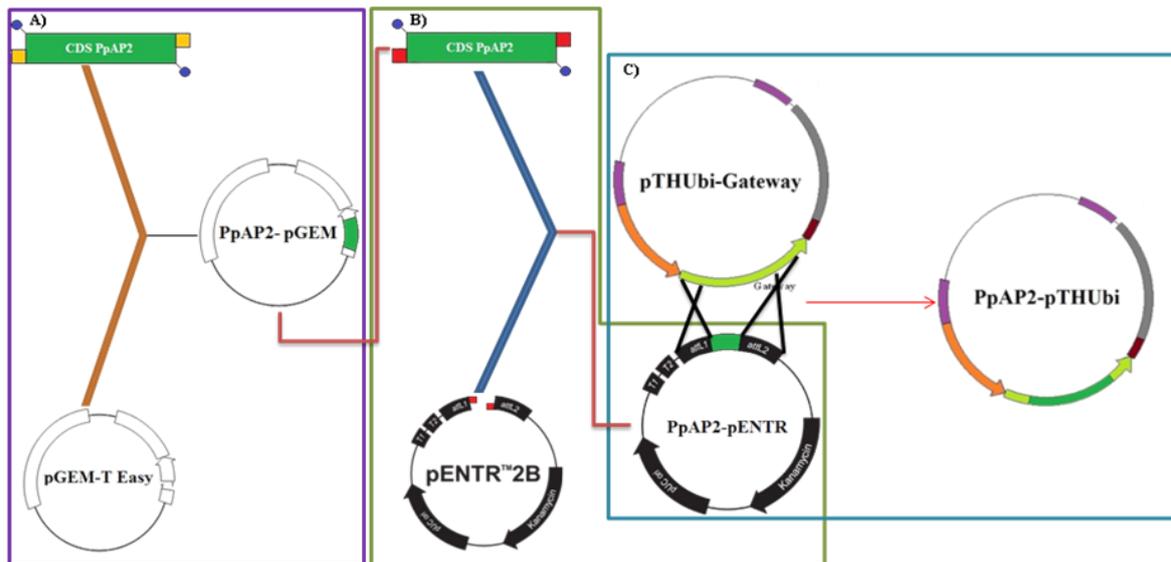


Figura 12. Se muestra de forma esquemática cómo fue realizada la construcción del plásmido final para la transformación de *P. patens* con la CDS del PpAP2. (A) La secuencia CDS de PpAP2 fue obtenida por PCR y luego ligada al vector pGEM-T Easy. (B) Tanto el plásmido PpAP2-pGEM como el pENTR™2B fueron digeridos con *EcoRI* para escindir la secuencia CDS de PpAP2 con extremos cohesivos y complementarios a los extremos generados con dicha enzima en pENTR™2B. Luego de la ligación se obtuvo el plásmido PpAP2-pENTR. (C) Por último se realizó una reacción de recombinación entre PpAP2-pENTR y pTHUbi-Gateway, obteniéndose el plásmido final (PpAP2-pTHUbi) con el que se transformó *P. patens*.

3.7.2 Construcción para la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana*

Debido a que el plásmido final que se usó para la transformación de *A. thaliana* usa la tecnología Gateway, al igual que el vector pTHUbi-Gateway para transformar *P. patens*, es que el procedimiento para conseguir esta construcción difiere únicamente en el vector final utilizado en la última etapa, la de recombinación, con respecto a lo descrito en el punto 3.7.1. Por lo anterior es que la construcción de este plásmido se realizó como se esquematiza en la Figura 12 (A-B) y Figura 13.

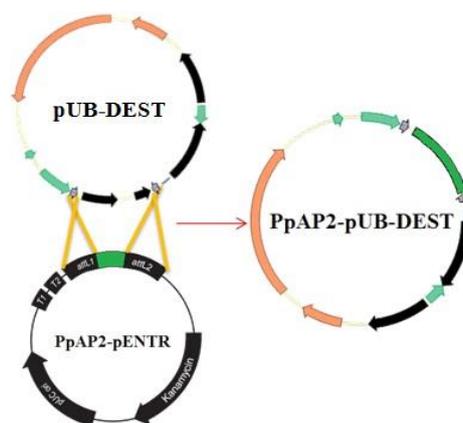


Figura 13. La construcción del plásmido final para la transformación de *A. thaliana* (PpAP2-pUB-DEST) se realiza a partir de la recombinación entre la construcción PpAP2-pENTR y el vector final pUB-DEST.

3.8 Transformación de plantas

3.8.1 Transformación de *Physcomitrella patens*

Se transformaron protoplastos de *P. patens* con la construcción PpAP2-pTHUbi obtenida según lo descrito en el punto 3.7.1 y digerida con *SwaI* (Fermentas). El ADN digerido se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de NaAc 3 M, pH 5.2 a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C, el *pellet* se lavó con etanol 70% se resuspendió en 30 µL de Tris-HCl 1 mM pH 7.5 o H₂O mQ (bidestilada). La transformación mediada por PEG se realizó según el protocolo descrito por Schaefer et al. 1991 con algunas modificaciones puestas a punto en nuestro laboratorio. Los protoplastos fueron obtenidos a partir de 2-4 placas de tejido en estadio de protonema de 10-13 días, que habían sido subcultivadas sucesivamente por lo menos tres veces con intervalos de 7 días. El material vegetal fue incubado en una solución de D-manitol 8% con Driselasa (SIGMA) 0.2% a temperatura ambiente durante toda la noche. La digestión fue filtrada a través de un separador celular estéril (BD Falcon™ 100µm Nylon) en falcon de 50 mL y centrifugada en rotor *swing out* 10 minutos a 700 rpm, temperatura ambiente (22°C) y desaceleración 0. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se hicieron tres lavados, uno con solución de D-manitol 8% y dos con solución CaPW (D-manitol 8%, CaCl₂·2H₂O 50 mM). Luego se contaron los protoplastos en una cámara de Neubauer (concentración ideal 1.6x10⁶ protoplastos por mL). A continuación se resuspendieron los protoplastos en solución 3M (D-manitol 9.1% 0.49M, MgCl₂ 15 mM, MES 0.1% pH 5.6). En la transformación se utilizaron 300 µL de la suspensión de protoplastos a los que se le agregaron 10-30 µg de ADN. A continuación se agregaron 300 µL de la solución PEG (PEG 8000 40%, D-manitol 8%, Ca(NO₃)₂ 1 M, Tris-HCl 1 M pH 7.8), y se realizó el choque térmico a 45°C durante cinco minutos. Luego se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó un lavado con la solución CaPW. Finalmente los protoplastos fueron resuspendidos en 300 µL de PRML (medio BCDAT conteniendo CaCl₂ 10 mM y D-manitol 8%) y 2.5 mL de PRMT (medio BCDAT conteniendo CaCl₂ 10 mM, D-manitol 8% y agar 0.5%), dispersados en placas de PRMB (medio BCDAT conteniendo D-manitol 8% y agar 1%) con celofán e incubados con luz continua durante 7-9 días. La selección se realizó mediante dos pasajes de los celofanes con los protoplastos a placas de medio BCDAT suplementado con higromicina (Hyg) (SIGMA) 25 µg/mL, intercalados con dos pasajes del celofán a placas de medio BCDAT sin Hyg para permitir la correcta regeneración de los transformantes y eliminar los transformantes inestables.

3.8.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se sembraron cuatro macetas con seis plantas de *A. thaliana* en cada una bajo un fotoperíodo largo (16 horas luz/8 horas oscuridad). Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se llegó al estado en que las plantas presentaron gran cantidad de botones florales se siguió con la transformación por inmersión floral (Clough y Bent 1998). Para ello se inocularon 500 mL de medio YEP suplementado con rifampicina y espectinomicina (50µg/mL y 100 µg/mL respectivamente) con un cultivo fresco de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción PpAP2-pUB-DEST obtenida según el punto 3.7.2. Se incubó durante la noche a 28°C con agitación a 200 rpm, o hasta llegar a una densidad óptica de aproximadamente 2.0 a 600 nm (DO₆₀₀). Se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 5.500 g y se resuspendió en buffer de infiltración (0.5 x MS, sacarosa 5%, Silwett L-77 0.05%) obteniendo una DO₆₀₀ mayor a 2.0. Las plantas se sumergieron en esta mezcla durante aproximadamente 20 segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para que no se evapore el inóculo. Se dejó una noche dentro de las bolsas y posteriormente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Se realizó un seguimiento de las plantas, realizándose inoculaciones en los botones florales que fueron surgiendo (cada 5 días a partir de la primera inoculación por inmersión). Para estas inoculaciones se pipeteó la suspensión bacteriana detallada anteriormente en cada botón floral en lugar de sumergir la planta (Martinez-trujillo et al. 2004). Se cosecharon las semillas y se sembraron en medio ½ MS pH 5.7, agar 0.7% suplementado con glufosinato de amonio 10 µg/mL (BASTA, Sigma-Aldrich). El proceso anterior se repitió hasta obtener plantas T₂ (se considera T₀ a las plantas originadas por las semillas obtenidas luego de la transformación).

3.9 Análisis moleculares de las líneas que sobreexpresan PpAP2

3.9.1 Análisis de las líneas de *Physcomitrella patens* generadas

Los niveles de transcritos de PpAP2 de los posibles transformantes fueron analizados mediante *Northern blot* tal cual fue descrito en el punto 3.5.6 y comparados con los de plantas salvajes. Las extracciones de ARN de plantas salvajes tratadas y las sobreexpresantes sin tratar se realizaron tal como se describe en la sección 3.5.2.

3.9.2 Análisis de la ploidía relativa por citometría de flujo en transformantes de *Physcomitrella patens*

El método de transformación de *P. patens* empleado involucra la generación de protoplastos, los cuales al regenerarse pueden fusionarse dando lugar a plantas provenientes de protoplastos

fusionados (Schween et al. 2005). Estas plantas tendrán afectados los niveles de ploidía por lo que es importante el chequeo de los mismos en los clones transformantes en comparación con plantas salvajes.

Para determinar el nivel de ploidía de las líneas que sobre-expresan PpAP2 respecto a plantas salvajes de *P. patens* se realizó citometría de flujo. Para esto se tomó una colonia de cada línea vegetal crecida tres semanas en condiciones normales y se picó utilizando un bisturí con 1 mL de Woody Plant Lysis Buffer (WPB) [Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5, MgCl₂·6H₂O 4 mM; EDTA Na₂·2H₂O 2 mM; NaCl 86 mM; Tritón 1%; K₂O₅S₂ 10 Mm; PVP10 1%]. La suspensión obtenida se incubó 15 minutos a 0°C y luego se pasó a través de un filtro de 0.45 µm. Posteriormente se agregó 50 µL de RNasa (concentración final: 1 mg/mL) y 50 µL de ioduro de propidio (concentración final: 1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Esta suspensión se analizó mediante un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson, USA) del Servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Este citómetro está equipado con un láser Innova 300 de emisión a 488 nm (100 mW de potencia durante el análisis). La fluorescencia emitida por los núcleos teñidos con Ioduro de Propidio se detectó con una fotomultiplicadora en el canal FL2 con filtro de banda 575/26. El citómetro se ajustó inicialmente con CRBC (Chicken Red Blood Cells) y posteriormente con el kit “DNA QC particles” (Becton Dickinson) para optimizar la resolución de la detección de fluorescencia y chequear la linealidad del equipo (Machado et al. 2015).

La adquisición de los datos y su posterior análisis fue efectuado con el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Se empleó el procesamiento de pulso en el canal FL2, para excluir dobletes en gráficos FL2-W vs FL2-A. La dispersión lateral (SSC) se utilizó para descartar del análisis núcleos muy dañados. Se analizaron 5000 núcleos por muestra.

3.10 Tratamientos con microorganismos fitopatógenos

Se trataron colonias de *P. patens* salvajes, y líneas que sobre-expresan el gen PpAP2 con el filtrado de cultivo (CF, de “culture filtrate”) de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y como control se utilizaron colonias tratadas con agua. La inoculación con *B. cinerea* o *C. gloesporioides* se realizó una suspensión de esporas de 2.5×10^5 esp/mL. Como control se utilizaron colonias sin tratar o tratadas con agua. Los tratamientos se realizaron rociando con un

atomizador (aproximadamente 3 mL por placa) colonias crecidas en medio BCDAT con celofán durante aproximadamente tres semanas.

3.11 Evaluación de las líneas de *Physcomitrella patens*

3.11.1 Ensayo de daño celular en *Physcomitrella patens*

Se trataron colonias de *P. patens* con el CF obtenido de la cepa SCC1 de la bacteria *P. c. carotovorum*. La muerte celular se midió a las 24 h del tratamiento. Para esto se incubaron las colonias de *P. patens* en una solución de azul de Evans 0.1% (AppliChem) durante 30 min. Posteriormente se hicieron 4 lavados con agua desionizada para remover el exceso de colorante. El colorante unido a las células muertas fue solubilizado en metanol 50% con SDS 1% durante 30 min a 60°C y se cuantificó por absorbancia a 600 nm (Oliver et al. 2009).

También se incubaron colonias de *P. patens* con una suspensión de esporas (2.5×10^5 esp/mL) de *B. cinerea* en solución de azul de Evans 0.05% (AppliChem) durante 2 horas. Posteriormente se hicieron 4 lavados con agua desionizada para remover el exceso de colorante. El colorante unido a las células muertas fue solubilizado en una solución de metanol 50% con SDS 1% durante 45 min a 50°C y cuantificado por espectrofotometría a 600 nm (Levine et al. 1994). Luego se determinó el peso seco de las colonias tras 16 horas de secado a 65°C para determinar la relación densidad óptica a 600 nm/mg de peso seco.

3.11.2 Tinciones para visualizar los fitopatógenos

Para visualizar el hongo *B. cinerea* se utilizó el colorante Solofenil Flavine 7 gfe. Para esto se incubaron gametóforos a las 24 hrs de infectados con una suspensión de esporas de 2.5×10^5 esp/mL en una solución de Solofenil Flavine 7 gfe 0.1% en agua. Las hojas infectadas se observaron en un microscopio Confocal Leica TCS-SP5.

3.11.3 Visualización de cambios a nivel de la pared celular

Para detectar modificaciones de la pared celular la tinción de Safranina-O se realizó de acuerdo a Lucena et al. 2003. Los tejidos se incubaron con Safranina-O 0.01% en etanol al 50% durante 5 minutos. Las microscopias de campo claro y epifluorescencia se realizaron con Olympus BX61 microscope (Shinjuku-ku, Tokyo, Japón), y todas las imágenes mostradas en este estudio se capturaron con el paquete de software Cell F o MICROSUITE (Olympus).

4. Resultados

4.1 Comparación de PpAP2 con otras proteínas homólogas en *P. patens* y plantas vasculares

4.1.1 Secuencia proteica de PpAP2

La secuencia proteica de PpAP2 se obtuvo a partir de su predicción utilizando la secuencia codificante (CDS) publicada en la página web de *Phytozome 10.2*. La composición aminoacídica de PpAP2 se muestra en la siguiente figura donde el dominio AP2 se encuentra remarcado (**Figura 14**).

```
MQSSIHSGAGGGHGGGHSIVCNSPLPSLSTHLHAVCI PKYKGIRYRPE  
LGRYISEIRPAQPRKRKIWLGTYKTAEEAARAFDAGIFYTKKPINYN  
FEDSPSILEPLPENLTPEEEHVEIQKKAKAAAARVQATQVMLETKPP  
RNYVSDMTERFHESQMYCAKPHEPPREIQFAVVLDR
```

Figura 14. Secuencia aminoacídica de la proteína PpAP2 predicha a partir de su secuencia nucleotídica de la CDS. En oliva se muestra la región aminoacídica correspondiente al dominio AP2/ERF encontrado en esta proteína.

4.1.2 Comparación con otras proteínas con dominio AP2 de *P. patens*

La comparación por alineamiento múltiple fue realizado por el método ClustalW con el software *BioEdit* versión 7.1.3.0 (Hall 1999). Esta se realizó entre la secuencia aminoacídica deducida de PpAP2 y las siete proteínas de *P. patens* más homólogas a PpAP2. El resultado se muestra en la figura 15 donde se aprecia que la región que contiene al dominio AP2/ERF es la más conservada y la de mayor similitud entre las distintas secuencias, mientras que las regiones por fuera del dominio AP2/ERF tiene menor homología.

```

Pphpat.011G053400.2 1 -----MQSS---IHSAGGGHGGG
Pphpat.007G045400.1 1 -----MACDTQVVQSNLSSSEVVG
Pphpat.001G055200.1 1 -----MPAQAT-QCVITGTRYGED
Pphpat.021G074000.2 1 MNLTISSIIIEQGKPKAKNCWDFCGGG--KIREQGLQLSSSIGTSRVKIELEGSKSDSSVVEE
Pphpat.022G070900.4 1 MNLTISSIIIEHGKPKSKTWWDSCGGSNAGREOGLLLPSKIDSSRVKKEIEECKSESSQEG
Pphpat.018G004800.1 1 MNLTISSIIIEQGKPKTKK--WDPCGG--KVKEQALQLTTKIESPKVKKEVEESKSESSLEE
Pphpat.019G035600.1 1 MNLTISSIIIEQGRPKSKNWWDPCGGG--KAREQGLQLPSKIDSRVKNVEVDESSESSQEE
Pphpat.021G059200.1 1 MPGMAPAAWCLGGVKLER--LESTEMKKSIGVHKIRKDMEDRDIDLNVFYMEEKQEQEES

Pphpat.011G053400.2 16 HSIVCNSPLPFLS---THLHAVCI-----PKYKGIYRPELGRY
Pphpat.007G045400.1 19 RGMGCQRLSSRP---ANPRAVPH-----EKYKGIYRPELNRY
Pphpat.001G055200.1 18 HDAGCHTTSPTFRSSILELTHHVQQ-----ERFKGIRFRPELGRY
Pphpat.021G074000.2 60 ESKGMRLAAKDTSGRNAYKYRNIDLNKAPSTWDADDEVTVSSNDTINFRGVRRHPELNKH
Pphpat.022G070900.4 61 ERKGMRLAAKDNSGRNARSFRNIDLNKMPASANDTDDASVG--TGDTEAFRGVRRHPELNKH
Pphpat.018G004800.1 58 ESKGMRLAAKDTSGRNAPKFRNIDLNKAPASANDTEEVASANTGDTISFRGVRRHPELNKH
Pphpat.019G035600.1 60 ERKGMRLAARDSSGNALKFRNIDLNKVPSANDSDDVSVG--TGDTEIFRGVRRHPELNKH
Pphpat.021G059200.1 60 TVVSASVSASST SAGTDGKSCRVPCEVHYRG-----VSGREEEVAYRGVRRHPELNKH

Pphpat.011G053400.2 52 ISEIRPAQPRKRKIWLGTYKTAEEAARAFDAGIFYTKKPIYNFEDSPSILEPLPEN--L
Pphpat.007G045400.1 55 ISEIRFVQPRKRKIWLGTYKTPEEAARAFDAGIFYTKKQIDYNFEDSPSILEPLPEN--L
Pphpat.001G055200.1 58 ISEIREAHPKRKRKIWLGTFFKTAEEAARAFDAGIFYTKKPIDYNFKESPLILEPLPEN--L
Pphpat.021G074000.2 120 VTEIRPTS--QKRKIWLGTYETPEEAARAYDVGIFYTKKKIYPNFEDSPKKLQQLPIPEL
Pphpat.022G070900.4 120 VTEIRPTS--QKRKIWLGTYETPEEAARAYDVGIFYTKKKIYPNFEDSPQQLQLPIPEL
Pphpat.018G004800.1 118 VTEIRPTS--QKRKIWLGTYETPEEAARAYDVGIFYTKKKIYPNFEDSPQQLQLPIPEL
Pphpat.019G035600.1 119 VTEIRPTS--QKRKIWLGTYETPEEAARAYDVGIFYTKKKIYPNFEDSPQQLQLPIPEL
Pphpat.021G059200.1 114 VTEIRPTA--QKRKIWLGTYKTAEEAARAYDVGIFYTKKKIPLNFPDSMENLPELPCG---

Pphpat.011G053400.2 110 TPEEEHVEIQKKAKAAARVQATQ--VMLETKPPRNYVSDMTERFHESQMYCAKPHEP--
Pphpat.007G045400.1 113 SEEEVHVQIQKKAKAAATMQPQH--EHLILR---KIASKIAHYSLESPIYYGRTHEP--
Pphpat.001G055200.1 116 SPEQEHIEIQKRAKAAARIEPSSHKPHSPDKSCKFLQSNSTQRSSARRIGHEVEHLLDR
Pphpat.021G074000.2 179 PWESFAALVKQRATSAAKRARVPSSS-----
Pphpat.022G070900.4 179 PWESFAALVKQRATSAAKRARVPSSS-----
Pphpat.018G004800.1 177 PWESFAALVKQRATSAAKRARVPSSS-----
Pphpat.019G035600.1 178 PWESFAALVKQRATSAAKRARVPSSG-----
Pphpat.021G059200.1 170 SWEEIAPFVKKQAVSAAKRHHGL-----

Pphpat.011G053400.2 165 ---PREIQFAVVLDR-
Pphpat.007G045400.1 165 ---PKEIQFAVVLNR-
Pphpat.001G055200.1 176 KQRPREIQFLEVLNRS
Pphpat.021G074000.2 204 -----
Pphpat.022G070900.4 204 -----
Pphpat.018G004800.1 202 -----
Pphpat.019G035600.1 203 -----
Pphpat.021G059200.1 192 -----

```

Figura 15. Comparación y alineamiento múltiple entre PpAP2 (Pphpat. 011G053400.2) y las siete proteínas más homólogas en *Physcomitrella*. Los residuos idénticos se encuentran sobre fondo gris oscuro mientras que los residuos con características similares, pero no iguales, están sobre fondo gris claro. El recuadro rojo delimita el comienzo y fin del dominio AP2/ERF.

4.1.3 Comparación interespecífica entre la proteína PpAP2 y otras proteínas de plantas vasculares

Se buscaron homólogos de PpAP2 en plantas vasculares como *Solanum lycopersicum*, *Citrus clementina*, *Solanum tuberosum*, *Glycine max*, *Vitis vinífera* y *Arabidopsis thaliana*. De cada especie se seleccionó la proteína con mayor homología a PpAP2 para compararla mediante un nuevo alineamiento múltiple entre dichas secuencias. El alineamiento resultante se muestra en la siguiente figura (Figura 16).

```

Pphpat.011G053400.2 1 MQSSIHSAGGGHGGGHSIVCNSPLPSLSTHLHAVCI PKYKGIYRPELGRYI SEIRPAQP
Solyc06g054630.1.1 1 -----MENNSTHDC----- PKFKGVRLR-KWGKQVSEVRLPNS
Ciclev10009540m 1 MVK---HAVEKPAEGSD----- SRYKGVRRK-KWGKYVSEIRL PNS
PGSC0003DMT400079094 1 -----MEANPTHDC----- PKFKGVRLR-KWGKQVSEVRLPNS
Glyma.15G180000.1 1 MVKS--KSVEKPAEEQQRGGV----- SAYRQVRRK-KWGKYVSEIRL PNS
GSVIVT01035502001 1 MVKPTAATATTSEGGQPGNSE----- TKYKGVRRK-KWGKQVSEIRL PNS
AT5G21960.1 1 -----MDAS----- PKYTVRRKR-KWGKQVAEIRL PNS

Pphpat.011G053400.2 61 RKRKIWLGTYKTAEEAARAFDAGIFYTKKF--INYNFEDSPSILEPLPENLTPEEEHVEIQ
Solyc06g054630.1.1 33 RDR-IWLGSYDSA EKAARAFDAAQFC LRGEKAKFNFPDSDPPDISGG-QRLSPA EIQAVAA
Ciclev10009540m 38 RAR-IWLGSYDTAEKAARAFDAA LFC LRGRSAKFNFPDNPDISGG-RSLKPSEIQAVAA
PGSC0003DMT400079094 33 RDR-IWLGSYDSA EKAARAFDAAQFC LRGEKAKFNFPDSDPPDISGG-QRLSPA EIQAVAA
Glyma.15G180000.1 43 RQR-IWLGSYDSA EKAARAFDAA MFC LRGSGANFNFPSDRPN IAGG-RNMTPSQIQIAAA
GSVIVT01035502001 46 RER-IWLGSYDTPEKAARAFDAA LFC LRHGAKFNFPDNPDP IGR-ESLTPSEIQLVAA
AT5G21960.1 28 RDR-IWLGSFDSA EKAARAFDAA LYC LRGFGARFNFPDNPPE I PGG-RSLTPQIQVVAS

Pphpat.011G053400.2 120 KKAKAAAARVQATQVML-----ETKPPRNYVS-----
Solyc06g054630.1.1 91 RFANDYSPSPVQEI RRRDDHHHD EGNIGNINSHVIN--MEKDEISLSTTS-CDR---VVQ
Ciclev10009540m 96 QFANSEFLR--SQSPEQ-----SVS--ELQTEY-----LSPSISEAT-----VQ
PGSC0003DMT400079094 91 RFANDYSPSPVQEI QRD----D EGNIGNINSHVIN--MEKDEISLSTTSSCDVPPMVVQ
Glyma.15G180000.1 101 RFANSEPRKECSGK PVE-----SLTSI ETTSPFVNS-DTDTSSPLSVVT-----IQ
GSVIVT01035502001 104 RFANSEPPKECSELE SQ-----HSQ--SESHHY-----NYTPSCSLS-----EQ
AT5G21960.1 86 RFACEEELLPPEQHHPSPPRGDH NTEEEV IISARGEINSGSGGPTLQGVG-----ED

Pphpat.011G053400.2 146 -----DMD
Solyc06g054630.1.1 145 MGTSENTVAEMD WAFNDMMENYSYNASGPPPEYFCDPYYIVG-----GGGGAGVLD-NL
Ciclev10009540m 131 LDSDGVFDGSLLDLLT ASSNNYPSEYGIFFGFD-----DL
PGSC0003DMT400079094 145 MGTSTVAEMD WAFYNDMMENYPYNASGPPPEFFCDPYYPGAGIGAGAGGGGVLDINL
Glyma.15G180000.1 147 NDTE-VATGSFPGIFSGFGSGNEVPEFSDFPSFD-----DF
GSVIVT01035502001 141 LENETIMDGSFWSIR-----DYSYID-----GG
AT5G21960.1 138 NNNEGNSNDTSSYWPLI WEEENEVGP PNSDHEFG-----FFTDD

Pphpat.011G053400.2 149 TERFHES---QMYCAKPHEP-----PREIQFAVVLDR
Solyc06g054630.1.1 198 SSNLYSPPHFPOR TTPSYDDDDTGNGGDEHYSQSSFLWNE
Ciclev10009540m 167 SNDIFTP---QLPAVDFADE---NFDG LLLNQDSFLWNE
PGSC0003DMT400079094 204 SSNLYSPPHFPOR TTPNYDDDDTGNGGDEHYSQSSFLWNE
Glyma.15G180000.1 182 GHDFVH---ELPGFDYGE E---NLDGLII-QDSFLWNE
GSVIVT01035502001 164 GLGISPF---SPMDESGGEE---FFQ---QSSFLWNE
AT5G21960.1 177 STNLYFPPTQQCQHQLSSDFY YDGACEDDFSHYNINLWNE

```

Figura 16. Comparación y alineamiento múltiple entre la secuencia aminoacídica de PpAP2 (Pphpat. 011G053400.2) y las demás secuencias de proteínas con dominio AP2/ERF en *Solanum lycopersicum* (Solyc06g054630.1.1), *Citrus clementina* (Ciclev10009540m), *Solanum tuberosum* (PGSC0003DMT400079094), *Glycine max* (Glyma.15G180000.1), *Vitis vinifera* (GSVIVT01035502001) y *Arabidopsis thaliana* (AT5G21960.1). Los residuos idénticos se encuentran sobre fondo gris oscuro mientras que los residuos con características similares pero no iguales están sobre fondo gris claro. El recuadro rojo delimita el comienzo y fin de la región que comprende el dominio AP2/ERF según el gen PpAP2.

El porcentaje de identidad a nivel de las secuencias aminoácidos entre las proteínas seleccionadas de plantas vasculares y PpAP2 se encuentra entre 41 y 52% según se muestra en la Tabla 2.

Especie	Gen	Cubrimiento	E-value	Identidad
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc06g054630.1.1	49%	6,00E-18	52%
<i>C. clementina</i>	Ciclev10009540m	38%	4,00E-18	49%
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMT400079094	59%	8,00E-18	52%
<i>G. max</i>	Glyma.15G180000.1	64%	2,00E-17	41%
<i>V. vinifera</i>	GSVIVT01035502001	50%	5,00E-18	49%
<i>A. thaliana</i>	AT5G21960.1	52%	4,00E-17	41%

Tabla 2. Cuadro que muestra el cubrimiento, el E-value y la identidad para cada proteína analizado resultante de comparar su secuencia aminoacídica con la de PpAP2. Resultados obtenidos de la página web de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2 Expresión de PpAP2 en respuesta a fitopatógenos

Se expusieron plantas salvajes de *P. patens* a fitopatógenos tal cual fue descrito en el punto 3.10. Se hicieron las extracciones de ARN a las 4 y 24 horas luego de realizado cada tratamiento y se analizó mediante *Northen blot* (puntos 3.5.2 y 3.5.6 respectivamente) como se muestra en la figura 17. Los resultados muestran que el gen PpAP2 se induce en respuesta al tratamiento con el CF de las dos cepas de *Pectobacterium* (SCC1 y SCC3193) y a esporas de *B. cinerea*, comparado con plantas tratadas con agua. La mayor expresión de PpAP2 se observa a las 24 hrs luego de la inoculación con esporas de *B. cinerea*, lo cual coincide con la etapa de mayor crecimiento del micelio (Ponce de León et al. 2012).

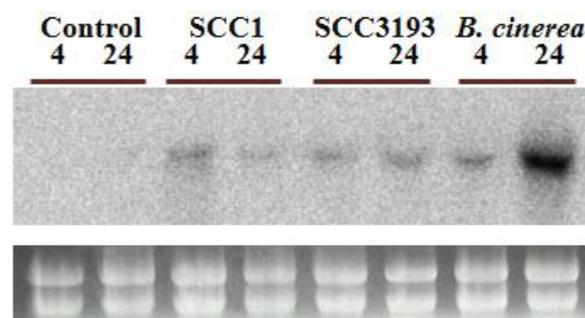


Figura 17. Arriba, *northen blot* con sonda PpAP2 de los distintos tratamientos con fitopatógenos a 4 y 24 horas post inoculación. Abajo, control de carga con ARNr.

4.3 Sobreexpresión del gen PpAP2

4.3.1 Construcción de los vectores de sobreexpresión de PpAP2 para *P. patens* y *A. thaliana*

Para la construcción de los vectores de sobreexpresión se siguieron los pasos que se muestran en los esquemas de las Figuras 12 y 13. Dado que el gen *PpAP2* no contiene intrones la amplificación se realizó sobre ADN genómico según fue descrito en el punto 3.3.2. Para corroborar que el producto de amplificación concuerde en tamaño al esperado se hizo una electroforesis en gel de agarosa (punto 3.5.3) cuyo resultado se muestra en la Figura 18.

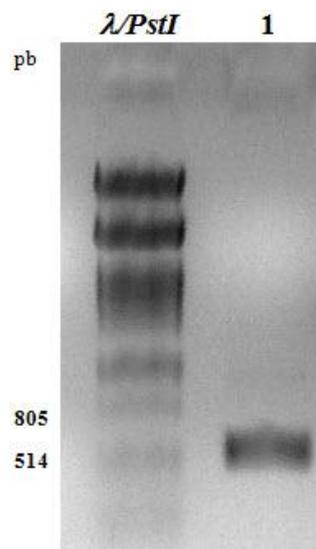


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra el producto de amplificación correspondiente a PpAP2 (carril 1) y el marcador de peso molecular ($\lambda/PstI$) en pares de bases (pb).

El producto de amplificación tiene un tamaño de 540 coincidiendo con lo esperado para el gen PpAP2. Se purificó el producto de amplificación con “QIAquick Gel Extraction Kit” según punto 3.5.5 y se cuantificó en gel de agarosa 1%.

4.3.1.1 PpAP2-pGEM

El producto de amplificación purificado, se ligó al plásmido pGEM-T Easy según fue descrito en el punto 3.6.3. Con la mezcla de ligación obtenida se transformaron células competentes *E. coli* DH10B, se seleccionaron algunas de las colonias transformantes resistentes al antibiótico ampicilina para extraer ADN plasmídico y corroborar la presencia del fragmento PpAP2 por medio de digestión con la enzima *EcoRI* (Figura 19). De 6 clones analizados, se confirmó la presencia de PpAP2 en todos ellos y se eligió el clon 3 para guardar gliceroles y seguir con los ensayos posteriores.

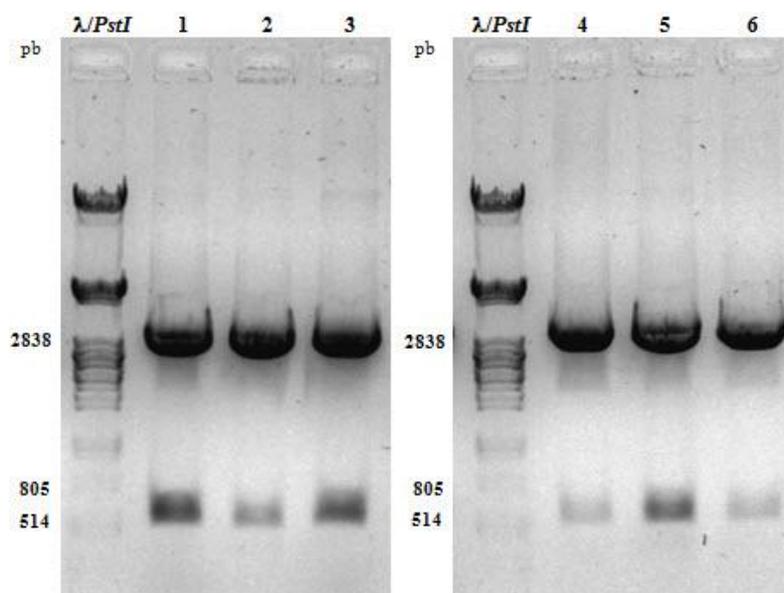


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt para corroborar la inserción del fragmento PpAP2 en pGEM T-Easy. Carriles 1-6: Digestiones con *EcoRI* de seis minipreparaciones de ADN plasmídico de clones elegidos al azar crecidos en medio LB con ampicilina. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

4.3.1.2 PpAP2-pENTR

Los plásmidos PpAP2-pGEM obtenidos en el punto anterior y pENTRTM2B fueron digeridos con *EcoRI*. De esta forma se crearon extremos cohesivos compatibles entre el fragmento PpAP2 y el vector pENTRTM2B. Una vez digerido pENTRTM2B, se desactivó la enzima *EcoRI* a 65°C por 20 minutos, y se desfosforiló dicho plásmido según lo planteado en el punto 3.6.2 para evitar la recircularización del mismo durante la reacción de ligación. Se corroboró la digestión de los plásmidos por medio de una electroforesis en gel de agarosa (Figura 20), y se procedió a la purificación a partir de gel de agarosa con QIAquick Gel Extraction Kit (punto 3.5.5.) del fragmento PpAP2 y del plásmido pENTRTM2B desfosforilado (pENTR).

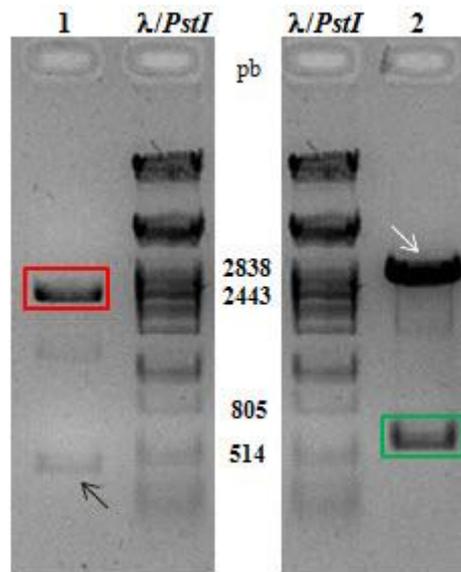


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con *EcoRI* de PpAP2-pGEM (Carril 2) y pENTRTM2B (Carril 1). Recuadro verde, fragmento que contiene a PpAP2. Recuadro rojo, vector pENTRTM2B linealizado y sin gen letal *ccdB*. Flecha blanca, plásmido PpAP2-pGEM linealizado y sin el fragmento PpAP2. Flecha negra, gen letal *ccdB*. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Se realizó una reacción de ligación entre PpAP2 y pENTR según lo descrito en el punto 3.6.3. Esa mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes *E. coli* DH10B. La selección de los transformantes se realizó en medio LB suplementado con kanamicina 30 $\mu\text{g/mL}$. Se seleccionaron 10 clones para analizar la presencia y correcta inserción de PpAP2 en pENTR. Para ello se hicieron extracciones de ADN plasmídico de los 10 clones y se corrieron alícuotas en un gel de agarosa donde se confirmó la presencia de ADN plasmídico de un tamaño aproximado a lo esperado para plásmidos superenrollados (Figura. 21).

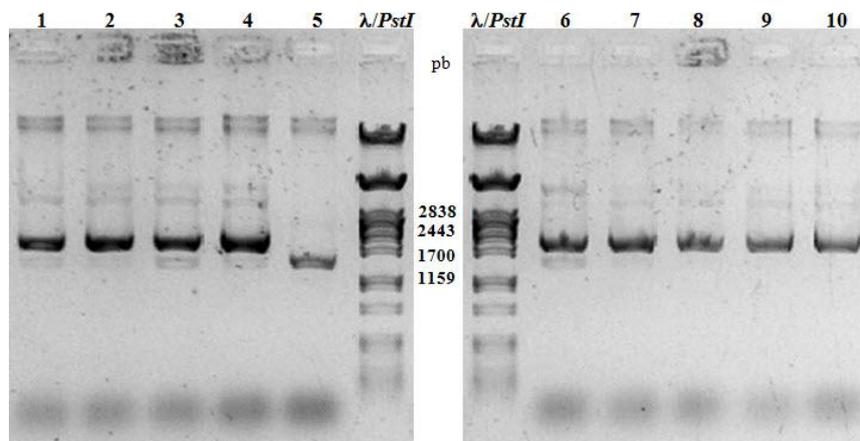


Figura. 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los diez clones seleccionados a partir de reisolamientos en medio LB suplementado con kanamicina. Carriles 1-10: ADN plasmídico de los distintos clones seleccionados para analizar. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Para esta construcción es importante que el sentido en el cual se encuentre inserto el fragmento PpAP2 sea el correcto. Debido a que no fue posible seguir una estrategia de clonado direccional, la inserción en pENTR de PpAP2 en uno u otro sentido se dio indistintamente. Por ello se decidió analizar los plásmidos por patrón de restricción. Se eligió *Sall* para analizar el sentido de inserción de PpAP2, dado que si el fragmento se encuentra clonado en sentido correcto, se obtendrían dos fragmentos, uno de 3167 pb y otro de 88 pb aproximadamente, mientras que cuando el fragmento se encuentra clonado en antisentido se obtendrían dos bandas de 452 pb y 2803 pb aproximadamente. Como se muestra en la figura 22 se pudieron identificar tres clones positivos, en los que el fragmento PpAP2 estaría clonado en sentido correcto dentro de pENTR. En dichos clones no es posible visualizar los fragmentos de 88 pb debido a su tamaño, por lo que se vería una única banda de unos 3167 pb aproximadamente.

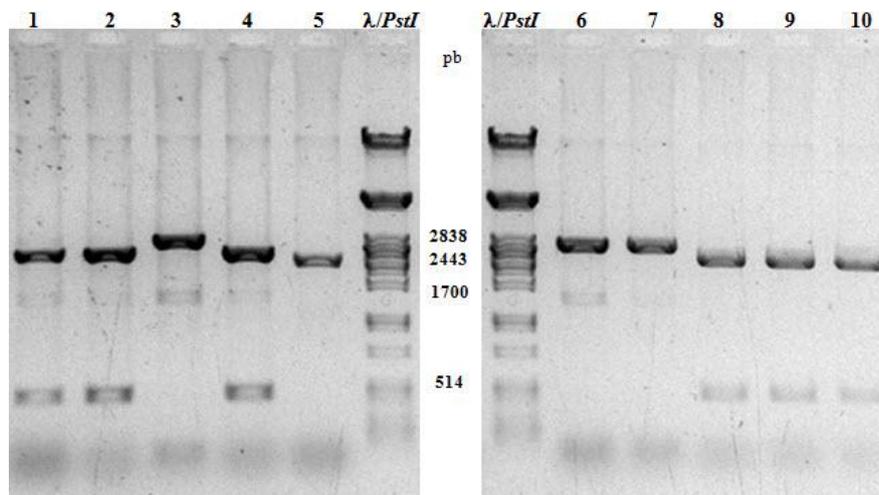


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones realizadas con *Sall* para identificar sentido de inserción de PpAP2 en pENTR. Carriles 1-10: ADN plasmídico de los distintos clones digerido con *Sall*. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Los clones 3, 6 y 7 presentan un patrón de restricción que coincide con lo esperado para aquellas construcciones en las cuales el fragmento PpAP2 se insertó en sentido correcto. Para corroborar este resultado se decidió realizar una nueva digestión con *EcoRI* de dichos plásmidos y así ver si todos estos clones escinden el inserto PpAP2 (Figura 23). En la figura se ve que los clones 3, 6 y 7 tienen el fragmento PpAP2, ya que es escindido luego de la digestión, sin embargo el clon 5 no presenta el fragmento PpAP2 debiendo ser un plásmido pENTR recircularizado. Se eligió el clon 7 para guardar gliceroles y seguir según lo planeado.

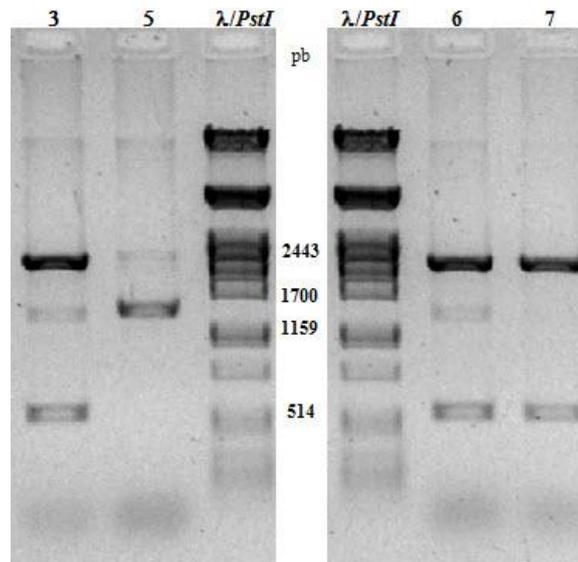
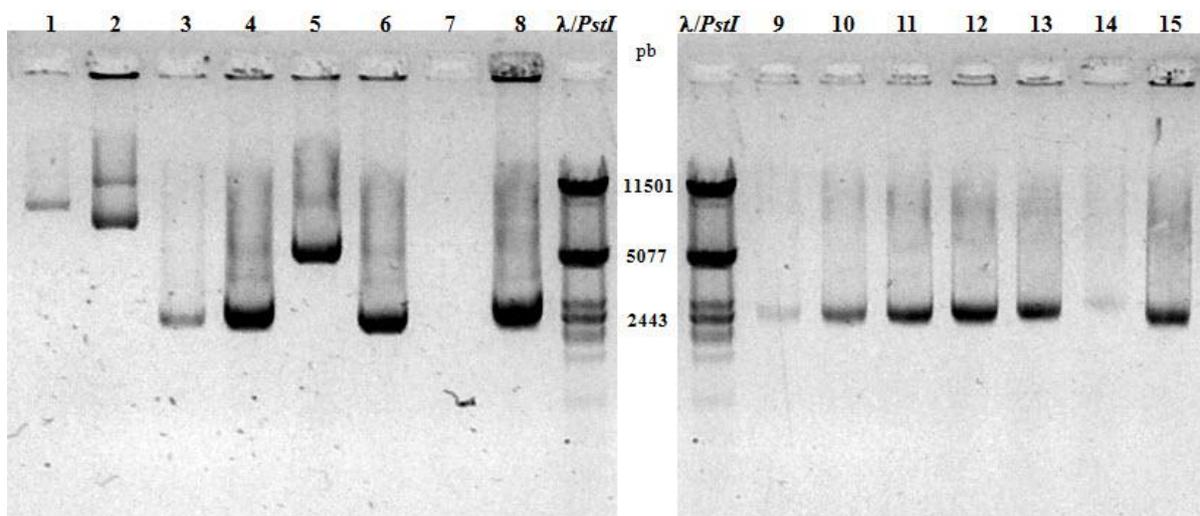


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones realizadas con *EcoRI* para corroborar presencia de PpAP2 en clones 3, 5, 6 y 7. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

4.3.1.3 PpAP2-pTHUbi

Una vez obtenido el plásmido PpAP2-pENTR se realizó una reacción de recombinación entre éste y el plásmido pTHUbi-Gateway utilizando el sistema Gateway (punto 3.7.1.). Se seleccionaron los 28 clones que crecieron en medio LB suplementado con ampicilina, se les realizó extracción de ADN plasmídico y se hizo una electroforesis en gel de agarosa para ver los tamaños de los plásmidos (Figura 24). Los plásmidos en los carriles 1, 2, 21, 25 y 26 mostraron un tamaño aproximado a lo esperado (11000 pb).



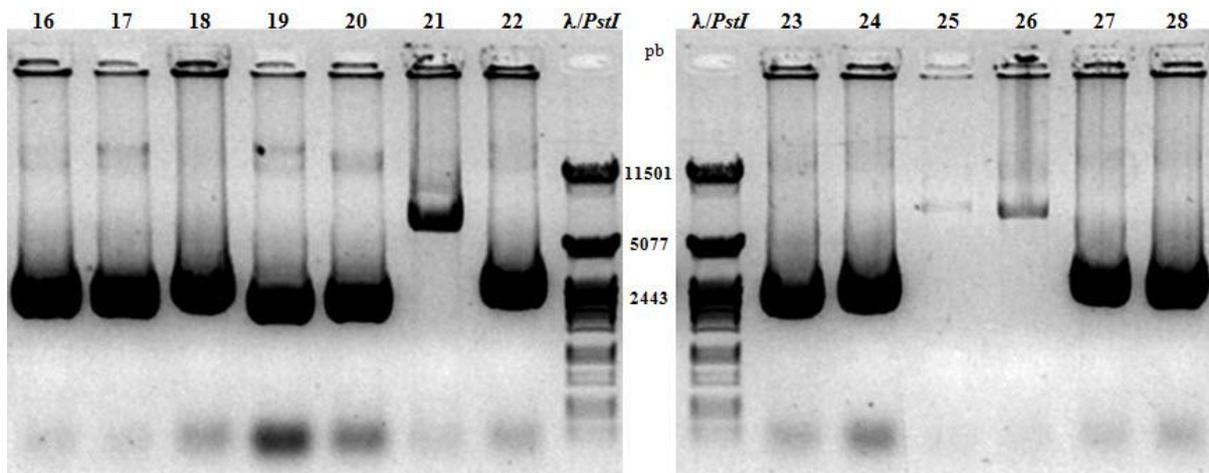


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las distintas extracciones de ADN plasmídico (carriles 1-28), de las colonias crecidas y reaisladas en medio LB suplementado con ampicilina, a partir de la transformación con la mezcla de recombinación entre PpAP2-pENTR y pTHUbi-Gateway. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Para verificar la presencia y el sentido de PpAP2 en aquellos clones considerados como posibles positivos (1, 2, 21, 25 y 26) se realizaron PCRs (punto 3.3.2 modificado). Se usó el cebador prom-Ubi como cebador sentido (se une a su secuencia complementaria en el promotor de la ubiquitina del plásmido pTHUbi-Gateway) y el cebador OEAP2 3' rv como cebador sentido. Se usaron 20 ng de cada plásmido como molde y las condiciones para la amplificación fueron; para la fase de desnaturalización inicial se realizó un ciclo único a 94°C por cinco minutos, la segunda fase fue de 40 ciclos con temperaturas sucesivas de 94°C, 51°C y 72°C, todas de 30 segundos de duración. Por último se programó una fase final de extensión a 72°C por cuatro minutos. Como se ve en la Figura 25 los clones 1, 2, 25 y 26 se confirmaron como positivos para la presencia de PpAP2 evidenciada por la visualización de bandas de un tamaño de 600 pb aproximadamente. De éstos, los clones 25 y 26 dieron bandas muy tenues. Dado que la amplificación funcionó, se puede inferir además de la presencia de PpAP2, que el sentido en que PpAP2 se insertó en el pTHUbi-Gateway es el correcto.

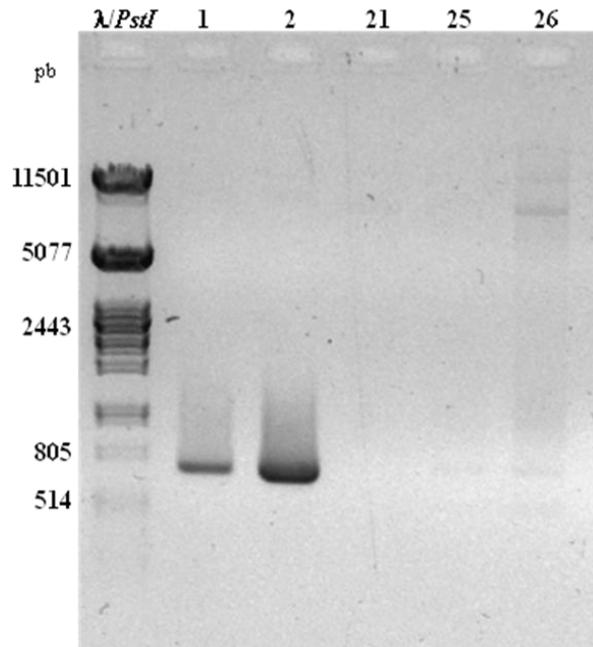


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de amplificación por PCR de PpAP2 obtenidos a partir de ADN molde de los clones 1, 2, 21, 25 y 26. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Se eligió ADN plasmídico del clon 2 para enviar a secuenciar y verificar que la secuencia de PpAP2 no se haya visto alterada a lo largo de los distintos procedimientos realizados hasta el momento. Para ello se enviaron 100 ng del plásmido de PpAP2-pTHUbi del clon 2 y 5 μ L (10 μ M) del cebador Prom-Ubi al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (IPM). Como se ve en la Figura 26 se observa un 100% de identidad y 0% de “Gaps” entre la secuencia CDS de PpAP2 obtenida a partir de la página web de *Phytozome 10.2* y la secuencia enviada por el servicio de secuenciación.

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
	998 bits(540)	0.0	540/540(100%)	0/540(0%)	Plus/Plus			
PpAP2-pTHUbi	141	CAGGTAATGCAGT	CGAGCATA	CATTTCGGGTGCAGGAGGGCATGGCGGAGGGCACAGCATT	200			
PpAP2	1	CAGGTAATGCAGT	CGAGCATA	CATTTCGGGTGCAGGAGGGCATGGCGGAGGGCACAGCATT	60			
PpAP2-pTHUbi	201	GTGTGTA	ACTCACCATTG	CCGCTCTCTGTG	CACACACTTGCACG	CCGTTTGCATTCCCAAA	260	
PpAP2	61	GTGTGTA	ACTCACCATTG	CCGCTCTCTGTG	CACACACTTGCACG	CCGTTTGCATTCCCAAA	120	
PpAP2-pTHUbi	261	TATAAGGGAAT	CAGATATCGT	CCAGAATTGGGT	CGGTACATCTCAGAGATT	CGTCCCGCC	320	
PpAP2	121	TATAAGGGAAT	CAGATATCGT	CCAGAATTGGGT	CGGTACATCTCAGAGATT	CGTCCCGCC	180	
PpAP2-pTHUbi	321	CAGCCTCGCA	AGCGCAAGAT	CTGGCTAGGAA	CGTACAAGACAGCTGAGGAA	GCCGCGCGC	380	
PpAP2	181	CAGCCTCGCA	AGCGCAAGAT	CTGGCTAGGAA	CGTACAAGACAGCTGAGGAA	GCCGCGCGC	240	
PpAP2-pTHUbi	381	GCCTTCGAT	GCGGGCATCTT	CTACACGAAGA	AGCCCATTA	ACTACAATTTGAA	GAAGACTCT	440
PpAP2	241	GCCTTCGAT	GCGGGCATCTT	CTACACGAAGA	AGCCCATTA	ACTACAATTTGAA	GAAGACTCT	300
PpAP2-pTHUbi	441	CCATCCATC	CTCGAGCCTCT	ACC	GGAGAATCTA	ACCCTGAGGAGGAACAC	CGTCGAGATT	500
PpAP2	301	CCATCCATC	CTCGAGCCTCT	ACC	GGAGAATCTA	ACCCTGAGGAGGAACAC	CGTCGAGATT	360
PpAP2-pTHUbi	501	CAGAAGAAAG	CTAAGGCTG	CGGGCTGCTAG	GGTCCAAGCCACACA	AGTGATGCTTGAGACC	560	
PpAP2	361	CAGAAGAAAG	CTAAGGCTG	CGGGCTGCTAG	GGTCCAAGCCACACA	AGTGATGCTTGAGACC	420	
PpAP2-pTHUbi	561	AAACCCCCCG	GAATTATGT	GTCTGACATG	ACGAAACGCTTTCAT	GAGAGCCAGATGTAC	620	
PpAP2	421	AAACCCCCCG	GAATTATGT	GTCTGACATG	ACGAAACGCTTTCAT	GAGAGCCAGATGTAC	480	
PpAP2-pTHUbi	621	TGCGCCAAAC	CTCACGAACC	ACCTCGAGAA	ATCCAATTCGCGG	TGTCTTAGACAGGTGA	680	
PpAP2	481	TGCGCCAAAC	CTCACGAACC	ACCTCGAGAA	ATCCAATTCGCGG	TGTCTTAGACAGGTGA	540	

Figura 26. Alineamiento entre la secuencia CDS obtenida a partir de la base de datos de *Phytozome 10.2* (PpAP2) y la secuencia (PpAP2-pTHUbi) enviada por el servicio de secuenciación. Se muestra el porcentaje de identidad (Identities), espacios (Gaps) y sentido (Strand).

4.3.1.4 PpAP2-pUB-DEST

Como se expresó en el punto 3.7.2 y se ilustra en la Figura 13 se utilizó el plásmido PpAP2-pENTR obtenido en el punto 4.3.1.2 y utilizado en la construcción de PpAP2-pTHUbi, para la construcción de PpAP2-pUB-DEST. De igual forma que con PpAP2-pTHUbi se realizó una reacción de recombinación mediante el sistema Gateway (punto 3.7.1.) entre PpAP2-pENTR y el plásmido pUB-DEST. Se obtuvieron 16 colonias en medio LB-Agar suplementado con espectinomicina (Sp), las cuales fueron reaisladas en iguales condiciones para la extracción del ADN plasmídico. La Figura 27 muestra que los plásmidos obtenidos presentan un tamaño que concuerda con lo esperado para PpAP2-pUB-DEST (10037 pb aproximadamente).

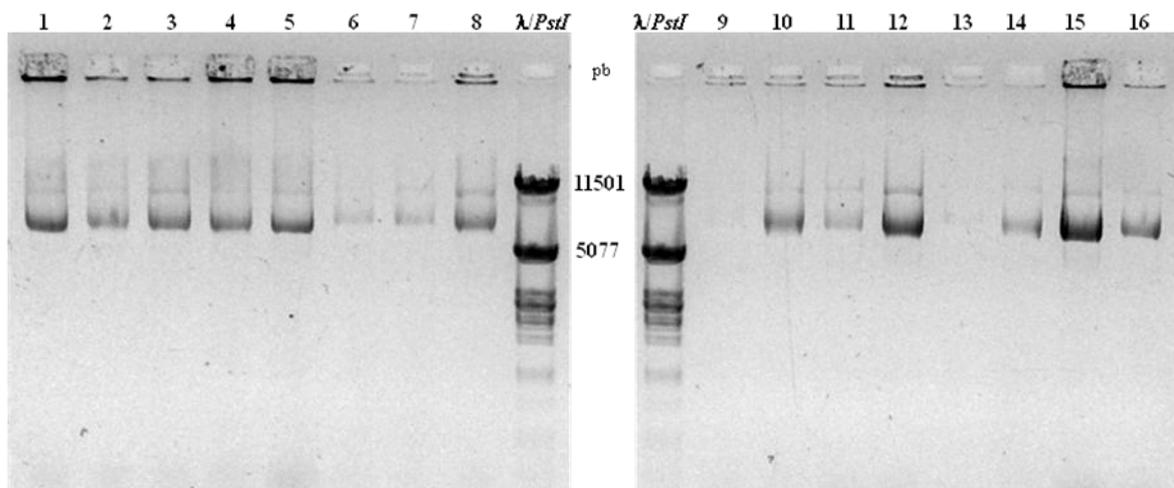


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las minipreparaciones de ADN plasmídico de los 16 clones reaislados en medio LB-Agar suplementado con el antibiótico espectinomomicina. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Para corroborar la inserción de PpAP2 en el plásmido pUB-DEST se utilizó *BglIII* la cual presenta dos sitios de restricción en el plásmido vacío produciendo un fragmento de 1819 pb y otro de 8999 pb. En cambio, aquellos plásmidos que hayan integrado a PpAP2 tendrán un tercer sitio de restricción, ubicado dentro de la secuencia CDS de PpAP2, generando dos fragmentos de aproximadamente 500 pb y uno de 8999 pb. Se eligieron aleatoriamente los clones 1, 3, 6, 11, 12 y 15 para digerir con *BglIII*, luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa para visualizar los resultados (Figura 28).

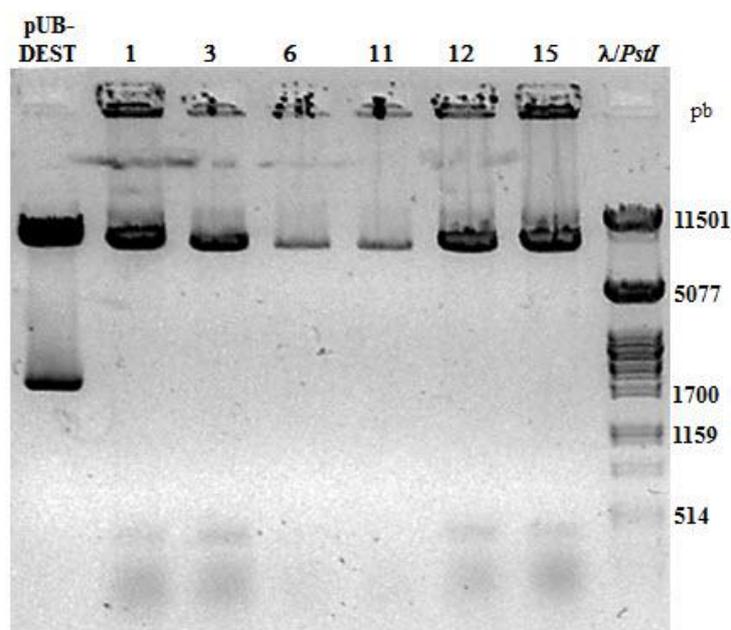


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones de ADN plasmídico realizadas con *BglIII* de los clones 1, 3, 6, 11, 12, 15 y del plásmido vacío pUB-DEST. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Como se ve en las digestiones con *Bgl*III, los clones 1, 3, 12 y 15 dieron positivos como plásmidos que integraron a PpAP2 a pUB-DEST. Esto fue evidenciado por la presencia de dos bandas en cada carril, una de 500 pb que contendría dos fragmentos diferentes producto de la digestión dentro PpAP2 y una única banda de 8999 pb generada por dos sitios de restricción ubicados por fuera de la región de recombinación y que por lo tanto coincide con la banda de mayor tamaño generada por digestión del vector vacío pUB-DEST.

Para corroborar la presencia de PpAP2 y deducir su sentido en el vector pUB-DEST se envió una muestra de ADN plasmídico del Clon 1 (400 ng) junto con el cebador OEAP2 3' rv 10µM (Tabla 1) al servicio de secuenciación. La Figura 29 muestra el “reverse-complement” de la secuencia enviada por el servicio de secuenciación donde se resalta la secuencia del promotor de la ubiquitina 10 de *A. thaliana* y de la secuencia nucleotídica de PpAP2 que tiene un 100% de identidad con respecto a la CDS de este gen obtenida a partir de la base de datos de la página web de *Phytozome 10.2*.

```
5' _GATTAACACTCGAGTGCGGGATCCTCTAGAGGGCCCCATCACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCGCCG
GAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCGAATTCAGTGTGATTGAGTAAATGCAGTCGAGCATAACATTCGG
GTGCAGGAGGGCATGGCGGAGGGCACAGCATTGTGTGTAACCTACCATTGCCGTCTCTGTGACACACTTGCAC
GCCGTTTGATTCCCAAATATAAGGGAATCAGATATCGTCCAGAATTGGGTGCGGTACATCTCAGAGATTGTCGCC
GCCAGCCTCGCAAGCGCAAGATCTGGCTAGGAACGTACAAGACAGCTGAGGAAGCCGCGCGCCTTCGATG
CGGGCATCTTCTACACGAAGAAGCCATTAATACTACAATTTGAAGACTCTCCATCCATCCTCGAGCCTCTACCGGA
GAATCTAACCCCTGAGGAGGAACACGTCGAGATTGAGAAGAAAGCTAAGGCTGCGGCTGCTAGGGTCCAAGCC
ACACAAGTGATGCTTGAGACCAAACCCCGGAATTATGTGTCTGACATGACGGAACGCTTTCATGAGAGCCA
GATGTACT_3'
```

Figura 29. Secuencia “reverse-complement” obtenida a partir de la secuencia deducida y enviada por el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo del clon 1 PpAP2-pUB-DEST. En gris suave se muestra la región de la secuencia con homología al promotor de la ubiquitina 10 de *A. thaliana* proveniente del vector pUB-DEST y en gris fuerte se observa la región con un 100% de identidad con el gen PpAP2 de *P. patens*.

4.3.2 Transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens*

La transformación se realizó utilizando protoplastos de *P. patens* salvaje mediante PEG tal cual se explica en la sección 3.7.1. El plásmido utilizado para esta transformación fue la construcción que se muestra en la figura 30 obtenida a partir de los ensayos realizados en el punto 4.3.1.3.

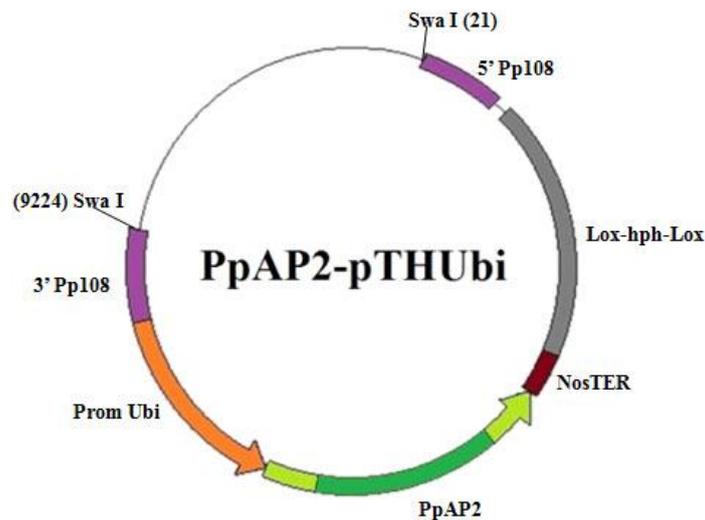


Figura 30. Vector PpAP2-pTHUbi. Se esquematizan las secuencias que le componen y sitios donde digiere la enzima *Swa I* que se utiliza para la transformación de *P. patens*.

Para la transformación de protoplastos debe linealizarse el plásmido utilizando la enzima *SwaI* que digiere lo más próximo posible a los extremos de la secuencia que se insertó en el genoma de *P. patens*. Se digirieron 20µg de PpAP2-pTHUbi por duplicado. Una vez linealizado el plásmido se precipitó y se cuantificó para ser usado en la transformación. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la digestión completa y calcular la concentración de los fragmentos luego de la precipitación (Figura 31A y 31B). Se obtuvo una concentración final de aproximadamente 15 µg totales en cada reacción, los cuales fueron utilizados para transformar los protoplastos según punto 3.7.1.

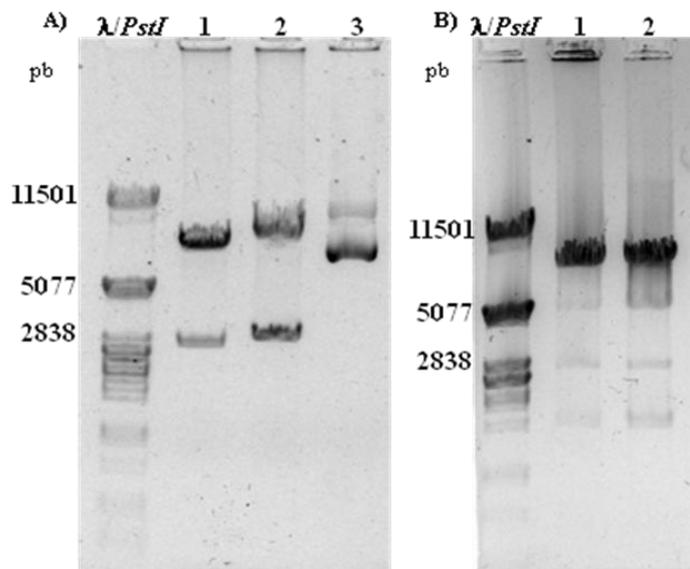


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de (A) plásmido PpAP2-pTHUbi digerido con *SwaI* (carriles 1 y 2) y sin digerir (carril 3) y (B) PpAP2-pTHUbi digerido y precipitado (carriles 1 y 2). *λ/PstI* es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Los protoplastos así transformados fueron regenerados durante 7-10 días en medio PRMB/PRMT. Luego se pasó a medio sólido BCDTA suplementado con higromicina (Hyg) a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de siete días, se realizó otro pasaje a medio sólido BCDTA sin higromicina. Este procedimiento de alternar entre medio sólido BCDTA suplementado con y sin Hyg se repitió dos veces más. De esta forma se logró dar tiempo a los protoplastos para que regeneren, eliminando aquellos protoplastos que no hayan integrado el fragmento deseado en su genoma. Los resultados de la transformación se muestran en la Figura 32A. Se obtuvieron 12 colonias en los primeros pasajes de regeneración de protoplastos, pero solo 7 resultaron ser transformantes estables al terminar con el proceso de selección con higromicina, clones 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 (Figura 32B).

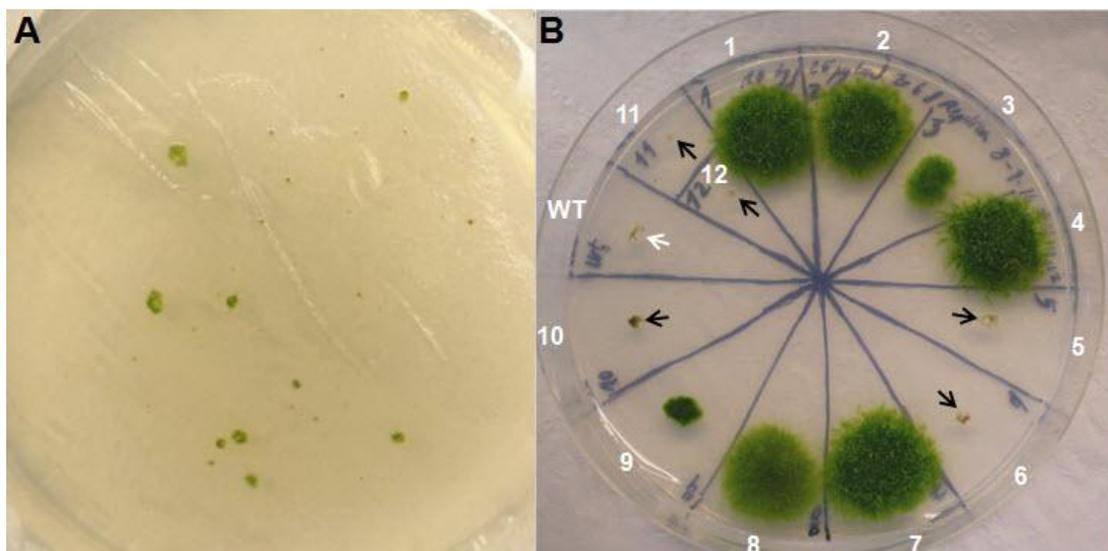


Figura 32. (A) Protoplastos de *P. patens* regenerados luego del proceso de transformación con PpAP2-pTHUbi. (B) Transformantes obtenidos al final de los pasos de selección en medio sólido BCDTA suplementado con higromicina. La flecha blanca muestra protonema salvaje (WT) de *P. patens* como control negativo. Las flechas negras muestran clones inestables que si bien sobrevivieron a las primeras rondas de selección en celofán, no lo hicieron en medio BCDTA sin celofán y suplementado con higromicina.

4.3.2.1 Análisis de la ploidía relativa por citometría en las líneas de *Physcomitrella patens*

Luego de finalizada la selección de los transformantes es necesario chequear su ploidía ya que durante el proceso de transformación suelen formarse clones poliploides debido a la fusión de protoplastos (Schween et al. 2005). Este ensayo se realizó según lo expuesto en el punto 3.9.2. Se encontraron cuatro clones haploides (clones 1, 2, 4 y 7, nombrados como pUBI:AP2.1, 2, 4 y 7) y tres poliploides (pUBI:AP2.3, 8 y 9). Los resultados del análisis de ploidía por citometría de flujo se muestran en las Figura 33.

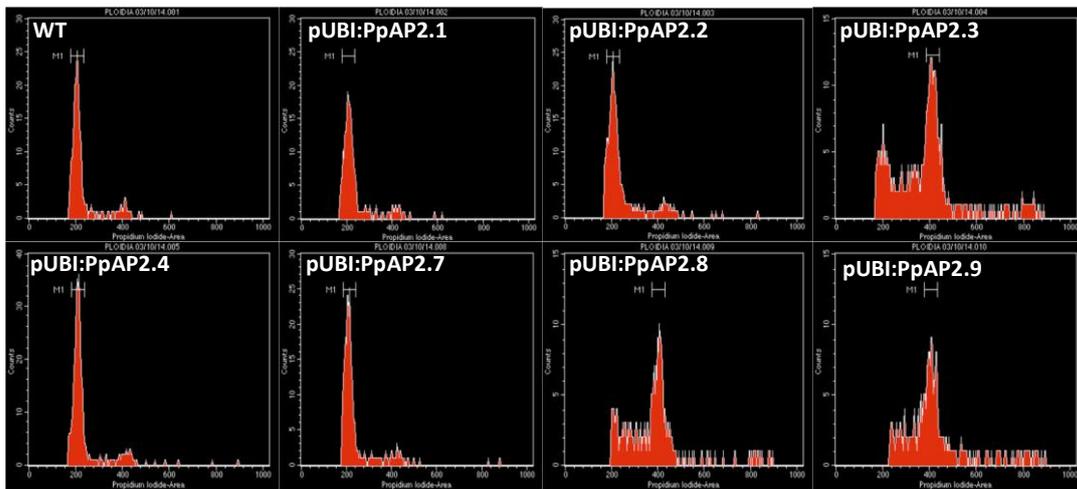


Figura 33. Diagramas de citometría de flujo de plantas salvajes (WT) y los siete transformantes de *P. patens*.

Los transformantes pUBI:PpAP2.1, 2, 4 y 7 presentan un diagrama de citometría similar al de plantas salvajes y por lo tanto fueron identificados como haploides. Estas líneas transformadas no presentan una alteración en el desarrollo y fenotípicamente son similares a plantas salvajes. Sin embargo el fenotipo observado en las colonias de los transformantes pUBI:PpAP2.3, 8 y 9 que resultaron ser poliploides, presentan un crecimiento compactado, protonema rizado y no desarrollan gametóforos (Figura 34).

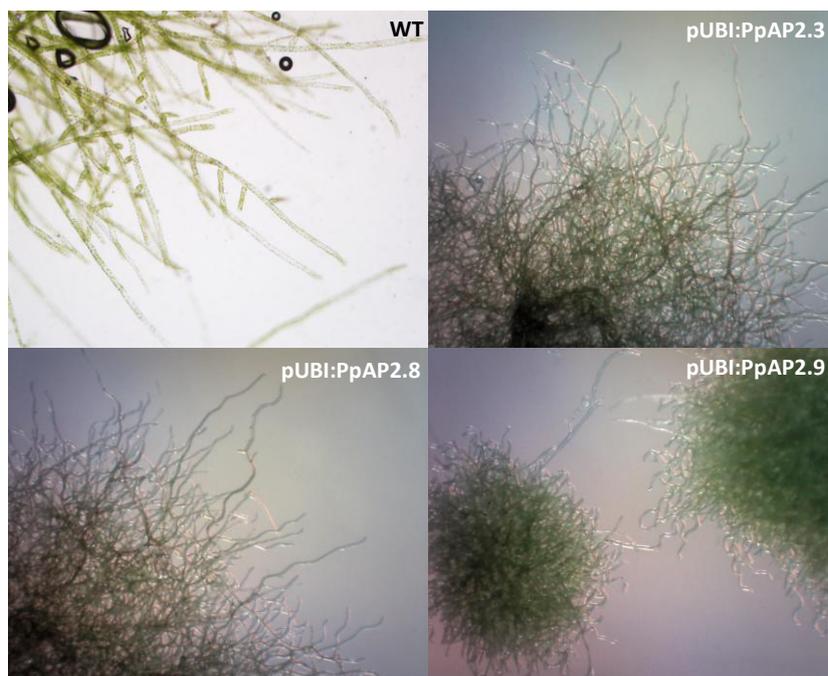


Figura 34. Protonema de *P. patens* salvaje (WT) y transformantes poliploides (pUBI:PpAP2.3, pUBI:PpAP2.8 y pUBI:PpAP2.9).

4.3.2.2 Análisis de los transformantes haploides mediante “Northern blot”

Se extrajo ARN (punto 3.5.2) a partir de los transformantes haploides para ver los niveles de expresión de PpAP2 y la expresión de la proteína Dirigente (DIR), involucrada en la defensa de la planta, en comparación a plantas de *P. patens* salvajes sin tratar o tratadas durante 24 horas post inoculación (hpi) con esporas de *B. cinerea*. Se detectaron altos niveles constitutivos de transcritos de PpAP2 en los transformantes pUBI:AP2.2 y pUBI:AP2.4, mientras que los otros transformantes no tenían niveles de expresión constitutiva de PpAP2. La sonda de PpAP2 obtenida no permitió observar el aumento de expresión de este gen en plantas salvajes inoculadas con *B. cinerea*. Sin embargo, la sonda generada para DIR si detecta un aumento de expresión de este gen de defensa en plantas salvajes inoculadas con *B. cinerea*. Los resultados muestran además, que los niveles de expresión de DIR en muestras sin inocular con *B. cinerea* son iguales entre plantas salvajes y los diferentes transformantes (Figura 35). Esto sugiere que PpAP2 no induce la expresión de DIR.

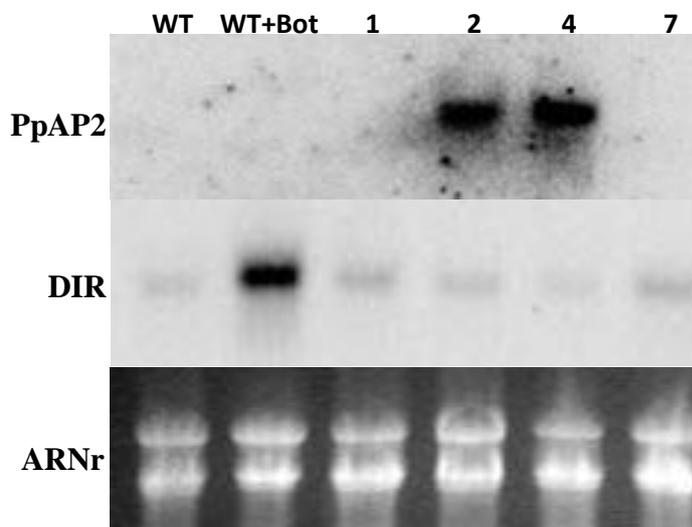


Figura 35. Análisis de expresión a 24 hpi de PpAP2 y proteína DIR en plantas salvajes (WT), inoculadas con esporas de *B. cinérea* (Wt+Bot) y transformantes de PpAP2. Los carriles 1, 2, 4 y 7 corresponden a los transformantes pUBI:PpAP2.1, pUBI:PpAP2.2, pUBI:PpAP2.4 y pUBI:PpAP2.7 respectivamente. El control de carga se realizó con ARN ribosomal (ARNr)

4.3.2.3 Análisis de la susceptibilidad de las plantas de *P. patens* que sobreexpresan PpAP2 en respuesta a fitopatógenos comparado con plantas salvajes

Para medir la susceptibilidad de las plantas transformantes que sobreexpresan PpAP2 ante distintos tipos de patógenos se realizó el ensayo de daño celular por tinción con Azul de Evans

(3.11.1). Para esto se realizaron tres tratamientos por duplicado para cada línea transformante y plantas salvajes de *P. patens* de tres semanas de crecidas. Los tratamientos fueron: agua, CF de *P. c. carotovorum* cepa SCC1 o esporas de *B. cinerea* (2.5×10^5 esp/mL). Los tratamientos con agua y CF fueron de 24 hrs mientras que el tratamiento con esporas de *B. cinerea* fue realizado durante 36 horas. Los datos que se obtuvieron al medir la OD a 600 nm para cada muestra, fue normalizado con respecto al peso seco de las colonias. Los resultados muestran que las líneas pUBI:PpAp2.2 y pUBI:PpAP2.4 presentan diferencias significativas en la susceptibilidad ante la exposición de CF y *B. cinerea* en comparación con plantas salvajes, evidenciado por un menor daño de los tejidos (Figura 36). Sin embargo, las líneas pUBI:PpAp2.1 y pUBI:PpAP2.7 presentan un nivel de muerte celular similar a las plantas salvajes. Este resultado concuerda con los ensayos por “*northern blot*” que demuestran una fuerte expresión constitutiva de PpAP2 solamente en las líneas pUBI:PpAp2.2 y pUBI:PpAP2.4.

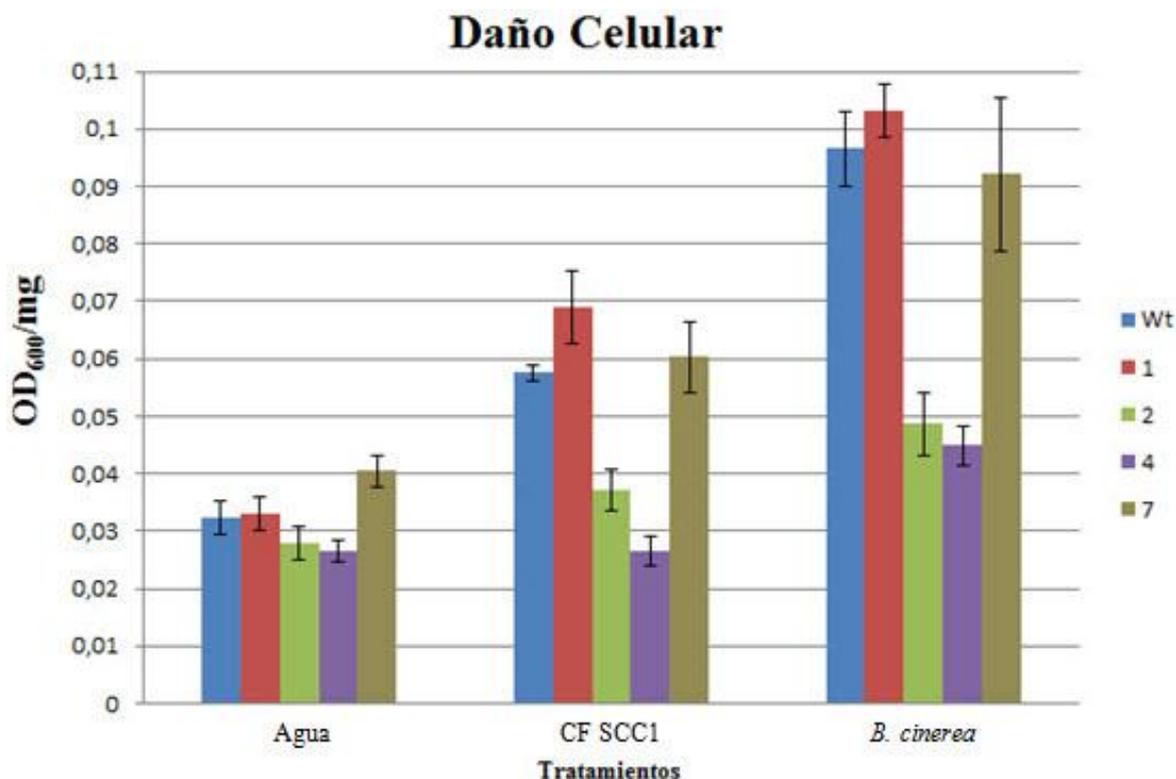


Figura 36. Gráfico que muestra la cuantificación del daño celular en plantas salvajes de *P. patens* (WT) y líneas pUBI:PpAP2.1, pUBI:PpAP2.2, pUBI:PpAP2.4, pUBI:PpAP2.7 (1, 2, 4 y 7 en leyenda respectivamente) obtenido a partir del ensayo de azul de Evans normalizado en función del peso seco de las colonias de *P. patens*. Las barras de error muestran diferencias significativas entre líneas utilizadas para este ensayo.

Al analizar los síntomas de las plantas salvajes y sobreexpresantes pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 luego del tratamiento con el CF de *P. c. carotovorum* y esporas de *B. cinerea*,

no se observaron visualmente diferencias, si bien los tejidos de las plantas salvajes estaban más macerados (datos no mostrados).

Luego de los resultados anteriores y con el objetivo de analizar el comportamiento de las líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 en respuesta a más patógenos, se decidió estudiar un hongo fitopatógeno de amplio rango de hospedero, *C. gloeosporioides*, el cual causa enfermedad en plantas vasculares evidenciado por el amarronamiento de los tejidos. Para determinar si este hongo es un patógeno de *P. patens*, se procedió a inocular con una suspensión de esporas plantas salvajes de *P. patens* y se evaluaron los síntomas a 1, 2 y 5 día post inoculación (dpi) (Figura 37). Se vio que *C. gloeosporioides* es capaz de infectar los tejidos de *P. patens* y causar síntomas de enfermedad. Los resultados muestran que a 1 dpi pueden verse tubos de germinación ramificados y apresorios melanizados en la superficie de las hojas (Figura 37K y 37L). A 2 dpi *C. gloeosporioides* infecta los tejidos de *P. patens* encontrándose hifas dentro de las células (Figura 37 J). Al analizar los síntomas se observó que a 2 dpi había tejido de protonema amarronado en el borde de las colonias, células marrones y algunas nervaduras marrones en hojas (Figura 37B, 37E y 37H), mientras que el tejido sin tratar seguía verde (Figura 37A, 37D y 37G). A los 5 dpi las colonias se encontraban ya en muy mal estado con los tejidos del protonema marrón y fuertemente macerados, con la nervadura central de hojas marrón y células marrones en hojas comparados con plantas control (Figura 37C, 37F y 37I).

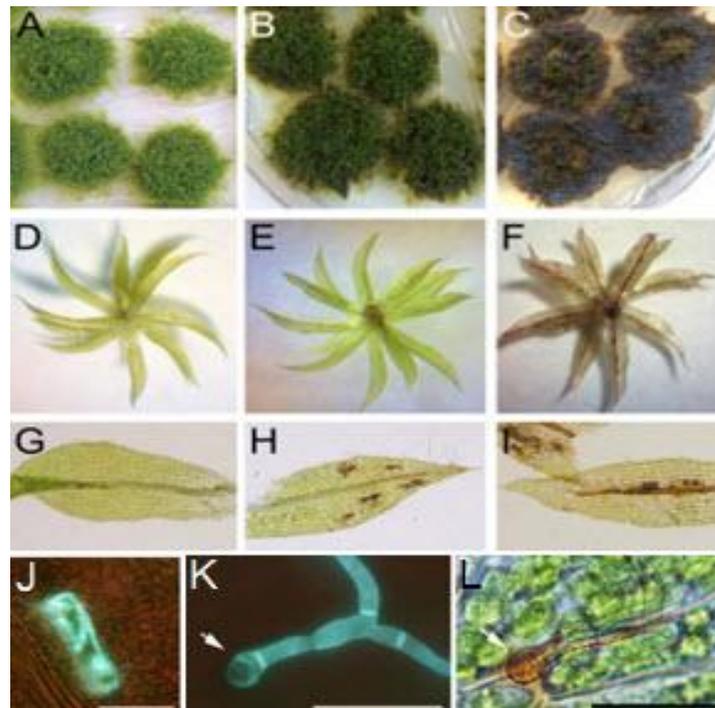


Figura 37. Desarrollo de síntomas en tejidos de *P. patens* inoculado con *C. gloeosporioides*. (A). Colonias control de musgo. (B). Colonias de musgos infectadas con *C. gloeosporioides* a 2 dpi. (C). Colonias de musgos infectadas con *C.*

gloeosporioides a 5 dpi. **(D)**. Gametóforo control. **(E)**. Gametóforo infectado con *C. gloeosporioides* a 2 dpi. **(F)**. Gametóforo infectado con *C. gloeosporioides* a 5 dpi. **(G)**. Hoja control. **(H)**. Hojas infectadas con *C. gloeosporioides* a 2 dpi. **(I)**. Hoja infectada con *C. gloeosporioides* a 5 dpi. **(J)**. Crecimiento intracelular de hifa en célula de hoja de musgo. **(K)**. Hifa en crecimiento sobre superficie de hoja teñida con solofenil. **(L)**. Misma imagen que K mostrando el apresorio de color marrón y maduro. El apresorio se encuentra indicado con una flecha blanca en K y L. Barras de escala representan 50 μm en J y 20 μm en K, L.

Estos resultados demuestran que *C. gloeosporioides* es un patógeno de *P. patens* (Reboledo et al. 2015). Una vez confirmado esto, se procedió a inocular plantas salvajes de *P. patens* y líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 con *C. gloeosporioides*. Este hongo es capaz de infectar tejidos de *P. patens* produciendo gran daño en las plantas infectadas, macerando tejido e induciendo una respuesta del tipo HR (Reboledo et al. 2015). Para ello se realizó una suspensión de esporas de 2.5×10^5 esp/mL con la cual se inocularon las plantas salvajes de *P. patens* y las líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 de tres semanas de crecidas. Se dejaron transcurrir 21 días y se observaron los síntomas (Figura 38). La infección se hizo evidente en todas las colonias avanzando el micelio por la superficie de los tejidos vegetales. Sin embargo, los síntomas de enfermedad en los gametóforos fueron mayores en las plantas salvajes, siendo más notorios, evidenciados por una mayor maceración de tejido, mayor crecimiento de micelio y ausencia casi total de clorofila. Por el contrario las líneas pUBI:AP2.2 y pUBI:AP2.4 aún mostraban tejido verde, crecimiento de hojas nuevas (hojas en desarrollo sin síntomas de infección) y menor maceración de tejido y crecimiento de micelio en comparación a las plantas salvajes. En conjunto, estos resultados demuestran que la sobreexpresión de PpAP2 en este musgo aumenta la resistencia a patógenos.

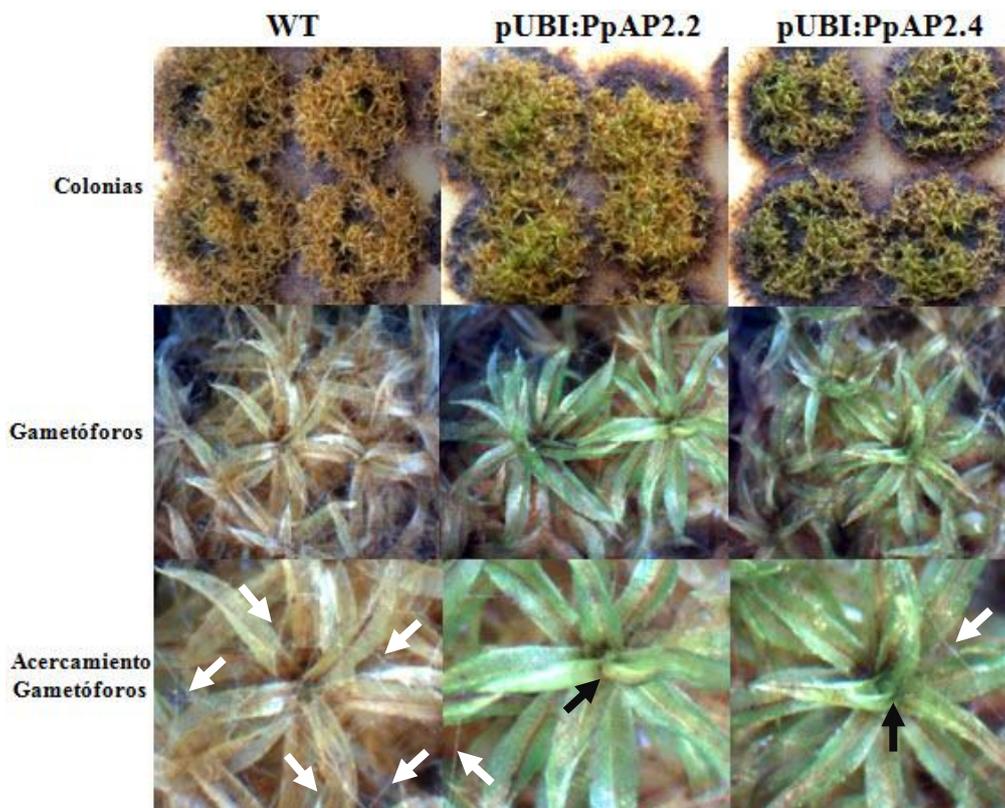


Figura 38. Infección con esporas de *C. gloeosporioides* (2.5×10^5 esp/mL) a los 21 días después de la inoculación en plantas salvajes de *P. patens* (WT) y líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4. Se muestra el daño ocasionado por el hongo en colonias y gametóforos. Las flechas negras señalan los brotes de hojas nuevas en gametóforos y las flechas blancas el micelio creciendo por encima del gametóforo.

4.3.2.4 Respuesta de defensa asociada a la pared celular

Para analizar si la sobreexpresión de PpAP2 altera las respuestas de *P. patens* asociadas a la pared celular luego de la infección se realizaron ensayos de tinción con Safranina-O. Para ello se trataron plantas salvajes y las líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 con el CF de *P.c. carotovorum* (CF SCC1). Luego de 24 hrs se tiñó con Safranina-O como se describe en el punto 3.11.3. La Safranina-O evidencia mecanismos de fortificación de pared mediante la incorporación de compuestos fenólicos. Debido a que se encontraron diferencias, luego de la tinción con Safranina-O, en la composición de la pared celular a la altura de la base y punta de hojas sin tratar se decidió analizar la parte media de la hoja (Oliver et al. 2009). Se observó una mayor tinción por deposición de compuestos fenólicos en plantas salvajes en comparación a las plantas que sobreexpresan PpAP2 (Figura 39). Esta diferencia podría atribuirse a un mayor daño de las paredes celulares en plantas salvajes provocando una respuesta de defensa de mayor intensidad evidenciada por un aumento en la deposición de compuestos fenólicos en comparación a las líneas transformantes que sobreexpresan PpAP2.

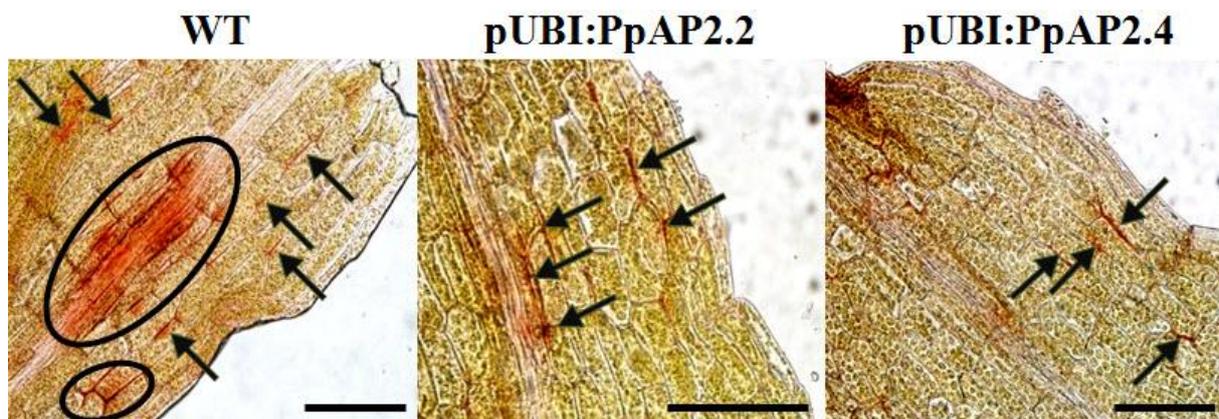


Figura 39. Respuesta de defensa asociada a la pared celular evidenciada por tinción con Safranina-O en plantas salvajes (WT) y líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 a 24 hrs de ser tratadas con CF SCC1. Las flechas negras muestran los sitios donde se visualiza el reforzamiento de la pared celular. Las elipses negras muestran las secciones más extensas en las que se dio el refuerzo de la pared celular. Las barras de escala negras representan 100 μm .

4.3.2.5 Visualización de *B. cinerea* en tejidos de *P. patens* de plantas salvajes, líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4

Para visualizar la infección por el hongo *B. cinerea* se realizaron tinciones con el colorante Solofenil Flavine 7 gfe (punto 3.11.2) en plantas de *P. patens* a 24 hrs de tratadas con una suspensión de esporas de 2.5×10^5 esp/mL. Se observó infección en plantas salvajes y líneas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 evidenciada por el desarrollo de hifas dentro de las células de la planta y por el crecimiento de micelio (Figura 40A, 40B, 40C). En general, las hojas de plantas salvajes presentaron mayor crecimiento del micelio comparado con hojas inoculadas de las plantas transformantes (Figura 40D, 40E, 40F). Esto podría explicar lo visto en la figura del daño celular (Figura 36) donde se ve una diferencia significativa de los niveles de daño celular generada por este patógeno en plantas salvajes en comparación a las líneas transformantes pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4.

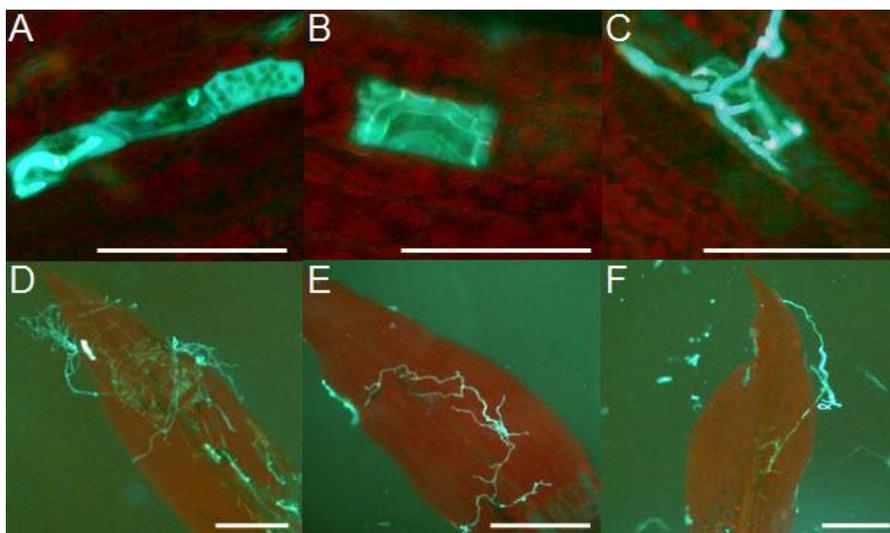


Figura 40. Visualización del hongo *B. cinerea* en hojas de *P. patens* salvaje (**A, D**), línea pUBI:PpAP2.2 (**B, E**) y pUBI:PpAP2.4 (**C, F**) a 24 hrs dpi. La tinción fue con Solofenil Flavina 7 gfe. Las imágenes A-C muestran el crecimiento del hongo dentro de las células, mientras que las imágenes D-F muestran el crecimiento del hongo por sobre las hojas. Las barras de escala blancas en A, B y C representan 50 μm y en D, E y F representan 200 μm .

4.3.3 Obtención de plantas transformantes de *Arabidopsis thaliana*

4.3.3.1 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Debido a que la transformación de *A. thaliana* se realiza utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* como vector biológico se procedió a la transformación de la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* (3.2.4) con el plásmido PpAP2-pUB-DEST (4.3.1.4). Luego de la transformación se procedió a hacer una selección en medio LB-Agar suplementado con los antibióticos rifampicina y espectinomicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Se reaislaron 16 colonias que crecieron en dicho medio a las cuales se les realizaron extracciones de ADN plasmídico. Para analizar la presencia del plásmido PpAP2-pUB-DEST se realizó una electroforesis en gel de agarosa de las 16 extracciones realizadas (Figura 41A) utilizando al plásmido PpAP2-pUB-DEST utilizado para transformar la cepa C58C1 como control del peso molecular deseado. Posteriormente se realizó una PCR de seis de los clones (6, 7, 10, 11, 15 y 16) que presentaron plásmidos de un peso molecular similar al del control. Se utilizaron los cebadores OEAP2 5' fw y OEAP2 3' rv descritos en la Tabla 1. Con los productos obtenidos de las reacciones de amplificación se realizó otra electroforesis en gel de agarosa para corroborar la presencia del gen PpAP2 (Figura 41B).

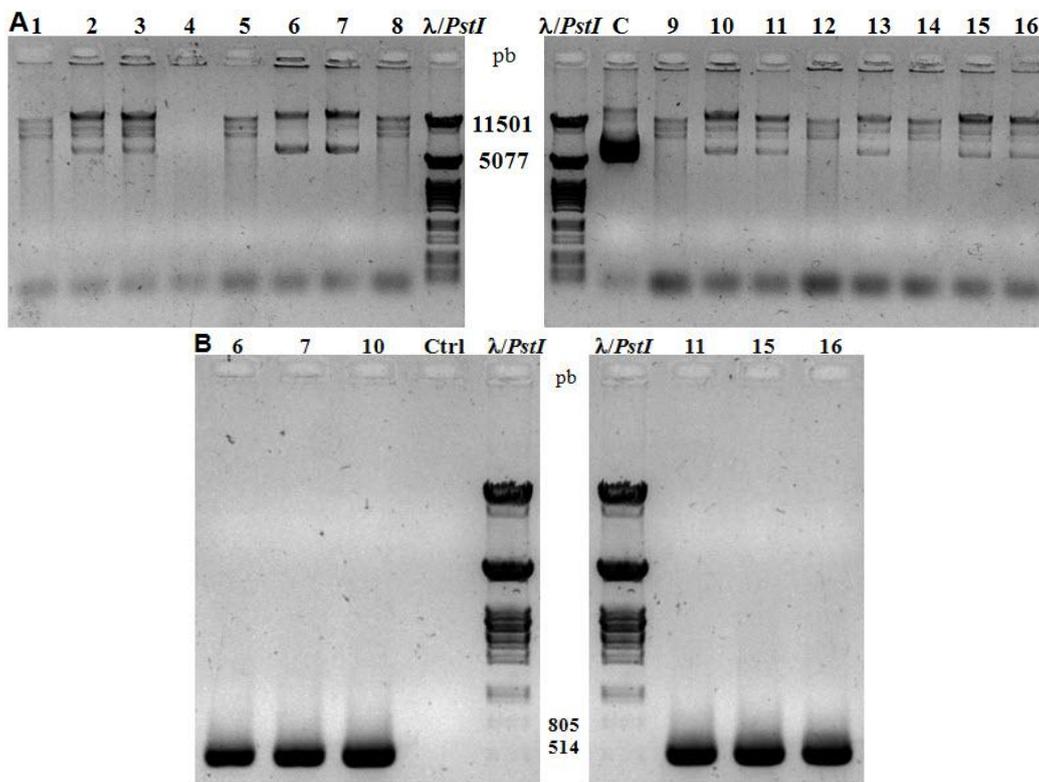


Figura 41. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de 16 extracciones de ADN plasmídico (carriles 1-16) de clones de *A. tumefaciens* obtenidos por transformación con PpAP2-pUB-DEST, seleccionados y reaislados a partir de medio LB-Agar suplementado con antibióticos. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del las reacciones de amplificación por PCR de los clones 6, 7, 10, 11, 15 y 16. El control (C) utilizado en A) es el plásmido PpAP2-pUB-DEST. $\lambda/PstI$ es el marcador de peso molecular en pares de bases (pb). Para el control en B) (Ctrl) se realizó la PCR sin ADN molde sustituyendo dicho volumen por agua mQ.

Todos los clones analizados mediante PCR dieron positivos y contenían el gen PpAP2. Se decidió elegir al clon 6 para guardar gliceroles y seguir con los pasos siguientes para la transformación de *A. thaliana*.

4.3.3.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Luego de obtenido el clon transformante de *A. tumefaciens* se realizó la transformación de *A. thaliana* según fue descrito en el punto 3.8.2. Las semillas obtenidas de la transformación pertenecen a la generación T₀, las cuales fueron sembradas en medio ½ MS pH 5.7, agar 0.7% suplementado con glufosinato amonio 10 µg/mL (Sigma-Aldrich). Las semillas que lograron germinar y crecer fueron seleccionadas para pasar a tierra y así cosechar semillas T₁. Luego de recolectadas las semillas T₁ se volvió a repetir el procedimiento anterior para conseguir las semillas T₂. Estos pasos se repitieron con el propósito de obtener transformantes homocigotas para PpAP2.

4.3.3.3 Fenotipo de los transformantes que sobreexpresan PpAP2

Las plantas transformantes obtenidas a partir de la T₀ y T₁ presentan un desarrollo atrofiado evidenciado por un crecimiento mucho menor y más compacto que las plantas salvajes (Figuras 42A, 42E y 42C, 42G). Para ver si el fenotipo observado se debía a la construcción de PpAP2-pUB-DEST y no era un artefacto técnico, se sembraron transformantes de *A. thaliana* generación T₂ obtenidas a partir de la transformación con el plásmido 214-pUB-DEST que tiene inserta la secuencia CDS del gen 214 (gen de función desconocida) en lugar de la de PpAP2 (Figuras 42D y 42H).

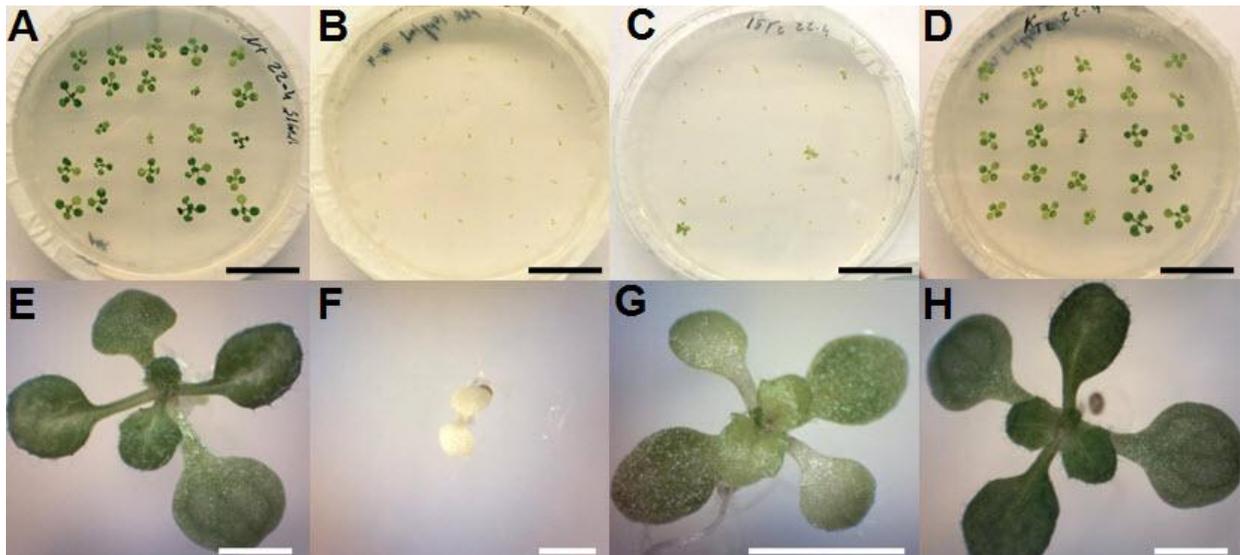


Figura 42. (A) Plantas salvajes de *A. thaliana* sembradas en medio ½ MS sin glufosinato amonio. (B) Plantas salvajes de *A. thaliana* sembradas en medio ½ MS con glufosinato amonio. (C) Plantas T₂ PpAP2-pUB-DEST sembradas en medio ½ MS con glufosinato amonio. (D) Plantas T₂ 214-pUB-DEST sembradas en medio ½ MS con glufosinato amonio. (E-H) plantas observadas en lupa de placas A-D respectivamente. Las barras de escala negras representan 20 mm, las blancas 2 mm.

Los resultados muestran que las plantas 214-pUB-DEST en medio con selección crecen igual que las plantas salvajes crecidas sin selección, por lo que el fenotipo observado en las transformantes PpAP2-pUB-DEST se debía probablemente a la sobreexpresión de PpAP2.

Otra diferencia a nivel del desarrollo es que las plantas salvajes y transformantes 214-pUB-DEST presentan hojas redondas y alargadas mientras que las transformantes PpAP2 desarrollan hojas más lanceoladas y aserradas (Figura 43D). Las diferencias en el desarrollo se hicieron más visibles a medida que pasaba el tiempo como se muestra en la figura 43 donde se ven los transformantes PpAP2-pUB-DEST y 214-pUB-DEST y plantas salvajes a los 27 días de sembradas en medio ½ MS pH 5.7, agar 0.7% suplementado con glufosinato amonio 10 µg/mL (Sigma-Aldrich). Debido al enanismo que presentan las plantas transformantes para PpAP2 no fue posible realizar ensayos de susceptibilidad a patógenos.

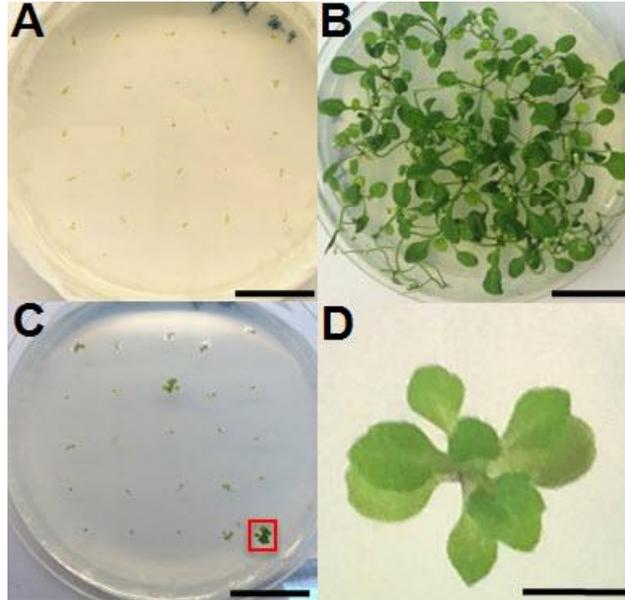


Figura 43. Imágenes a 27 días de siembra en medio $\frac{1}{2}$ MS con glufosinato amonio de: (A) Línea salvaje de *A. thaliana*. (B) Línea 214-pUB-DEST generación T₂. (C) Línea PpAP2-pUB-DEST generación T₂. (D) Aumento de la planta dentro del recuadro rojo en C. La barras de escala negras en A, B y C representan 20 mm y en D 2 mm.

Si bien se logró la transformación de *A. thaliana* se obtuvieron plantas con fenotipo enano y como puede observarse en la figura 43C la cantidad de plantas que sobreviven a la selección son muy pocas.

5. Discusión

5.1 Obtención de sobreexpresantes del gen *PpAP2* en *Physcomitrella patens*

Luego de transformados los protoplastos y obtenidas las plantas transformantes luego de sucesivos pasajes en medio BCDTA suplementado con higromicina, se observaron diferencias entre los clones evidenciándose dos grupos. Uno de los grupos no presentó diferencias fenotípicas observables con respecto a las plantas salvajes. El segundo grupo sin embargo, presentó diferencias marcadas con respecto a las plantas salvajes. Las diferencias comprendían la ausencia de gametóforos, crecimiento ondulado del caulonema y cloronema, y diferentes grados de compactación del protonema dando lugar a colonias más chicas. La experiencia previa en la transformación de *P. patens* en el laboratorio, sugería que el fenotipo observado en el segundo grupo podía deberse a clones poliploides creados durante el proceso de transformación al fusionarse los protoplastos (Schween et al. 2005). Como forma de probar lo anterior y para poder identificar los clones haploides con los que se seguiría trabajando se verificó la ploidía de los transformantes obtenidos a través de citometría de flujo. Se verificó la haploidía para cuatro de los siete transformantes analizados, incluyendo pUBI:PpAP2.1, pUBI:PpAP2.2, pUBI:PpAP2.4 y pUBI:PpAP2.7. Los tres clones poliploides restantes, pUBI:PpAP2.3, pUBI:PpAP2.8 y pUBI:PpAP2.9, presentaron diferencias fenotípicas con respecto a plantas salvajes. De esta forma se siguió con los clones haploides pUBI:PpAP2.1, pUBI:PpAP2.2, pUBI:PpAP2.4 y pUBI:PpAP2.7 a los cuales se les extrajo ARN para ser analizado por “*Northern blot*” y ver el nivel de expresión de *PpAP2*. Dos de los cuatro clones haploides, pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4, mostraron niveles de expresión constitutivos de *PpAP2* altos y similares entre sí con respecto a plantas salvajes, no así los clones restantes (pUBI:PpAP2.1 y pUBI:PpAP2.7) cuyos niveles de expresión no fueron detectados.

5.1.1 La sobreexpresión de *PpAP2* no altera el desarrollo de *Physcomitrella patens*

Los factores de transcripción con dominio AP2 forman una familia en plantas cuyos miembros participan en el desarrollo y en la respuesta frente al estrés biótico y abiótico. En condiciones normales de crecimiento *PpAP2* no se expresa en los tejidos de *P. patens*. La sobreexpresión de *PpAP2* en este musgo parece no tener incidencia apreciable en el desarrollo de *P. patens* como se evidencia al comparar transformantes haploides que sobreexpresan *PpAP2* con plantas

salvajes. Lo anterior es de esperar ya que al analizar la secuencia y hacer un *blast* contra otras secuencias conocidas, se observa una alta homología con factores de transcripción ERF, los cuales se caracterizan por activarse bajo estrés biótico y no así durante el desarrollo de la planta. Si bien no se encontraron diferencias en el desarrollo de las plantas transformadas comparadas con plantas salvajes en el estadio de desarrollo del gametofito sería interesante analizar si existen cambios durante la formación del esporofito y el desarrollo de esporas.

5.1.2 Las líneas que sobreexpresan PpAP2 son menos susceptibles al daño por patógenos

Para evaluar la susceptibilidad de los sobreexpresantes al daño por patógenos se realizaron varios ensayos. El primero comprendió el ensayo de daño celular por azul de Evans, donde se evidenció un menor daño celular en los clones pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 tratados con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y esporas de *B. cinerea* en comparación a plantas salvajes y al resto de los transformantes. Los clones pUBI:PpAP2.1 y pUBI:PpAP2.7 desarrollaron un nivel de daño celular semejante al de plantas salvajes para ambos tratamientos (CF SCC1 y *B. cinerea*). Los resultados obtenidos son congruentes con los del *northern blot* ya que aquellos clones que presentan altos niveles constitutivos de expresión de PpAP2 resultan ser los menos susceptibles al daño por patógenos. Además, los sobreexpresantes pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 no solo presentan menor daño frente al tratamiento con el CF de *P. c. carotovorum* y al hongo *B. cinerea*, sino que también mostraron una menor susceptibilidad al daño provocado por el hongo *C. gloeosporioides*. En las inoculaciones con *C. gloeosporioides* se vio un menor crecimiento de micelio sobre las colonias transformantes de pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 a los 21 dpi en comparación a plantas salvajes. La identificación de *C. gloeosporioides* como un patógeno capaz de infectar tejidos de *P. patens* es novedoso y permite analizar respuestas de defensa activadas luego de la infección en esta planta modelo (Reboledo et al. 2015).

Mediante tinciones con el fluoróforo Solofenil Flavine 7 gfe se pudo visualizar la infección de *B. cinerea* y se observó que este hongo es capaz de producir daño y alojarse dentro de las células de las hojas de los gametóforos de plantas salvajes y plantas transformantes. En estas plantas el micelio de *B. cinerea* crece menos en los clones pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 en comparación a plantas salvajes. En nuestro laboratorio hemos puesto a punto la cuantificación de micelio de *B. cinerea* mediante PCR cuantitativo (Ponce de León et al. 2012). Por lo tanto

mediante qPCR se podrá corroborar la disminución del crecimiento de *B. cinerea* en las plantas que sobreexpresan PpAP2 en comparación con plantas salvajes. También se observó un menor crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* y menor maceración y amarronamiento de los tejidos en los sobreexpresantes de PpAP2 en comparación con plantas salvajes.. El menor crecimiento de micelio de *B. cinerea* en las plantas sobreexpresante de PpAP2 podría explicar los datos obtenidos a partir del ensayo de daño celular por azul de Evans ya que si hay un menor crecimiento del micelio en los transformantes es de esperar obtener un menor nivel de daño celular en comparación a plantas salvajes. Por último se trataron plantas salvajes y transformantes con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* para luego realizar tinciones con Safranina-O para analizar si la sobreexpresión de PpAP2 lograba alterar la respuesta de *P. patens* asociada a la pared celular. Se observó una mayor modificación de la pared por acumulación de compuestos fenólicos en plantas salvajes en comparación a los clones pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4. Ya que el CF contiene elicitores de *P.c.carotovorum* como ser enzimas que degradan la pared celular de las plantas, una menor incorporación de compuestos fenólicos en la pared en los clones pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 reflejan probablemente un menor daño de la pared celular. Estos resultados concuerdan con el menor daño celular obtenido en el experimento realizado con azul de Evans donde el daño celular, en plantas pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4 tratadas con CF SCC1, fue menor que para plantas salvajes. El aumento de la resistencia en plantas que sobreexpresan factores de transcripción con dominio AP2 también ha sido evidenciado en plantas vasculares. Un ejemplo es la *Osmotin promoter binding protein 1* (OPBP1), la cual es un factor de transcripción del tipo AP2/ERF de *Nicotiana tabacum* que se expresa bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. La sobreexpresión de OPBP1 en plantas transgénicas de tabaco da lugar a la acumulación de altos niveles de los genes *PR-1a* y *PR-5d* y muestra un aumento en la resistencia a la infección por los patógenos *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* y además exhiben tolerancia al estrés salino (Guo et al. 2004).

Los resultados obtenidos en todos los ensayos realizados respaldan la observación de que la sobreexpresión de PpAP2 confiere una disminución en la susceptibilidad a patógenos en plantas de *P. patens*. Considerando que PpAP2 es un factor de transcripción que se expresa bajo condiciones de estrés biótico, el mismo podría activar la expresión de diferentes genes de defensa, incluyendo genes que codifican para proteínas con actividad antimicrobiana que podrían interferir con el crecimiento de los hongos, proteínas involucradas en la señalización,

proteínas del tipo PRs, y proteínas involucradas en la defensa frente a patógenos. En este trabajo solo se analizó la expresión de un gen que codifica para la proteína Dirigente (DIR) involucrada en el acoplamiento de monolognoles, no encontrándose un aumento de la expresión en las plantas sobreexpresante PpAP2. Sin embargo, hay estudios en los que la sobreexpresión de un factor de transcripción del tipo AP2/ERF produce un aumento en la resistencia a estrés biótico y abiótico en transformantes de arroz, *Oryza sativa*. Mediante análisis por microarray de plantas sobreexpresantes de este factor de transcripción denominado *OsEREBP1* se observó un aumento en la expresión de genes relacionados al metabolismo lipídico como ser lipasas y lipoxigenasas así como varios genes relacionados con la biosíntesis de jasmonato y ácido abscísico (Jisha et al. 2015).

5.2 Obtención de transformantes de Arabidopsis thaliana

Debido a que *A. thaliana* es un modelo vascular diploide de plantas se buscó obtener transformantes que sobreexpresaran PpAP2. Sin embargo, la sobreexpresión de PpAP2 en esta planta dio lugar a cambios severos en el desarrollo. Además no se logró obtener plantas homocigotas probablemente debido a que estas son letales. El fenotipo de las plantas heterocigotas se caracterizó por ser enano, con un menor crecimiento de la planta, hojas lanceoladas y de bordes acerados. Según se encontró en la literatura hay registros de plantas de *Arabidopsis*, *Glycine max* y plantas de arroz que al sobreexpresar un factor de transcripción del tipo AP2/ERF producen un fenotipo enano como consecuencia de una disminución de la biosíntesis de giberelinas (Magome et al. 2004; Qi et al. 2011; Suo et al. 2012). Sería necesario la utilización de promotores inducibles o probar la suplementación con la hormona giberelina para corroborar lo anterior y estudiar la acción de PpAP2 en *A. thaliana*.

6. Conclusiones

En este trabajo fue posible obtener plantas transgénicas de *P. patens* que sobreexpresaran el gen PpAP2 y analizar su susceptibilidad a patógenos en comparación con plantas salvajes. Se obtuvieron resultados prometedores con dos transformantes haploides, pUBI:PpAP2.2 y pUBI:PpAP2.4, los cuales tienen altos niveles constitutivos de expresión de PpAP2. En estos sobreexpresantes se observó una disminución en la susceptibilidad ante el patógeno *B. cinerea* y se identificó un nuevo patógeno de *P. patens*, *C. gloeosporioides*, frente al cual las plantas que sobreexpresan PpAP2 también son más resistentes en comparación con plantas salvajes. Además, el daño celular generado al aplicar el CF de *P.c. carotovorum* también fue menor en los sobreexpresantes que en plantas salvajes. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de PpAP2 aumenta las defensas de las plantas frente a la infección. Dado que PpAP2 es probablemente un factor de transcripción, el aumento de resistencia se puede deber a un aumento en la expresión de genes involucrados en la defensa los cuales podrían codificar para proteínas con actividad antimicrobiana, proteínas involucradas en la señalización, proteínas involucradas en la síntesis de hormonas de defensa, entre otras.

No fue posible conseguir plantas transformantes viables para ensayo de interacción planta-patógeno de *A. thaliana*. Los transformantes obtenidos presentaron un crecimiento atrofiado evidenciado por un fenotipo enano. La sobreexpresión del gen PpAP2 parece inferir de forma directa en el desarrollo de *A. thaliana* por lo que futuros estudios para elucidar la función de este gen en dicha planta u otras vasculares deberán realizarse bajo el control de un promotor inducible y no constitutivo.

7. Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras se propone generar nuevos transformantes de *P. patens* que expresen el gen PpAP2 fusionado a un gen reportero como la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) para determinar si PpAP2 es de localización nuclear. La localización subcelular también se podría verificar mediante agroinfiltración de hojas de tabaco con dicha construcción.

Además proponemos generar plantas transgénicas de *P. patens* que expresen el gen PpAP2 fusionado al gen reportero que codifica para la β -glucuronidasa (GUS), lo cual permitirá analizar la expresión de PpAP2 en el desarrollo de la planta y en los diferentes tejidos inoculados con patógenos.

A su vez, sería muy interesante comparar el transcriptoma de plantas de *P. patens* salvajes sin tratar o tratadas con agua con plantas tratadas con el hongo *B. cinerea* y las líneas que sobreexpresan PpAP2. Con ello se lograría ver diferencias en la expresión de genes e identificar aquellos cuyo aumento o disminución de expresión se deba a la sobreexpresión de PpAP2. También sería posible identificar nuevos genes vinculados a la defensa de la planta y que explicaran la disminución en la susceptibilidad a patógenos observada en las líneas transformantes que sobreexpresan PpAP2. También proponemos generar un mutante *knockout* para *PpAP2* y analizar su susceptibilidad a patógenos en comparación con plantas salvajes. Se podría además comparar el transcriptoma de este mutante inoculado con *B. cinerea* con el transcriptoma de plantas que sobreexpresan PpAP2 y plantas salvajes inoculadas con el mismo patógeno. Esta aproximación también nos permitirá identificar los genes inducibles por PpAP2.

Por último sería interesante realizar construcciones de sobreexpresión de PpAP2 bajo el control de un promotor inducible, para tratar obtener plantas de *A. thaliana* que no se vean afectadas en el desarrollo y así hacer estudios de susceptibilidad e interacción planta-patógeno en un modelo de planta vascular.

8. Referencias bibliográficas

- Adie, Bruce a. T., Pérez-Pérez, Julián, Pérez-Pérez, Manuel M., Godoy, Marta, Sánchez-Serrano, José-J., Schmelz, Eric A., and Solano, Roberto. (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.
- Ahmad, Parvaiz, Ashraf, Muhammad, Younis, Muhammad, Hu, Xiangyang, Kumar, Ashwani, Akram, Nudrat Aisha, and Al-Qurainy, F. (2012). *Role of Transgenic Plants in Agriculture and Biopharming*. *Biotechnology advances* **30**(3): 524–540.
- Alan, a. R., Blowers, a., and Earle, E. D. (2004). *Expression of a Magainin-Type Antimicrobial Peptide Gene (MSI-99) in Tomato Enhances Resistance to Bacterial Speck Disease*. *Plant Cell Reports* **22**(6): 388–396.
- Allen, Mark D., Yamasaki, Kazuhiko, Ohme-Takagi, Masaru, Tateno, Masaru, and Suzuki, Masashi. (1998). *A Novel Mode of DNA Recognition by a Beta-Sheet Revealed by the Solution Structure of the GCC-Box Binding Domain in Complex with DNA*. *The EMBO Journal* **17**(18): 5484–5496.
- Anterola, Aldwin, Shanle, Erin, Perroud, Pierre-François, and Quatrano, Ralph. (2009). *Production of Taxa-4(5),11(12)-Diene by Transgenic Physcomitrella Patens*. *Transgenic research* **18**(4): 655–660.
- Asai, Tsuneaki, Tena, Guillaume, Plotnikova, Joulia, Willmann, Matthew R, Chiu, Wan-Ling, Gomez-Gomez, Lourdes, Boller, Thomas, Ausubel, Frederick M, and Sheen, Jen. (2002). *MAP Kinase Signalling Cascade in Arabidopsis Innate Immunity*. *Nature* **415**(6875): 977–983.
- Ashton, N. W., and Cove, D. J. (1977). *Isolation and Preliminary Characterization of Auxotrophic and Analog Resistant Mutants of Moss, Physcomitrella Patens*. *Molecular & General Genetics* **154**: 87–95.
- Asselbergh, Bob, De Vleeschauwer, David, and Höfte, Monica. (2008). *Global Switches and Fine-Tuning-ABA Modulates Plant Pathogen Defense*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : *MPMI* **21**(6): 709–719.
- Ausubel, Frederick M. (2005). *Are Innate Immune Signaling Pathways in Plants and Animals Conserved?* *Nature immunology* **6**(10): 973–979.
- Axtell, Michael J., and Staskawicz, Brian J. (2003). *Initiation of RPS2-Specified Disease Resistance in Arabidopsis Is Coupled to the AvrRpt2-Directed Elimination of RIN4*. *Cell* **112**(3): 369–377.
- Baker, C. Jacyn, and Orlandi, Elizabeth W. (1995). *ACTIVE OXYGEN IN PLANT PATHOGENESIS*. *Annual Review of Phytopathology* **33**: 299–321.

- Bestwick, Charles S., Brown, Ian R., Bennett, Mark H. R., and Mansfield, John W. (1997). *Localization of Hydrogen Peroxide Accumulation during the Hypersensitive Reaction of Lettuce Cells to Pseudomonas Syringae Pv Phaseolicola*. *The Plant cell* **9**: 209–221.
- Boller, Thomas, and Felix, Georg. (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.
- Bolwell, G Paul, Butt, Vernon S, Davies, Dewi R, and Zimmerlin, Alfred. (1995). *THE ORIGIN OF THE OXIDATIVE BURST IN PLANTS*. *Free Radical Research* **23**(6): 517–532.
- Bonas, Ulla, and Lahaye, Thomas. (2002). *Plant Disease Resistance Triggered by Pathogen-Derived Molecules: Refined Models of Specific Recognition*. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 44–50.
- Boudsocq, Marie, Willmann, Matthew R, McCormack, Matthew, Lee, Horim, Shan, Libo, He, Ping, Bush, Jenifer, Cheng, Shu-Hua, and Sheen, Jen. (2010). *Differential Innate Immune Signalling via Ca(2+) Sensor Protein Kinases*. *Nature* **464**(7287): 418–422.
- Bradley, Desmond J., Kjellbom, Per, and Lamb, Christopher. J. (1992). *Elicitor- and Wound-Induced Oxidative Cross-Linking of a Proline-Rich Plant Cell Wall Protein: A Novel, Rapid Defense Response*. *Cell* **70**: 21–30.
- Brisson, Louise F., Tenhaken, Raimund, and Lamb, Chris. (1994). *Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance*. *The Plant Cell* **6**: 1703–1712.
- Catanzariti, Ann-Maree, Dodds, Peter N, Lawrence, Gregory J, Ayliffe, Michael a, and Ellis, Jeffrey G. (2006). *Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors*. *The Plant Cell* **18**(1): 243–256.
- Catanzariti, Ann-Maree, Dodds, Peter N, Ve, Thomas, Kobe, Bostjan, Ellis, Jeffrey G, and Staskawicz, Brian J. (2010). *The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structured C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **23**(1): 49–57.
- Chakravarthy, Suma, Velásquez, André C., Ekengren, Sophia K., Collmer, Alan, and Martin, Gregory B. (2010). *Identification of Nicotiana Benthamiana Genes Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : *MPMI* **23**(6): 715–726.
- Chanda, Bidisha, Xia, Ye, Mandal, Mihir Kumar, Yu, Keshun, Sekine, Ken- Taro, Gao, Qingming, Selote, Devarshi, Hu, Yanling, Stromberg, Arnold, Navarre, Duroy, Kachroo, Aardra, and Kachroo, Pradeep. (2011). *Glycerol-3-Phosphate Is a Critical Mobile Inducer of Systemic Immunity in Plants*. *Nature Genetics* **43**: 421–427.
- Chinchilla, Delphine, Zipfel, Cyril, Robatzek, Silke, Kemmerling, Birgit, Nürnberger, Thorsten, Jones, Jonathan D G, Felix, Georg, and Boller, Thomas. (2007). *A Flagellin-Induced Complex of the Receptor FLS2 and BAK1 Initiates Plant Defence*. *Nature* **448**(7152): 497–500.

- Chisholm, Stephen T., Coaker, Gitta, Day, Brad, and Staskawicz, Brian J. (2006). *Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response*. *Cell* **124**(4): 803–814.
- Cho, Sung Hyun, Hoang, Quoc Truong, Phee, Jeong Won, Kim, Yun Young, and Shin, Hyun Young. (2007). *Modified Suppression Subtractive Hybridization Identifies an AP2-Containing Protein Involved in Metal Responses in *Physcomitrella Patens**. *Molecules and Cells* **23**(1): 100–107.
- Clough, Steven J., and Bent, Andrew F. (1998). *Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of *Arabidopsis Thaliana**. *The Plant Journal* **16**(6): 735–743.
- Collier, Sarah M., and Moffett, Peter. (2009). *NB-LRRs Work a “Bait and Switch” on Pathogens*. *Trends in Plant Science* **14**(10): 521–529.
- Coram, Tristan E., Wang, Meinan, and Chen, Xianming. (2008). *Transcriptome Analysis of the Wheat-Puccinia Striiformis F. Sp. Tritici Interaction*. *Molecular Plant Pathology* **9**(2): 157–169.
- Cove, David J., Knight, Celia D., and Lamparter, Tilman. (1997). *Mosses as Model Systems*. *Trends in Plant Science* **2**(3): 99–105.
- Cunnac, Sébastien, Lindeberg, Magdalen, and Collmer, Alan. (2009). *Pseudomonas Syringae Type III Secretion System Effectors: Repertoires in Search of Functions*. *Current Opinion in Microbiology* **12**(1): 53–60.
- Dangl, J L, and Jones, J D. (2001). *Plant Pathogens and Integrated Defence Responses to Infection*. *Nature* **411**(6839): 826–833.
- Dangl, Jeffery L., Dietrich, Robert A., and Richberg, Michael H. (1996). *Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions*. *The Plant Cell* **8**: 1793–1807.
- Davin, Laurence B., and Lewis, Norman G. (2000). *Dirigent Proteins and Dirigent Sites Explain the Mystery of Specificity of Radical Precursor Coupling in Lignan and Lignin Biosynthesis*. *Plant Physiology* **123**: 453–461.
- Diatchenko, Luda, Laut, Yun-fai Chris, Campbellt, Aaron P, Chenchik, Alex, Moqadam, Fauzia, Huang, Betty, Lukyanovt, Sergey, Lukyanovt, Konstantin, Gurskayat, Nadya, Sverdlov, Eugene D., and Siebert, Paul D. (1996). *Suppression Subtractive Hybridization: A Method for Generating Differentially Regulated or Tissue-Specific cDNA Probes and Libraries*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 6025–6030.
- Dixon, Richard A., and Paiva, Nancy L. (1995). *Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism*. *The Plant Cell* **7**: 1085–1097.
- Dodds, Peter N, Lawrence, Gregory J, Catanzariti, Ann-Maree, Ayliffe, Michael a, and Ellis, Jeffrey G. (2004). *The Melampsora Lini AvrL567 Avirulence Genes Are Expressed in*

- Haustoria and Their Products Are Recognized Inside Plant Cells*. *The Plant Cell* **16**(3): 755–768.
- Dodds, Peter N, Lawrence, Gregory J, Catanzariti, Ann-Maree, Teh, Trazel, Wang, Ching-I a, Ayliffe, Michael a, Kobe, Bostjan, and Ellis, Jeffrey G. (2006). *Direct Protein Interaction Underlies Gene-for-Gene Specificity and Coevolution of the Flax Resistance Genes and Flax Rust Avirulence Genes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(23): 8888–8893.
- Dodds, Peter N, and Rathjen, John P. (2010). *Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant-Pathogen Interactions*. *Nature reviews. Genetics* **11**(8): 539–548.
- Doke, N. (1983a). *Generation of Superoxide Anion by Potato Tuber Protoplasts during the Hypersensitive Response to Hyphal Wall Components of Phytophthora Infestans and Specific Inhibition of the Reaction by Suppressors of Hypersensitivity*. *Physiological Plant Pathology* **23**: 359–367.
- . (1983b). *Involvement of Superoxide Anion Generation in the Hypersensitive Response of Potato Tuber Tissues to Infection with an Incompatible Race of Phytophthora Infestans and to the Hyphal Wall Components*. *Physiological Plant Pathology* **23**: 345–357.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H.-J., Noritake, T., Yoshioka, H., and Kawakita, K. (1996). *The Oxidative Burst Protects Plants against Pathogen Attack: Mechanism and Role as an Emergency Signal for Plant Bio-Defence - a Review*. *Gene* **179**: 45–51.
- Doke, N., and Ohashi, Y. (1988). *Involvement of an O₂⁻ Generating System in the Induction of Necrotic Lesions on Tobacco Leaves Infected with Tobacco Mosaic Virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **32**: 163–175.
- Dong, Xinnian. (2004). *NPRI, All Things Considered*. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(5): 547–552.
- Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). *Systemic Acquired Resistance*. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185–209.
- Engelhardt, Stefan, Lee, Justin, Gäbler, Yvonne, Kemmerling, Birgit, Haapalainen, Minna Liisa, Li, Chun Mei, Wei, Zhongmin, Keller, Harald, Joosten, Matthieu, Taira, Suvi, and Nürnberger, Thorsten. (2009). *Separable Roles of the Pseudomonas Syringae Pv. Phaseolicola Accessory Protein HrpZ1 in Ion-Conducting Pore Formation and Activation of Plant Immunity*. *The Plant Journal* **57**(4): 706–717.
- Epple, Petra, Apel, Klaus, and Bohlmann, Holger. (1995). *An Arabidopsis Thaliana Thionin Gene Is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins*. *Plant physiology* **109**: 813–820.
- Erbs, Gitte, Silipo, Alba, Aslam, Shazia, De Castro, Cristina, Liparoti, Valeria, Flagiello, Angela, Pucci, Pietro, Lanzetta, Rosa, Parrilli, Michelangelo, Molinaro, Antonio, Newman, Mari Anne, and Cooper, Richard M. (2008). *Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens Agrobacterium and Xanthomonas Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity*. *Chemistry and Biology* **15**(5): 438–448.

- Eulgem, Thomas, Rushton, Paul J., Robatzek, Silke, and Somssich, Imre E. (2000). *The WRKY Superfamily of Plant Transcription Factors*. *Trends in Plant Science* **5**(5): 199–206.
- Featherstone, Denis R., Cove, David J., and Ashton, Neil W. (1990). *Genetic Analysis by Somatic Hybridization of Cytokinin Overproducing Developmental Mutants of the Moss, Physcomitrella Patens*. *Molecular And General Genetics* **222**: 217–224.
- Felix, Georg, and Boller, Thomas. (2003). *Molecular Sensing of Bacteria in Plants: The Highly Conserved RNA-Binding Motif RNP-1 of Bacterial Cold Shock Proteins Is Recognized as an Elicitor Signal in Tobacco*. *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 6201–6208.
- Feussner, Ivo, and Wasternack, Claus. (2002). *The Lipoxygenase Pathway*. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 275–297.
- Fu, Zheng Qing, and Dong, Xinnian. (2013). *Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense*. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 839–863.
- Fukao, Takeshi, Yeung, Elaine, and Bailey-Serres, Julia. (2011). *The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice*. *The Plant Cell* **23**: 412–427.
- Glazebrook, Jane. (2005). *Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens*. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Grant, Sarah R, Fisher, Emily J, Chang, Jeff H, Mole, Beth M, and Dangl, Jeffery L. (2006). *Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria*. *Annual Review of Microbiology* **60**(June): 425–449.
- Green, Rachel, and Fluhr, Robert. (1995). *UV-B-Induced PR-1 Accumulation Is Mediated by Active Oxygen Species*. *The Plant Cell* **7**: 203–212.
- Grefen, Christopher, Donald, Naomi, Hashimoto, Kenji, Kudla, Jörg, Schumacher, Karin, and Blatt, Michael R. (2010). *A Ubiquitin-10 Promoter-Based Vector Set for Fluorescent Protein Tagging Facilitates Temporal Stability and Native Protein Distribution in Transient and Stable Expression Studies*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **64**(2): 355–365.
- Guo, Ze Jian, Chen, Xu Jun, Wu, Xue Long, Ling, Jian Qun, and Xu, Ping. (2004). *Overexpression of the AP2/EREBP Transcription Factor OPBP1 Enhances Disease Resistance and Salt Tolerance in Tobacco*. *Plant Molecular Biology* **55**: 607–618.
- Gust, Andrea a., Biswas, Raja, Lenz, Heike D., Rauhut, Thomas, Ranf, Stefanie, Kemmerling, Birgit, Götz, Friedrich, Glawischnig, Erich, Lee, Justin, Felix, Georg, and Nürnberger, Thorsten. (2007). *Bacteria-Derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-Associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**(44): 32338–32348.
- Halim, Vincentius A., Eschen-Lippold, Lennart, Altmann, Simone, Birschwilks, Mandy, Scheel, Dierk, and Rosahl, Sabine. (2007). *Salicylic Acid Is Important for Basal Defense*

- of Solanum Tuberosum Against Phytophthora Infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI **20**(11): 1346–52.
- Hall, Thomas A. (1999). 41 Nucleic Acids Symposium Series *BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT*. <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.
- Heese, Antje, Hann, Dagmar R, Gimenez-Ibanez, Selena, Jones, Alexandra M E, He, Kai, Li, Jia, Schroeder, Julian I, Peck, Scott C, and Rathjen, John P. (2007). *The Receptor-like Kinase SERK3/BAK1 Is a Central Regulator of Innate Immunity in Plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(29): 12217–12222.
- Van der Hoorn, Renier a L, and Kamoun, Sophien. (2008). *From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors*. *The Plant Cell* **20**(8): 2009–2017.
- Ishikawa, M., Murata, T., Sato, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Imai, A., Kimura, M., Sugimoto, N., Akita, A., Oguri, Y., Friedman, W. E., Hasebe, M., and Kubo, M. (2011). *Physcomitrella Cyclin-Dependent Kinase A Links Cell Cycle Reactivation to Other Cellular Changes during Reprogramming of Leaf Cells*. *The Plant Cell* **23**: 2924–2938.
- Jaglo-Ottosen, Kristen R., Gilmour, Sarah J., Zarka, Daniel G., Schabenberger, Oliver, and Thomashow, Michael F. (1998). *Arabidopsis CBF1 Overexpression Induces COR Genes and Enhances Freezing Tolerance*. *Science* **280**: 104–106.
- Jia, Y, McAdams, S a, Bryan, G T, Hershey, H P, and Valent, B. (2000). *Direct Interaction of Resistance Gene and Avirulence Gene Products Confers Rice Blast Resistance*. *The EMBO Journal* **19**(15): 4004–4014.
- Jisha, V., Dampanaboina, Lavanya, Vadassery, Jyothilakshmi, Mithöfer, Axel, Kappara, Saivishnupriya, and Ramanan, Rajeshwari. (2015). *Overexpression of an AP2/ERF Type Transcription Factor OsEREBP1 Confers Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice*. *Plos One* **10**(6): e0127831. DOI:10.1371/journal.pone.0127831. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127831>.
- Jones, Jonathan D. G., and Dangl, Jeffery L. (2006). *The Plant Immune System*. *Nature* **444**: 323–329.
- Jong, Tae Song, Lu, Hua, McDowell, John M., and Greenberg, Jean T. (2004). *A Key Role for ALD1 in Activation of Local and Systemic Defenses in Arabidopsis*. *The Plant Journal* **40**: 200–212.
- Jung, H. W, Tschaplinski, T. J, Wang, L, Glazebrook, J, and Greenberg, J. T. (2009). *Priming in Systemic Plant Immunity*. *Science* **324**: 89–91.
- Kamisugi, Yasuko, Schlink, Katja, Rensing, Stefan A., Schween, Gabriele, von Stackelberg, Mark, Cuming, Andrew C., Reski, Ralf, and Cove, David J. (2006). *The Mechanism of Gene Targeting in Physcomitrella Patens: Homologous Recombination, Concatenation and Multiple Integration*. *Nucleic Acids Research* **34**(21): 6205–6214.

- Kasuga, Mie, Liu, Qiang, Miura, Setsuko, Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko, and Shinozaki, Kazuo. (1999). *Improving Plant Drought, Salt, and Freezing Tolerance by Gene Transfer of a Single Stress-Inducible Transcription Factor*. *Nature Biotechnology* **17**: 287–291.
- Katsir, Leron, Chung, Hoo Sun, Koo, Abraham J. K., and Howe, Gregg A. (2008). *Jasmonate Signaling: A Conserved Mechanism of Hormone Sensing*. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 428–435.
- Kendrick, Mandy D., and Chang, Caren. (2008). *Ethylene Signaling: New Levels of Complexity and Regulation*. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 479–485.
- Kuc, Joseph. (1987). *Translocated Signals for Plant Immunization*. *Annals New York Academy of Sciences*: 221–223.
- Kvitko, Brian H., Park, Duck Hwan, Velásquez, André C., Wei, Chia Fong, Russell, Alistair B., Martin, Gregory B., Schneider, David J., and Collmer, Alan. (2009). *Deletions in the Repertoire of Pseudomonas Syringae Pv. Tomato DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors*. *PLoS Pathogens* **5**(4): e1000388. doi:10.1371/journal.ppat.1000388.
- Lehti-Shiu, Melissa D, Zou, Cheng, Hanada, Kousuke, and Shiu, Shin-Han. (2009). *Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-like Kinase/pelle Genes*. *Plant Physiology* **150**(1): 12–26.
- Leslie, Charles A., and Romani, Roger J. (1988). *Inhibition of Ethylene Biosynthesis by Salicylic Acid*. *Plant Physiology* **88**: 833–837.
- Levine, Alex, Tenhaken, Raimund, Dixon, Richard, and Lamb, Chris. (1994). *H2O2 from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response*. *Cell* **79**: 583–593.
- Li, Zhuofu, Zhang, Lixia, Yu, Yanwen, Quan, Ruidang, Zhang, Zhijin, Zhang, Haiwen, and Huang, Rongfeng. (2011). *The Ethylene Response Factor AtERF11 That Is Transcriptionally Modulated by the bZIP Transcription Factor HY5 Is a Crucial Repressor for Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis*. *The Plant Journal* **68**: 88–99.
- Licausi, Francesco, Giorgi, Federico M., Zenoni, Sara, Osti, Fabio, Pezzotti, Mario, and Perata, Pierdomenico. (2010). *Genomic and Transcriptomic Analysis of the AP2/ERF Superfamily in Vitis Vinifera*. *BMC Genomics* **11**: 719. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/719> (May 7, 2015).
- Licausi, Francesco, Ohme-Takagi, Masaru, and Perata, Pierdomenico. (2013). *APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) Transcription Factors: Mediators of Stress Responses and Developmental Programs*. *New Phytologist* **199**: 639–649.
- Liu, Qiang, Kasuga, Mie, Sakuma, Yoh, Abe, Hiroshi, Miura, Setsuko, and Yamaguchi-shinozaki, Kazuko. (1998). *Two Transcription Factors , DREB1 and DREB2 , with an EREBP / AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression , Respectively , in Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: 1391–1406.

- Loake, Gary, and Grant, Murray. (2007). *Salicylic Acid in Plant Defence-the Players and Protagonists*. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 466–472.
- Lorenzo, Oscar, and Solano, Roberto. (2005). *Molecular Players Regulating the Jasmonate Signalling Network*. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 532–540.
- Low, Ps, and Merida, Jr. (1996). *The Oxidative Burst in Plant Defense: Function and Signal Transduction*. *Physiologia Plantarum* **96**(3): 533–542. http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=16&SID=Y1H9nk19OhdoJNlJB8f&page=1&doc=7.
- Lucena, Miguel A, Valpuesta, Victoriano, Romero-aranda, Remedios, Mercado, Jose A, and Quesada, Miguel A. (2003). *Structural and Physiological Changes in the Roots of Tomato Plants over-Expressing a Basic Peroxidase*. *Physiologia Plantarum* **118**: 422–429.
- Machado, Lucina, Castro, Alexandra, Hamberg, Mats, Bannenberg, Gerard, Gaggero, Carina, Castresana, Carmen, and de León, Inés Ponce. (2015). *The Physcomitrella Patens Unique Alpha-Dioxygenase Participates in Both Developmental Processes and Defense Responses*. *BMC plant biology* **15**: 45. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4334559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 7, 2015).
- Mackey, David, Belkhadir, Youssef, Alonso, Jose M., Ecker, Joseph R., and Dangl, Jeffery L. (2003). *Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance*. *Cell* **112**(3): 379–389.
- Magome, Hiroshi, Yamaguchi, Shinjiro, Hanada, Atsushi, Kamiya, Yuji, and Oda, Kenji. (2004). *Dwarf and Delayed-Flowering 1, a Novel Arabidopsis Mutant Deficient in Gibberellin Biosynthesis because of Overexpression of a Putative AP2 Transcription Factor*. *The Plant Journal* **37**: 720–729.
- Malamy, J, Carr, J. P, Klessig, D. F, and Raskin, I. (1990). *Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection*. *Science* **250**: 1002–1004.
- Martinez-trujillo, Miguel, Limones-briones, Veronica, Cabrera-ponce, José Luis, and Herrera-estrella, Luis. (2004). *Improving Transformation Efficiency of Arabidopsis Thaliana by Modifying the Floral Dip Method*. *International Society for Plant Molecular Biology* **22**(March): 63–70.
- Mauch-Mani, Brigitte, and Mauch, Felix. (2005). *The Role of Abscisic Acid in Plant-Pathogen Interactions*. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 409–414.
- Métraux, J. P, Signer, H, Ryals, J, Ward, E, Wyss-Benz, M, Gaudin, J, Raschdorf, K, Schmid, E, Blum, W, and Inverardi, B. (1990). *Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber*. *Science* **250**: 1004–1006.
- Meziane, Hamid, Van Der Sluis, Ientse, Van Loon, Leendert C., Höfte, Monica, and Bakker, Peter A H M. (2005). *Determinants of Pseudomonas Putida WCS358 Involved in Inducing Systemic Resistance in Plants*. *Molecular Plant Pathology* **6**(2): 177–185.

- Mito, Tomomi, Seki, Motoaki, Shinozaki, Kazuo, Ohme-Takagi, Masaru, and Matsui, Kyoko. (2011). *Generation of Chimeric Repressors That Confer Salt Tolerance in Arabidopsis and Rice*. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 736–746.
- Miya, Ayako, Albert, Premkumar, Shinya, Tomonori, Desaki, Yoshitake, Ichimura, Kazuya, Shirasu, Ken, Narusaka, Yoshihiro, Kawakami, Naoto, Kaku, Hanae, and Shibuya, Naoto. (2007). *CERK1, a LysM Receptor Kinase, Is Essential for Chitin Elicitor Signaling in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(49): 19613–19618.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Nakano, Toshitsugu, Suzuki, Kaoru, Fujimura, Tatsuhito, and Shinshi, Hideaki. (2006). *Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice*. *Plant Physiology* **140**: 411–432.
- Nakashita, Hideo, Yasuda, Michiko, Nitta, Takako, Asami, Tadao, Fujioka, Shozo, Arai, Yuko, Sekimata, Katsuhiko, Takatsuto, Suguru, Yamaguchi, Isamu, and Yoshida, Shigeo. (2003). *Brassinosteroid Functions in a Broad Range of Disease Resistance in Tobacco and Rice*. *The Plant Journal* **33**: 887–898.
- Navarro, Lionel, Bari, Rajendra, Achard, Patrick, Lisón, Purificación, Nemri, Adnane, Harberd, Nicholas P., and Jones, Jonathan D. G. (2008). *DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling*. *Current Biology* **18**(9): 650–655.
- Navarro, Lionel, Dunoyer, Patrice, Jay, Florence, Arnold, Benedict, Dharmasiri, Nihal, Estelle, Mark, Voinnet, Olivier, and Jones, Jonathan D. G. (2006). *A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling*. *Science* **312**: 436–439.
- Newman, Mari-Anne, Dow, J Maxwell, Molinaro, Antonio, and Parrilli, Michelangelo. (2007). *Priming, Induction and Modulation of Plant Defence Responses by Bacterial Lipopolysaccharides*. *Journal of Endotoxin Research* **13**(2): 69–84.
- Nicaise, Valerie, Roux, Milena, and Zipfel, Cyril. (2009). *Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm*. *Plant Physiology* **150**(4): 1638–1647.
- Norman-Setterblad, Cecilia, Vidal, Sabina, and Tapio Palva, E. (2000). *Interacting Signal Pathways Control Defense Gene Expression in Arabidopsis in Response to Cell Wall-Degrading Enzymes from Erwinia Carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **13**(4): 430–438.
- Ohme-Takagi, Masaru, and Shinshi, Hideaki. (1995). *Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element*. *The Plant Cell* **7**: 173–182.
- Ohta, Masaru, Ohme-Takagi, Masaru, and Shinshi, Hideaki. (2000). *Three Ethylene-Responsive Transcription Factors in Tobacco with Distinct Transactivation Functions*. *Plant Journal* **22**(1): 29–38.

- Oliver, Juan Pablo, Castro, Alexandra, Gaggero, Carina, Cascón, Tomas, Schmelz, Eric A., Castresana, Carmen, and Ponce de León, Inés. (2009). *Pythium Infection Activates Conserved Plant Defense Responses in Mosses*. *Planta* **230**: 569–579.
- Van Oosten, Vivian R., Bodenhausen, Natacha, Reymond, Philippe, Van Pelt, Johan A., Van Loon, L. C., Dicke, Marcel, and Pieterse, Corné M. J. (2008). *Differential Effectiveness of Microbially Induced Resistance Against Herbivorous Insects in Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **21**(7): 919–930.
- Pajerowska-Mukhtar, Karolina M., Wang, Wei, Tada, Yasuomi, Oka, Nodoka, Tucker, Chandra L., Fonseca, Jose Pedro, and Dong, Xinnian. (2012). *The HSF-like Transcription Factor TBF1 Is a Major Molecular Switch for Plant Growth-to-Defense Transition*. *Current Biology* **22**(2): 103–112.
- Park, S-W, Kaimoyo, E, Kumar, D, Mosher, S, and Klessig, D. F. (2007). 318 *Science Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance*. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1147113>.
- Peng, M., and Kuc, J. (1992). 82 *Phytopathology Peroxidase-Generated Hydrogen Peroxide as a Source of Antifungal Activity In Vitro and on Tobacco Leaf Disks*.
- Penninckx, Iris A. M. A., Eggermont, Kristel, Terras, Franki R., Thomma, Bart P. H. J., De Samblanx, Genoveva W., Buchala, Anthony, Métraux, Jean-Pierre, Manners, John M., and Broekaert, Willem F. (1996). *Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway*. *The Plant Cell* **8**: 2309–2323.
- Pieterse, C. M J, and Van Loon, L. C. (2004). *NPR1: The Spider in the Web of Induced Resistance Signaling Pathways*. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 456–464.
- Pieterse, Corné M. J., Leon-Reyes, Antonio, Van der Ent, Sjoerd, and Van Wees, Saskia C. M. (2009). *Networking by Small-Molecule Hormones in Plant Immunity*. *Nature Chemical Biology* **5**(5): 308–316.
- Pitzschke, Andrea, Schikora, Adam, and Hirt, Heribert. (2009). *MAPK Cascade Signalling Networks in Plant Defence*. *Current Opinion in Plant Biology* **12**(4): 421–426.
- Ponce de León, Inés, Hamberg, Mats, and Castresana, Carmen. (2015). *Oxylipins in Moss Development and Defense*. *Frontiers in Plant Science* **6**(483): doi: 10.3389/fpls.2015.00483 Oxylipins.
- Ponce de León, Inés, Oliver, Juan Pablo, Castro, Alexandra, Gaggero, Carina, Bentancor, Marcel, and Vidal, Sabina. (2007). *Erwinia Carotovora Elicitors and Botrytis Cinerea Activate Defense Responses in Physcomitrella Patens*. *BMC Plant Biology* **7**(52).
- Ponce de León, Inés, Schmelz, Eric A, Gaggero, Carina, Castro, Alexandra, Álvarez, Alfonso, and Montesano, Marcos. (2012). *Physcomitrella Patens Activates Reinforcement of the Cell Wall, Programmed Cell Death and Accumulation of Evolutionary Conserved Defence Signals, such as Salicylic Acid and 12-Oxo-Phytodienoic Acid, but Not Jasmonic Acid, upon Botrytis Cinerea Infection*. *Molecular Plant Pathology* **13**(8): 960–974.

- Pré, Martial, Atallah, Mirna, Champion, Antony, De Vos, Martin, Pieterse, Corné M. J., and Memelink, Johan. (2008). *The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense*. *Plant Physiology* **147**: 1347–1357.
- Prigge, Michael J., and Bezanilla, Magdalena. (2010). *Evolutionary Crossroads in Developmental Biology: Physcomitrella Patens*. *Development (Cambridge, England)* **137**(21): 3535–3543.
- Qi, Weiwei, Sun, Fan, Wang, Qianjie, Chen, Mingluan, Huang, Yunqing, Feng, Yu-Qi, Luo, Xiaojin, and Yang, Jinshui. (2011). *Rice Ethylene-Response AP2/ERF Factor OsEATB Restricts Internode Elongation by Down-Regulating a Gibberellin Biosynthetic Gene*. *Plant Physiology* **157**: 216–228.
- Qutob, Dinah, Kemmerling, Birgit, Brunner, Frédéric, Küfner, Isabell, Engelhardt, Stefan, Gust, Andrea a, Luberacki, Borries, Seitz, Hanns Ulrich, Stahl, Dietmar, Rauhut, Thomas, Glawischnig, Erich, Schween, Gabriele, Lacombe, Benoit, Watanabe, Naohide, Lam, Eric, Schlichting, Rita, Scheel, Dierk, Nau, Katja, Dodt, Gabriele, Hubert, David, Gijzen, Mark, and Nürnberger, Thorsten. (2006). *Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins*. *The Plant Cell* **18**(12): 3721–3744.
- Rantakari, A, Virtaharju, O, Vähämiko, S, Taira, S, Palva, E T, Saarilahti, H T, and Romantschuk, M. (2001). *Type III Secretion Contributes to the Pathogenesis of the Soft-Rot Pathogen Erwinia Carotovora: Partial Characterization of the Hrp Gene Cluster*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **14**(8): 962–68.
- Reboledo, Guillermo, del Campo, Raquel, Alvarez, Alfonso, Montesano, Marcos, Mara, Héctor, and Ponce De León, Inés. (2015). *Physcomitrella Patens Activates Defense Responses against the Pathogen Colletotrichum Gloeosporioides*. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: doi:10.3390/ijms160x000x.
- Rensing, Stefan A., Lang, Daniel, Zimmer, Andreas D., Terry, Astrid, Salamov, Asaf, Shapiro, Harris, Nishiyama, Tomoaki, Perroud, Pierre-François, Lindquist, Erika A., Kamisugi, Yasuko, Tanahashi, Takako, Sakakibara, Keiko, Fujita, Tomomichi, Oishi, Kazuko, Shin-I, Tadasu, Kuroki, Yoko, Toyoda, Atsushi, Suzuki, Yutaka, Hashimoto, Shin-Ichi, Yamaguchi, Kazuo, Sugano, Sumio, Kohara, Yuji, Fujiyama, Asao, Anterola, Aldwin, Aoki, Setsuyuki, Ashton, Neil, Barbazuk, W Brad, Barker, Elizabeth, Bennetzen, Jeffrey L., Blankenship, Robert, Cho, Sung Hyun, Dutcher, Susan K., Estelle, Mark, Fawcett, Jeffrey A., Gundlach, Heidrun, Hanada, Kousuke, Heyl, Alexander, Hicks, Karen A., Hughes, Jon, Lohr, Martin, Mayer, Klaus, Melkozernov, Alexander, Murata, Takashi, Nelson, David R., Pils, Birgit, Prigge, Michael, Reiss, Bernd, Renner, Tanya, Rombauts, Stephane, Rushton, Paul J., Sanderfoot, Anton, Schween, Gabriele, Shiu, Shin-Han, Stueber, Kurt, Theodoulou, Frederica L., Tu, Hank, Van de Peer, Yves, Verrier, Paul J., Waters, Elizabeth, Wood, Andrew, Yang, Lixing, Cove, David, Cuming, Andrew C., Hasebe, Mitsuyasu, Lucas, Susan, Mishler, Brent D., Reski, Ralf, Grigoriev, Igor V., Quatrano, Ralph S., and Boore, Jeffrey L. (2008). *The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants*. *Science* **319**: 64–69.
- Rushton, P J, Torres, J T, Parniske, M, Wernert, P, Hahlbrock, K, and Somssich, I E. (1996). *Interaction of Elicitor-Induced DNA-Binding Proteins with Elicitor Response Elements in the Promoters of Parsley PR1 Genes*. *The EMBO Journal* **15**(20): 5690–5700.

- Sakuma, Yoh, Liu, Qiang, Dubouzet, Joseph G., Abe, Hiroshi, Shinozaki, Kazuo, and Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko. (2002). *DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of Arabidopsis DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**(3): 998–1009.
- Schaefer, D, Zyrd, J -P, Knight, C D, and Cove, D J. (1991). *Stable Transformation of the Moss Physcomitrella Patens*. *Molecular & General Genetics* **226**: 418–424.
- Schaefer, Didier G, and Zrýd, Jean-Pierre. (1997). *Efficient Gene Targeting in the Moss Physcomitrella Patens*. *The Plant Journal* **11**(6): 1195–1206.
- Schaefer, Didier G. (2002). *A New Moss Genetics: Targeted Mutagenesis in Physcomitrella Patens*. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 477–501.
- Schaefer, Didier G., Zrýd, Jean-pierre, Zry, Jean-pierre, and Zrýd, Jean-pierre. (2001). *The Moss Physcomitrella Patens , Now and Then*. *Plant Physiology* **127**: 1430–1438.
- Schulze, Birgit, Mentzel, Tobias, Jehle, Anna K., Mueller, Katharina, Beeler, Seraina, Boller, Thomas, Felix, Georg, and Chinchilla, Delphine. (2010). *Rapid Heteromerization and Phosphorylation of Ligand-Activated Plant Transmembrane Receptors and Their Associated Kinase BAK1*. *Journal of Biological Chemistry* **285**(13): 9444–9451.
- Schween, Gabriele, Schulte, Julia, Reski, Ralf, and Hohe, Annette. (2005). *Effect of Ploidy Level on Growth, Differentiation, and Morphology in Physcomitrella Patens*. *The Bryologist* **108**(1): 27–35.
- Schwessinger, Benjamin, and Zipfel, Cyril. (2008). *News from the Frontline: Recent Insights into PAMP-Triggered Immunity in Plants*. *Current Opinion in Plant Biology* **11**(4): 389–395.
- Seo, Yean Joo, Park, Jong Beum, Cho, Yeon Jeong, Jung, Choonkyun, Seo, Hak Soo, Park, Soon Ki, Nahm, Baek Hie, and Song, Jong Tae. (2010). *Overexpression of the Ethylene-Responsive Factor Gene BrERF4 from Brassica Rapa Increases Tolerance to Salt and Drought in Arabidopsis Plants*. *Molecules and Cells* **30**: 271–277.
- Shaikhali, Jehad, Heiber, Isabelle, Seidel, Thorsten, Ströher, Elke, Hiltcher, Heiko, Birkmann, Stefan, Dietz, Karl-Josef, and Baier, Margarete. (2008). *The Redox-Sensitive Transcription Factor Rap2.4a Controls Nuclear Expression of 2-Cys Peroxiredoxin A and Other Chloroplast Antioxidant Enzymes*. *BMC Plant Biology* **8**: 48.
- Shan, Libo, He, Ping, Li, Jianming, Heese, Antje, Peck, Scott C., Nürnberger, Thorsten, Martin, Gregory B., and Sheen, Jen. (2008). *Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity*. *Cell Host and Microbe* **4**: 17–27.
- Shigyo, Mikao, and Ito, Motomi. (2004). *Analysis of Gymnosperm Two-AP2-Domain-Containing Genes*. *Development Genes and Evolution* **214**: 105–114.

- Siemens, Johannes, Keller, Ingo, Sarx, Johannes, Kunz, Sabine, Schuller, Astrid, Nagel, Wolfgang, Schmülling, Thomas, Parniske, Martin, and Ludwig-Müller, Jutta. (2006). *Transcriptome Analysis of Arabidopsis Clubroots Indicate a Key Role for Cytokinins in Disease Development*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI **19**(5): 480–494.
- Spoel, Steven H., Johnson, Jessica S., and Dong, Xinnian. (2007). *Regulation of Tradeoffs between Plant Defenses against Pathogens with Different Lifestyles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(47): 18842–18847.
- Spoel, Steven H., Koornneef, Annemart, Claessens, Susanne M. C., Korzelius, Jérôme P., Van Pelt, Johan A., Mueller, Martin J., Buchala, Antony J., Métraux, Jean-Pierre, Brown, Rebecca, Kazan, Kemal, Van Loon, L. C., Dong, Xinnian, and Pieterse, Corné 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**: 760–770.
- Stockinger, Eric J., Gilmour, Sarah J., and Thomashow, Michael F. (1997). *Arabidopsis Thaliana CBF1 Encodes an AP2 Domain-Containing Transcriptional Activator That Binds to the C-repeat/DRE, a Cis-Acting DNA Regulatory Element That Stimulates Transcription in Response to Low Temperature and Water Deficit*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1035–1040.
- Sugimoto, Kaoru, Gordon, Sean P., and Meyerowitz, Elliot M. (2011). *Regeneration in Plants and Animals: Dedifferentiation, Transdifferentiation, or Just Differentiation?* *Trends in Cell Biology* **21**(4): 212–218.
- Sun, Shan, Yu, Jun-Ping, Chen, Feng, Zhao, Tong-Jin, Fang, Xiao-Hong, Li, Yi-Qin, and Sui, Sen-Fang. (2008). *TINY, a Dehydration-Responsive Element (DRE)-Binding Protein-like Transcription Factor Connecting the DRE- and Ethylene-Responsive Element-Mediated Signaling Pathways in Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **283**(10): 6261–6271.
- Suo, Haicui, Ma, Qibin, Ye, Kaixin, Yang, Cunyi, Tang, Yujuan, Hao, Juan, Zhang, Zhanyuan J., Chen, Mingluan, Feng, Yuqi, and Nian, Hai. (2012). *Overexpression of AtDREB1A Causes a Severe Dwarf Phenotype by Decreasing Endogenous Gibberellin Levels in Soybean [Glycine Max (L.) Merr.]*. *PLOS ONE* **7**(9): e45568. doi:10.1371/journal.pone.0045568.
- Swaminathan, Kankshita, Peterson, Kevin, and Jack, Thomas. (2008). *The Plant B3 Superfamily*. *Trends in Plant Science* **13**(12): 647–655.
- Tao, Yi, Xie, Zhiyi, Chen, Wenqiong, Glazebrook, Jane, Chang, Hur-Song, Han, Bin, Zhu, Tong, Zou, Guangzhou, and Katagiri, Fumiaki. (2003). *Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen Pseudomonas Syringae*. *The Plant cell* **15**(2): 317–330.
- Tenhaken, Raimund, Levine, Alex, Brisson, Louise F, Dixon, Richard A, and Lamb, Chris. (1995). *Function of the Oxidative Burst in Hypersensitive Disease Resistance*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(May): 4158–4163.

- Thomma, Bart P H J, Nürnberger, Thorsten, and Joosten, Matthieu H a J. (2011). *Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy*. *The Plant cell* **23**(1): 4–15.
- Thomma, Bart P. H. J., Eggermont, Kristel, Penninckx, Iris A. M. A., Mauch-Mani, Brigitte, Vogelsang, Ralph, Cammue, Bruno P. A., and Broekaert, Willem F. (1998). *Separate Jasmonate-Dependent and Salicylate-Dependent Defense-Response Pathways in Arabidopsis Are Essential for Resistance to Distinct Microbial Pathogens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15107–15111.
- Vernooij, Bernard, Friedrichya, Leslie, Morse, Alison, Reist, Roland, Kolditz-Jawhar, Rachida, Ward, Eric, Uknes, Scott, Kessmann, Helmut, and Ryals, John. (1994). *Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction*. *The Plant Cell* **6**(July): 959–965.
- Veronese, Paola, Nakagami, Hirofumi, Bluhm, Burton, AbuQamar, Synan, Chen, Xi, Salmeron, John, Dietrich, Robert A, Hirt, Heribert, and Mengiste, Tesfaye. (2006). *The Membrane-Anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Plays Distinct Roles in Arabidopsis Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens*. *The plant Cell* **18**(January): 257–273.
- Walters, Dale R., and McRoberts, Neil. (2006). *Plants and Biotrophs: A Pivotal Role for Cytokinins?* *TRENDS in Plant Science* **11**(12): 581–586.
- Wan, Jinrong, Zhang, Xue-Cheng, Neece, David, Ramonell, Katrina M, Clough, Steve, Kim, Sung-Yong, Stacey, Minviluz G, and Stacey, Gary. (2008). *A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**(2): 471–481.
- Wang, Dong, Pajerowska-Mukhtar, Karolina, Culler, Angela Hendrickson, and Dong, Xinnian. (2007). *Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway*. *Current Biology* **17**(20): 1784–1790.
- Wang, Guodong, Ellendorff, Ursula, Kemp, Ben, Mansfield, John W, Forsyth, Alec, Mitchell, Kathy, Bastas, Kubilay, Liu, Chun-Ming, Woods-Tör, Alison, Zipfel, Cyril, de Wit, Pierre J G M, Jones, Jonathan D G, Tör, Mahmut, and Thomma, Bart P H J. (2008). *A Genome-Wide Functional Investigation into the Roles of Receptor-like Proteins in Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**(2): 503–517.
- Wasternack, C., Atzorn, R., Jarosch, B., and Kogel, K. H. (1994). *Induction of a Thionin, the Jasmonate-Induced 6 kDa Protein of Barley by 2,6-Dichloroisonicotinic Acid*. *Journal of Phytopathology* **140**: 280–284.
- Watt, Steven Alexander, Tellström, Verena, Patschkowski, Thomas, and Niehaus, Karsten. (2006). *Identification of the Bacterial Superoxide Dismutase (SodM) as Plant-Inducibile Elicitor of an Oxidative Burst Reaction in Tobacco Cell Suspension Cultures*. *Journal of Biotechnology* **126**(1): 78–86.
- Welsch, Ralf, Maass, Dirk, Voegel, Tanja, DellaPenna, Dean, and Beyer, Peter. (2007). *Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of Arabidopsis Leaves*. *Plant Physiology* **145**: 1073–1085.

- Wessler, Susan R. (2005). *Homing into the Origin of the AP2 DNA Binding Domain*. *TRENDS in Plant Science* **10**(2): 54–56.
- Xu, Kenong, Xu, Xia, Fukao, Takeshi, Canlas, Patrick, Maghirang-Rodriguez, Reyce, Heuer, Sigrid, Ismail, Abdelbagi M., Bailey-Serres, Julia, Ronald, Pamela C., and Mackill, David J. (2006). *Sub1A Is an Ethylene-Response-Factor-like Gene That Confers Submergence Tolerance to Rice*. *Nature* **442**: 705–708.
- Xu, Zhao Shi, Chen, Ming, Li, Lian Cheng, and Ma, You Zhi. (2011). *Functions and Application of the AP2/ERF Transcription Factor Family in Crop Improvement*. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**(7): 570–585.
- Yamasaki, Kazuhiko, Kigawa, Takanori, Seki, Motoaki, Shinozaki, Kazuo, and Yokoyama, Shige-yuki. (2013). *DNA-Binding Domains of Plant-Specific Transcription Factors: Structure, Function, and Evolution*. *Trends in Plant Science* **18**(5): 267–276.
- Yi, So Young, Kim, Jee-hyub, Joung, Young-hee, Lee, Sanghyeob, Kim, Woo-taek, and Yu, Seung Hun. (2004). *The Pepper Transcription Factor CaPF1 Confers Pathogen and Freezing Tolerance in Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 2862–2874.
- Zhang, C. H., Shangguan, L. F., Ma, R. J., Sun, X., Tao, R., Guo, L., Korir, N. K., and Yu, M. L. (2012). *Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Superfamily in Peach (Prunus Persica)*. *Genetics and Molecular Research : GMR* **11**: 4789–4809.
- Zhang, Zigu, Collinge, David B, and Thordal-Christensen, Hans. (1995). *8 The Plant Journal Germin-like Oxalate Oxidase, a H2O2-Producing Enzyme, Accumulates in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus*. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08010139.x>.
- Zhou, Jian Min, and Chai, Jijie. (2008). *Plant Pathogenic Bacterial Type III Effectors Subdue Host Responses*. *Current Opinion in Microbiology* **11**(2): 179–185.
- Zhuang, Jing, Cai, Bin, Peng, Ri-He, Zhu, Bo, Jin, Xiao-Feng, Xue, Yong, Gao, Feng, Fu, Xiao-Yan, Tian, Yong-Sheng, Zhao, Wei, Qiao, Yu-Shan, Zhang, Zhen, Xiong, Ai-Sheng, and Yao, Quan-Hong. (2008). *Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Gene Family in Populus Trichocarpa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**: 468–474.
- Zipfel, Cyril. (2009). *Early Molecular Events in PAMP-Triggered Immunity*. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 414–420.