



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área: Biología

Subárea: Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

“Análisis funcional de la α -Dioxigenasa del musgo *Physcomitrella patens* durante el desarrollo y en respuesta a patógenos”

Lucina Machado Benvenuti

Orientadora: Dra. Inés Ponce de León

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

**Tribunal de Tesis:
Presidente: Dra. Susana Castro
Vocales: Dra. Ana Ramón y Dra. Sabina Vidal**

Junio, 2013

Índice

Índice	1
Abreviaciones	5
Agradecimientos	8
Resumen	9
1. Introducción.....	11
1.1 Interacción planta patógeno	11
1.1.1 Respuesta de defensa.....	12
1.1.2 Rol de las oxilipinas en la respuesta de defensa.....	16
1.2 El musgo <i>Physcomitrella patens</i> como sistema modelo.....	19
1.2.1 Estudios de Genética Reversa en el musgo <i>Physcomitrella patens</i>	24
1.2.2 Antecedentes en el estudio de la enzima α -DOXs en <i>P. patens</i>	25
2. Objetivos.....	29
3. Materiales y métodos.....	30
3.1 Material biológico	30
3.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	30
3.1.2 Condiciones de cultivo que favorecen el desarrollo del caulonema	30
3.1.3 Cepa y cultivo de microorganismos	30
3.1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	30
3.1.3.2 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	31
3.1.3.3 <i>Botrytis cinerea</i>	31
3.2 Vectores y construcciones	32
3.3 Tratamientos	34
3.3.1 Tratamientos con microorganismos fitopatógenos	34
3.3.2 Tratamiento con auxinas	34
3.4 Modificaciones generales del ADN	34
3.4.1 Digestiones con enzimas de restricción	34

3.4.2 Ligaciones	34
3.4.3 Defosforilación de vectores.....	35
3.4.4 Fosforilación de productos de PCR.....	35
3.4.5 Relleno con la polimerasa <i>Klenow</i>	35
3.5 Preparación y análisis de ácidos nucleicos	35
3.5.1 Obtención de ADN plasmídico	35
3.5.2 Obtención de ADN a partir de tejidos vegetales	36
3.5.3 Obtención de ARN a partir de tejidos vegetales	36
3.5.4 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa	37
3.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	37
3.5.6 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.....	37
3.5.7 Análisis por “Northern blot” con sistema quimioluminiscente.....	38
3.5.8 Análisis por Southern blot.....	39
3.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
3.6.1 Amplificación por PCR de las regiones 5' y 3' del gen <i>Ppα-DOX</i> para la generación de la construcción de reemplazo pTN83-DOXGUS	40
3.6.2 Análisis de líneas transgénicas α -DOX/GUS mediante PCR.....	41
3.6.3 Oligonucleótidos	41
3.7 Obtención y transformación de protoplastos de <i>Physcomitrella patens</i>	42
3.8 Análisis de los posibles transformantes	43
3.8.1 Análisis de plantas transgénicas α -DOX/GUS	43
3.8.2 Análisis de los sobreexpresantes OEDOX.....	43
3.9 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo	44
3.10 Determinación de la actividad <i>Ppα-DOX</i>	44
3.11 Medida de muerte celular.....	45
3.12 Tinciones para visualizar tejidos vegetales y fitopatógenos.....	46
3.13 Determinación de actividad β -glucuronidasa	46

3.14 Análisis estadísticos	46
4. Resultados.....	47
4.1 Análisis de la expresión de <i>Ppα-DOX</i> mediante la utilización del gen reportero <i>β-glucuronidasa</i> (GUS).....	47
4.1.1 Obtención del vector de reemplazo para el análisis de la expresión de <i>Ppα-DOX</i> mediante la observación de actividad GUS	47
4.1.2 Transformación de protoplastos de <i>P. patens</i>	55
4.1.3 Análisis de los transformantes mediante PCR	57
4.1.4 Análisis por Southern blot.....	59
4.1.5 Análisis de actividad <i>Ppα-DOX</i>	62
4.1.6 Análisis de la actividad GUS	63
4.1.6.1 Localización de la actividad GUS en plantas transgénicas no tratadas... 63	
4.1.6.2 Localización de actividad GUS en tejidos tratados con elicitores de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y esporas de <i>Botrytis cinerea</i>	66
4.1.6.3 Localización de actividad GUS en plantas transgénicas <i>α-DOX/GUS</i> en respuesta a auxinas	69
4.2 Sobreexpresión del gen <i>Ppα-DOX</i>	71
4.2.1 Transformación de protoplastos de <i>P. patens</i>	71
4.2.2 Análisis de los transformantes mediante “Northern blot”	72
4.2.3 Análisis de actividad <i>Ppα-DOX</i>	74
4.2.4 Análisis fenotípicos de los transformantes.....	74
4.2.4.1 Crecimiento de las colonias	74
4.2.4.2 Desarrollo de los rizoides	75
4.2.4.3 Desarrollo del caulonema y cloronema	76
4.2.4.4 Análisis de la susceptibilidad de las plantas que sobreexpresan <i>Ppα-DOX</i> comparado con plantas salvajes en respuesta a patógenos	79
5. Discusión	81
5.1 Obtención de plantas transgénicas para el análisis de actividad GUS.....	81

5.2 La enzima α -DOX se expresa en células mitóticamente activas.....	83
5.3 <i>Pp</i> α -DOX se expresa en respuesta a auxinas y en tejidos donde se producen auxinas	84
5.4 Obtención de sobreexpresantes del gen <i>Pp</i> α -DOX.....	85
5.5 La sobreexpresión de <i>Pp</i> α -DOX altera el desarrollo del musgo <i>P. patens</i>	87
5.6 La sobreexpresión de <i>Pp</i> α -DOX disminuye la susceptibilidad de <i>P. patens</i> frente a microorganismos patógenos.....	89
6. Conclusiones.....	92
7. Perspectivas futuras	93
8. Referencias bibliográficas	94

Abreviaciones

$\cdot O_2^-$	radical superóxido
9,12,13-TriHOD	ácido 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico
9-HOT	ácido 9-hidroxi-10,12,15-octadecatrienoico
9-HPOT	ácido 9-hidroperoxi-10,12,15-octadecatrienoico
ABA	ácido abscisico
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
Amp	Ampicilina
AOC	aleno óxido ciclasa
AOS	aleno óxido sintasa
ARN	ácido ribonucleico
Avr	gen de avirulencia
<i>B.cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BrEt	bromuro de etidio
Ca ²⁺	ion calcio
CDKs	quinasas activadas por calcio
CF	filtrado de cultivo
CHS	chalcona sintasa
CIAP	“ <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> ”
COXs	ciclooxigenasas
CRBC	Chicken Red Blood Cells
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 3,7]decan}-4-yl) phenyl phosphate
DAMPs	damage-associated molecular patterns”
DEPC	dietilpirocarbonato
DO	densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ET	etileno
ETI	inmunidad activada por efectores
EtOH	etanol
G418	geneticina
GUS	β-glucuronidasa
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HPLS	hidroperóxido liasa
HR	reacción hipersensible
Hyg	Hygromicina
JA	ácido jasmónico
Kb	kilobases

Km	Kanamicina
KO	“knockout”
LB	medio Luria-Bertani
LOXs	lipoxigenasas
MAMPs	“microbe associated molecular patterns”
MAPKs	quinasas activadas por mitógenos
MeSA	metil salicilato
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MSE	MeSA esterasa
NAA	ácido α -naftaleno acético
NO	óxido nítrico
OEDOX	sobreexpresantes de <i>Ppα-DOX</i> (por “overexpressors”)
OPDA	ácido 12-oxo-fitodienoico
OPR3	OPDA reductasa
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
PAL	fenil-amonioliasa
PAMPs	“pathogen associated molecular patterns”
pb	pares de bases
<i>Pcc</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCD	muerte celular programada
PCR	“polymerase chain reaction”
PDA	“Potato Dextrose Agar”
PEG	polietilenglicol
<i>PNK</i>	“ <i>Polynucleotide Kinase</i> ”
<i>Ppα-dox</i>	mutante “knockout” de <i>Ppα-DOX</i>
PRRs	“pattern recognition receptors”
PTI	inmunidad activada por patógenos
R	gen de resistencia
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SA	ácido salicílico
SAR	respuesta sistémica adquirida
SDS	dodecil sulfato sódico
seg	Segundos
TGR	“target gene replacement”
TUNEL	“terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated
U	Unidades
ufc	unidades formadoras de colonias
WPB	Woody Plant Lysis Buffer
wt	“wild type”

X-Gluc	ácido 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol β -D-gluc
α -DOX	gen α -dioxigenasa
α -DOX	proteína α -dioxigenasa
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
α -DOX/GUS	plantas transgénicas en las que <i>Ppα-DOX</i> está fusionado al gen GUS

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Inés, mi tutora, por aceptarme como su estudiante, por estar siempre dispuesta a ayudarme y por contribuir a que pudiera finalizar esta etapa de mi formación.

A Carina por permitirme realizar mi trabajo de maestría en su laboratorio. A todos los integrantes del Departamento de Biología Molecular del IIBCE por todos los gratos momentos compartidos.

A Alex por toda su paciencia y ayuda constante. Por ser una gran compañera de trabajo y por brindarme siempre buenos consejos.

A Pierre-Francois Perroud, Universidad de Washington, USA, por el plásmido pTHUbiGateway. A Tomoaki Nishiyama y Mitsuyasu Hasebe por el plásmido pTN83. A Mats Hamberg por realizar las medidas de actividad. Al Servicio de Citometría de Flujo del IIBCE, en especial a Federico por todo el tiempo dedicado.

A mis amigas Lucila, Mariana, Marianne y Paola por estar siempre. Por tantas charlas y mails compartidos. Por tantos lindos momentos vividos.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, Angélica y Jorge, por ser un pilar fundamental en mi vida. A mi hermano, Darío por su apoyo incondicional. A toda mi familia: abuelos, abuelas, tíos, tías, primos y primas y en especial a las dos más pequeñas, Pilar y Franca por ser la alegría de la familia.

Agradezco el apoyo financiero brindado por: PEDECIBA, Beca de maestría ANII y proyecto ANII FCE2007_376.

Resumen

Las oxilipinas son un grupo de ácidos grasos oxigenados que cumplen funciones en el desarrollo de las plantas y en la respuesta de defensa a la infección por microorganismos patógenos. En plantas vasculares estas oxilipinas se generan por la acción de dos grupos de enzimas, las lipoxigenasas (LOXs) y las α -dioxigenasas (α -DOXs). Se ha propuesto que las α -DOX sintetizan oxilipinas que cumplen un rol en la protección de la muerte celular causada por la infección de patógenos en plantas como *Arabidopsis*. Nuestro grupo de investigación identificó un gen que codifica para una α -DOX en el musgo *Physcomitrella patens* (*P. patens*).

En este trabajo nos propusimos analizar la expresión de *Pp α -DOX* mediante la generación de plantas transgénicas de *P. patens* con el gen *Pp α -DOX* fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) y bajo el control del promotor endógeno de *Pp α -DOX*. Mediante la transformación de protoplastos con la construcción de interés se obtuvieron plantas transformantes las cuales fueron analizadas por PCR y Southern blot. Los estudios de actividad GUS en plantas α -DOX/GUS revelaron que *Pp α -DOX* se expresa en células mitóticamente activas, en respuesta al tratamiento con auxinas y en tejidos dañados por el hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) y por el filtrado de cultivo (CF) de la cepa SCC1 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*).

Además se obtuvieron plantas que sobreexpresan *Pp α -DOX* bajo el control del promotor constitutivo de la ubiquitina de maíz, mediante la transformación de protoplastos de *P. patens* con la construcción pTHUbi-DOX obtenida previamente en nuestro laboratorio. Mediante “Northern blot” se determinó que los transformantes presentan distintos niveles de expresión de *Pp α -DOX*, aunque solamente el transformante OEDOX 3 tiene mayor actividad *Pp α -DOX* comparado con plantas salvajes. El aumento de la actividad *Pp α -DOX* en OEDOX 3 dio lugar a una disminución significativa en el tamaño de las colonias reflejado en un acortamiento en el largo del caulonema y en un aumento en la proporción de células más cortas del cloronema comparado con plantas salvajes. El transformante OEDOX 3 muestra además una disminución en la muerte celular de los tejidos causada por elicitores de la cepa SCC1 de *Pcc* comparado con plantas salvajes. Estos resultados sugieren por lo tanto que los productos de la α -DOX alteran el desarrollo del protonema de *P. patens*

por lo que probablemente debe haber un control de los niveles de estas oxilipinas que se acumulan a nivel de las células de *P. patens*. Además, los resultados también sugieren que las oxilipinas producidas por la α -DOX protegen a los tejidos de la muerte celular producida por los elicitores de SCC1 de *Pcc*.

1. Introducción

El crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas se ve afectado por factores ambientales de naturaleza biótica como insectos, microorganismos y animales y de naturaleza abiótica como sequía, temperaturas extremas, salinidad, etc. Como parte del proceso evolutivo, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación frente a las diferentes condiciones de estrés. Dado que los mecanismos moleculares involucrados en estas respuestas no son del todo comprendidos, el estudio a nivel celular y molecular de estas interacciones es una de las principales áreas de investigación en biología vegetal. El conocimiento generado a través de este tipo de análisis ha permitido generar estrategias orientadas a la producción de cultivares más resistentes a factores de estrés.

1.1 Interacción planta patógeno

En la naturaleza, las plantas están continuamente expuestas a microorganismos como bacterias, hongos, virus y viroides, algunos de los cuales son perjudiciales para las mismas. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la presencia de varios mecanismos de defensa. Estos mecanismos difieren entre plantas y animales. Las plantas, a diferencia de los animales que tienen un sistema inmune con células especializadas que son distribuidas por el sistema circulatorio a todo el organismo, no poseen células especializadas para defenderse por lo que cada célula debe de tener la capacidad de responder al ataque del patógeno (Bonas & Lahaye, 2002).

Las plantas y los microorganismos han coevolucionado, lo que ha dado lugar a interacciones planta-patógeno complejas ya que aunque las plantas generan mecanismos moleculares y celulares de defensa, los patógenos se adaptan continuamente a estos. Sin embargo, la mayoría de las plantas son resistentes a la infección por patógenos ya que tienen barreras preformadas, como la cutícula y la pared vegetal, y variados compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las células, incluyendo terpenoides, compuestos fenólicos alcaloides, etc. Cuando estas barreras no logran impedir la entrada del patógeno en los tejidos vegetales, se desencadena una respuesta de defensa activa, que implica la percepción del microorganismo, la transducción de señales y la activación de genes de defensa.

1.1.1 Respuesta de defensa

Las plantas han desarrollado un sistema de múltiples etapas de defensa para hacer frente a la amenaza de la infección por diversos patógenos. La primera línea de la respuesta de defensa de la planta es la percepción de moléculas conservadas provenientes del patógeno conocidas como “microbe- or pathogen- associated molecular patterns” (MAMPs o PAMPs). Los PAMPs son moléculas esenciales para la supervivencia de los patógenos y además están conservadas entre distintas especies, por lo que son una forma eficiente para las plantas de detectar la presencia de patógenos. La naturaleza de los PAMPs es muy diversa y se han identificado y caracterizado varios tipos de PAMPs en diversos patógenos. Dentro de las moléculas bacterianas que actúan como PAMPs se encuentran la flagelina, lipopolisacáridos, el factor de elongación EF-Tu y peptidoglicanos. En el caso de los hongos se identificaron la quitina y el ergosterol y en oomycetes el ácido araquidónico, glucanos y elicitinas (Boller & Felix, 2009; Postel & Kemmerling, 2009).

En las células de la zona infectada receptores extracelulares denominados “pattern recognition receptors” (PRRs), reconocen al patógeno a través de sus PAMPs y esto lleva a la activación de la inmunidad activada por PAMPs (PTI, “PAMP-triggered immunity”). Además las plantas también reconocen moléculas liberadas por el huésped en el proceso de invasión del patógeno, como fragmentos de la pared celular vegetal y cutina liberados por la acción enzimática de los patógenos, denominadas “damage-associated molecular patterns” (DAMPs) (Underwood, 2012). Las moléculas reconocidas por la planta, ya sea PAMPs o DAMPs capaces de activar una respuesta de defensa se denominan elicitores y son las primeras señales que se perciben para iniciar la respuesta de defensa.

Una vez que se da el reconocimiento del patógeno se activan diversos procesos bioquímicos que incluyen el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y un incremento en la producción y acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS, “reactive oxygen species”) tales como el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), denominado “estallido oxidativo”. Este estallido es un componente central de un sistema altamente amplificado e integrado de señales que lleva a la expresión de los mecanismos de defensa. (Jabs, *et al.*, 1997; Lamb & Dixon, *et al.*, 1997). Las ROS pueden presentar tanto un efecto antimicrobiano directo, como inducir

una muerte celular programada de un número limitado de células que rodean la zona de infección. A esta respuesta local se la denomina reacción hipersensible o HR, y lleva a la aparición de lesiones necróticas como consecuencia del flujo de iones a través de la membrana celular (Yang, *et al.*, 1997; Apel & Hirt, 2004). También se da la activación de quinasas incluyendo CDKs (dependientes de calcio) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), lo que conduce a la fosforilación de diversas proteínas celulares y a la activación de genes de defensa que codifican para proteínas que cumplen diferentes papeles en la defensa vegetal, ya sea mediante actividad antimicrobiana, reforzamiento de la pared celular, señalización, entre otras (Tena, *et al.*, 2011).

Algunos patógenos, adaptados a su huésped, han desarrollado estrategias para suprimir la PTI, ya sea interfiriendo en el reconocimiento a nivel de la membrana celular o secretando moléculas efectoras al citoplasma de la célula vegetal que interrumpen o modifican las vías de señalización y/o la respuesta de defensa. A su vez, las plantas han generado proteínas de resistencia (R) que reconocen directa o indirectamente a los efectores y activan la inmunidad activada por efectores (ETI, “effector triggered immunity”). Los efectores son en su mayoría moléculas proteicas secretadas por patógenos que interfieren con la defensa vegetal con el objetivo de aumentar la infección (Jones & Dangl, 2006).

Esta segunda línea de la respuesta de defensa vegetal, ETI, se activa por la interacción directa o indirecta de efectores con proteínas R específicos y corresponde al modelo gen para gen descrito por Flor en 1971, según el cual la resistencia vegetal está dada por la interacción de los productos de dos genes, uno de resistencia (proteínas R) proveniente de la planta, y el otro de avirulencia (proteínas Avr) proveniente del patógeno. Existen diversas interpretaciones del modelo gen-para-gen. Una de ellas es el modelo receptor-ligando en el que el ligando Avr se une directamente a la proteína R correspondiente para iniciar la respuesta de defensa. Otra se refiere al modelo de “coreceptor”, en el que se propone que la proteína Avr se une a una proteína intermedia y juntas se unen a la proteína R permitiendo la activación de la defensa vegetal. Y por último, está el modelo de “guardia” que propone que el factor Avr se une a una proteína diana que no sería la proteína R. Cuando el patógeno es capaz de establecer una infección inicial en el sitio de entrada pero no logra invadir otros tejidos vegetales la proteína R bloquearía a la

diana del factor Avr, evitando así que la interacción del factor Avr con la proteína diana provoque enfermedad (Bonas & Lahaye, 2002).

Los mecanismos moleculares que se llevan a cabo una vez activada la ETI son similares a los observados en la PTI pero con mayor intensidad y se observa la HR en el sitio de infección (Jones & Dangl, 2006). La aparición de la HR está asociada a la ETI (Dempsey & Klessig, 2012).

La HR conduce a un proceso de suicidio de las células vegetales que rodean los puntos de infección del patógeno (Morel & Dangl, 1997). La muerte celular programada (PCD) durante la HR es una respuesta de defensa que aísla al patógeno en tejidos muertos y restringe su acceso a nutrientes y factores celulares necesarios para su crecimiento y dispersión. Las plantas y los animales comparten similitudes en el proceso de muerte celular programada, incluyendo la condensación de la cromatina, fragmentación internucleosomal del DNA, cambios ultraestructurales en membranas y organelos, la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de proteasas (O'Brien, *et al.*, 1998; del Pozo & Lam, 1998; Rojo, *et al.*, 2004). La PCD de animales y plantas involucra además del “estallido oxidativo”, eventos de señalización celular como el incremento en la concentración de calcio citosólico libre, el incremento de glutatión reducido y un colapso del potencial de membrana mitocondrial (Yao, *et al.*, 2004). El óxido nítrico (NO) y el ácido salicílico (SA), también participan, junto con las ROS, en la inducción de genes de defensa vegetal y en el proceso de PCD (Delledonne, *et al.*, 1998; Lam, *et al.*, 2001).

Los componentes moleculares de las vías de señalización de la PCD presentan un alto grado de conservación a nivel estructural y funcional entre plantas y animales. Se ha demostrado que homólogos de genes que controlan la apoptosis en animales, como el “Defender against Apoptotic Death-1” y el “Bax-inhibitor-1”, están codificados en genomas de plantas y cumplen la misma función en el control de la PCD (Matsumura, *et al.*, 2003; Danon, *et al.*, 2004).

Además de la respuesta local, la percepción del patógeno y la activación de la PTI y la ETI, pueden desencadenar respuestas sistémicas, en tejidos alejados de la zona de la infección. Esta respuesta generalizada se denomina respuesta sistémica adquirida o SAR (“systemic acquired resistance”). La SAR es de larga duración y puede permanecer durante semanas o meses. También es una resistencia efectiva contra un amplio espectro

de patógenos, como virus, bacterias y hongos. Un estudio reciente sostiene que los mecanismos de inducción por PTI de la SAR son idénticos a los de la ETI (Mishina & Zeier, 2007). Durante la aparición de la SAR aumentan los niveles de SA tanto en el tejido infectado como en los tejidos sistémicos (Xia, *et al.*, 2009). Durante mucho tiempo se ha aceptado que la señal móvil asociada a la aparición de la SAR era el SA, sin embargo algunos estudios más recientes sugieren que en plantas de tabaco esta señal móvil es el metil salicilato (MeSA) y que la enzima MeSA esterasa (MSE) es necesaria para que ocurra la SAR en los tejidos no infectados. El MeSA por sí solo no induce la respuesta de defensa (Seskar, *et al.*, 1998) y debe ser convertido a SA por medio de MSE (Park, *et al.*, 2007; Park, *et al.*, 2009). La subsiguiente caracterización de la enzima MSE en *Arabidopsis* y *Solanum tuberosum* confirman la importancia de la actividad de esta enzima para la aparición de la SAR en estas especies (Vlot, *et al.*, 2008; Manosalva, *et al.*, 2010).

El SA junto con el etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA), entre otros, son las hormonas involucradas en la percepción y amplificación de las señales del patógeno. (Yang, *et al.*, 1997). La inducción de estas vías de señalización conduce en cada caso a la activación de un grupo específico de genes de defensa, los que contribuyen a la defensa de la planta frente a distintos patógenos, aunque existe una intrincada conexión entre las tres vías (Feys & Parker, 2000; MCDowell & Dangl, 2000). Además del SA, ET y JA se ha demostrado que las hormonas vegetales, como las auxinas, el ácido abscísico (ABA), citoquininas y giberelinas también participan en la respuesta de defensa vegetal a la infección con microorganismos patógenos (López *et al.*, 2008; Pieterse, *et al.*, 2012; Robert-Seilaniantz, *et al.*, 2011).

La activación de la ruta del SA se ha asociado mayoritariamente a la resistencia frente a patógenos biotróficos como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasitica* y *Erysiphe orontii*, mientras que la activación transcripcional dependiente de JA es necesaria para la resistencia frente a patógenos necrotrofos como *Pectobacterium carotovorum*, *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) y *Alternaria brassicicola* (Bowling, *et al.*, 1994; Bowling, *et al.*, 1997; Clarke, *et al.*, 1998; Norman, *et al.*, 1999). La resistencia a *B. cinerea* requiere además que la ruta del ET sea funcional (Thomma, *et al.*, 1999). Recientemente se ha observado que la vía del SA también se activa frente a la infección con *Fusarium graminearum* (Makandar, *et al.*, 2011).

La respuesta de defensa vegetal nunca es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal sino que es el efecto de la interacción de distintas rutas. Las rutas dependientes del JA y ET pueden actuar de manera sinérgica mientras que las vías de transducción dependiente del SA y JA actúan de manera antagónica aunque también se han documentado interacciones sinérgicas (Dong, 1998; Glazebrook, 1999, Beckers & Spoel, 2006).

1.1.2 Rol de las oxilipinas en la respuesta de defensa

La participación de los ácidos grasos y sus derivados en la respuesta de defensa, ha sido observada tanto en células animales como vegetales. En plantas se ha demostrado que los ácidos grasos oxigenados, denominados oxilipinas, dan origen a compuestos biológicamente activos, los que cumplen un rol importante en la adaptación vegetal a condiciones adversas de crecimiento y en la respuesta de defensa frente a patógenos (Vellosillo, *et al.*, 2007).

En plantas, la síntesis de oxilipinas, a partir de ácidos grasos liberados de la membrana de la célula vegetal, se inicia por la acción de lipoxigenasas (LOXs) (Bergey, *et al.*, 1996) y de α -dioxigenasas (α -DOX) (Sanz, *et al.*, 1998). En animales las oxilipinas se sintetizan por la acción enzimática de las LOXs y las prostaglandina endoperóxido sintetetasas, también denominadas cicloxigenasas (COXs) (Nelson & Seitz, 1994; Thierauch, *et al.*, 1993). Las α -DOXs tienen homología con las COXs a nivel proteico, aunque la actividad enzimática es diferente (Sanz, *et al.*, 1998; Hamberg, *et al.*, 1999). Recientemente, mediante cristalografía por rayos X se determinó la estructura tridimensional de la α -DOX de *Arabidopsis*. Se estableció que la estructura de la α -DOX es monomérica, predominantemente α -helicoidal, y consta de dos dominios. Uno de los dominios presenta un bajo grado de homología estructural con el dominio de unión a la membrana de la COX, pero se encuentra en una posición similar con respecto al dominio catalítico. El dominio catalítico, muestra un alto grado de similitud con el dominio catalítico de la COX, donde 21 de los 22 elementos de α -helicoidales están conservados (Goulah, *et al.*, 2013).

En plantas vasculares las LOXs (9-LOX y 13-LOX) catalizan la oxidación del ácido linoleico (18:2) o linolénico (18:3) dando lugar a la formación de los ácidos 9- o 13-hidroperoxioctadecadi(tri)enoico dependiendo de la enzima. A continuación estos

hidroperóxidos son modificados por las enzimas hidroperóxido liasa (HPLS) y aleno óxido sintasa (AOS). Luego de la acción secuencial de las enzimas LOX, AOS y la aleno óxido ciclasa (AOC), se produce el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA, 12-oxo-phytodienoic acid). El OPDA es reducido mediante la enzima OPDA reductasa (OPR3) seguida por tres rondas de β -oxidación dando lugar a la formación del ácido (+)-7-isojasmónico el cual se isomeriza en condiciones naturales en ácido (-)-jasmónico (JA) (Browse, 2009). Para varias de las oxilipinas producidas por la vía de las LOXs se ha podido asignar una función en la respuesta de defensa, ya sea a través de su actividad antimicrobiana (Croft, *et al.*, 1993; Blée, 1998) o como moléculas señal activadoras de la expresión de genes de defensa como el JA, C6 volátiles y metiljasmonatos (Bate & Rothstein, 1998).

Las enzimas α -DOX son capaces de catalizar la oxidación del ácido linoleico o linolénico dando lugar al ácido 2-hidroperoxilinoico o 2-hidroperoxilinoico respectivamente (Figura 1). El ácido 2-hidroperoxilinoico es inestable y se transforma en el ácido 2-hidroxi-linoico y ácido 8,11,14-heptadecatrienoico por medio de reacciones no enzimáticas. (Hamberg, *et al.*, 2003).

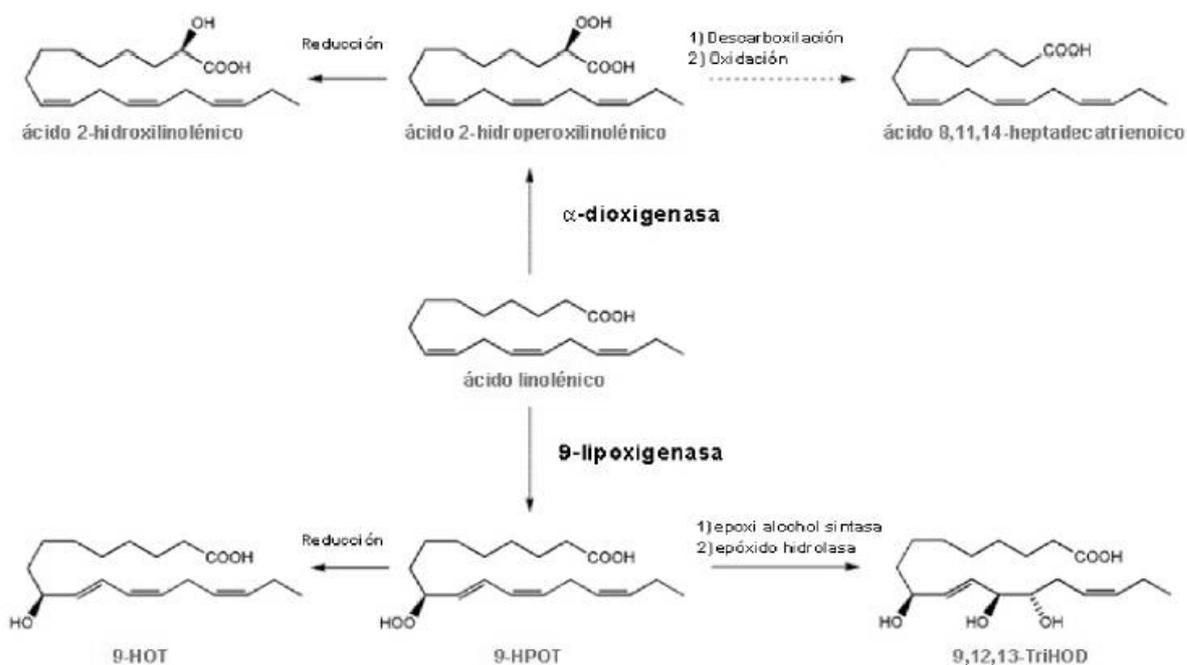


Figura 1. Esquema de las reacciones enzimáticas catalizadas por 9-LOX y α -DOX a partir del ácido linolénico. 9-HOT: ácido 9-hidroxi-10,12,15-octadecatrienoico, 9-HPOT: ácido 9-hidroperoxi-10,12,15-octadecatrienoico, 9,12,13-TriHOD: ácido 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico. Extraído y modificado de Hamberg, *et al.*, 2003.

Se ha demostrado que los aminoácidos (aa) presentes en el sitio catalítico de la α -DOX de *Arabidopsis* son: His-163, Trp-165, His-318, Thr-323, Tyr-386, His-389, Phe-556, Phe-559, y Arg-566 (Figura 2), siendo críticos para la actividad oxigenasa la His-318, Thr-323 y Arg-566 (Goulah, *et al.*, 2013). En la α -DOX de arroz se determinó que los aa esenciales en el sitio activo son: His-311, Arg-558 y Arg-559 (Koszela-Rosenblum, *et al.*, 2008).

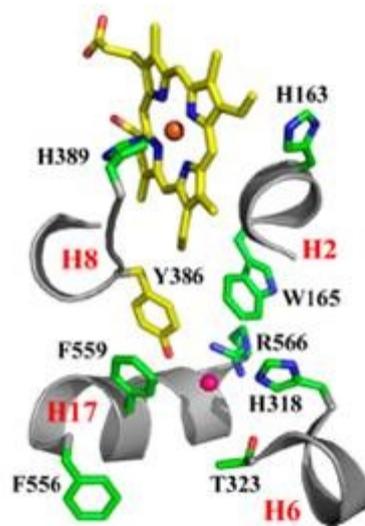


Figura 2. Estructura del sitio activo de la α -DOX de *Arabidopsis* donde se pueden observar los aa presentes: His-163, Trp-165, His-318, Thr-323, Tyr-386, His-389, Phe-556, Phe-559, y Arg-566 (Goulah, *et al.*, 2013).

Diversos estudios en plantas han mostrado la participación de las α -DOXs tanto en la respuesta de defensa vegetal frente a diversos patógenos como en el desarrollo. En hojas de tabaco inoculadas con *Pseudomonas syringae* aumenta la acumulación de transcritos que codifican para la α -DOX1 (Sanz, *et al.*, 1998). En *Arabidopsis* también aumentaba la expresión del gen α -DOX1 en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* (Ponce de León, *et al.*, 2002). Plantas que presentan una disminución en la actividad α -DOX1 (“plantas antisense”) son más susceptibles a dicho patógeno, observándose un aumento en el crecimiento de *Pseudomonas syringae* y una muerte celular más severa de los tejidos que en plantas salvajes (Ponce de León, *et al.*, 2002). La expresión del gen α -DOX1 se induce por moléculas señal como el SA, el NO y el anión O_2^- , que potencian la muerte celular (Ponce de León, *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que las α -DOXs están involucradas en la respuesta de defensa vegetal, generando oxilipinas que probablemente protegen a los tejidos del estrés oxidativo y la muerte celular causada por el patógeno (Ponce de León, *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descrito que las enzimas LOX1 y α -DOX1 de *Arabidopsis* participan en la activación de la SAR y que su efecto es aditivo. Estudios en plantas de *Arabidopsis* mutantes en los genes *LOX1* y *α -DOX1* mostraron que frente a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* los mutantes *lox1* son más susceptible que plantas salvajes y que la activación de la SAR se reduce tanto en los mutantes *lox1* como en mutantes *dox1*. Además, se demostró que el impacto negativo de estas mutaciones en la SAR aumenta en el doble mutante *lox1 dox1* sugiriendo la acción aditiva de LOX1 y α -DOX1 en la vía de producción de oxilipinas para lograr un máximo de resistencia tanto en la zona de infección como en tejidos alejados de la misma (Vicente, *et al.*, 2012).

En *Arabidopsis* y tomate se encontró una segunda α -DOX, denominada α -DOX2, involucrada en el desarrollo vegetal. La α -DOX2 no se induce frente a la infección con patógenos (Hamberg, *et al.*, 2005) y su expresión se observa en hojas en etapas tempranas del desarrollo, la cual disminuye a medida que las plantas maduran. Plantas de tomate con mutaciones en α -DOX2 muestran un retraso en el desarrollo acompañado por la acumulación de antocianinas en cotiledones y hojas jóvenes. En plantas senescentes se detectaron cambios como el desprendimiento de las hojas, así como también la acumulación de antocianinas en hojas (Bannenberg, *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la expresión de α -DOX2 en plantas salvajes es necesaria para el crecimiento normal de plantas de tomate. Estudios en los que se complementa un mutante en α -DOX2 de tomate con la α -DOX2 de tomate o *Arabidopsis* demostraron que en ambos casos se restauró el fenotipo salvaje. Sin embargo, aunque mutaciones en la α -DOX2 de tomate provocan cambios en el desarrollo, mutaciones en la α -DOX2 de *Arabidopsis* no provocan consecuencias visibles en el fenotipo (Bannenberg, *et al.*, 2009), sugiriendo que la importancia de α -DOX2 en el desarrollo de la planta es específico de la especie.

1.2 El musgo *Physcomitrella patens* como sistema modelo

Los musgos son briofitas que divergieron aproximadamente hace 450 millones de años de las plantas vasculares a partir de un ancestro común (Figura 3). Por este motivo el musgo *Physcomitrella patens* (*P. patens*) es un buen modelo para estudiar la evolución de diferentes procesos biológicos en plantas terrestres.

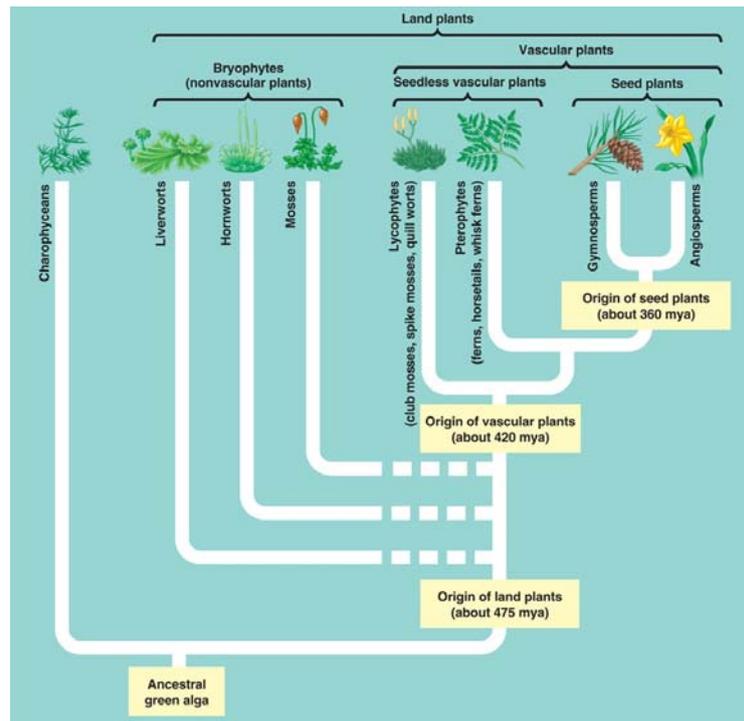


Figura 3. Cladograma de plantas, se muestran los tiempos estimados de divergencia a partir de un ancestro común. Mya: millones de años atrás.

(http://greatneck.k12.ny.us/GNPS/SHS/dept/science/krauz/bio_h/images/29_07PlantPhylogeny_L.jpg)

Una característica destacable en el ciclo de vida de los musgos es la predominancia de la fase gametofítica haploide que alterna con una fase esporofítica diploide. El gametofito haploide se caracteriza por dos estados de desarrollo distintos: 1) el protonema, que representa la etapa juvenil, es una estructura filamentososa formada por dos tipos celulares denominados cloronema y caulonema; y 2) el gametóforo, que representa la etapa adulta, está formado por un vástago fotosintético, hojas, las estructuras reproductivas (arquegonias y anteridios) y los rizoides. El esporofito se forma a partir del cigoto fecundado en el que maduran las esporas haploides que serán liberadas (Figura 4) (Schaefer, *et al.*, 2001; Reski, 1998).

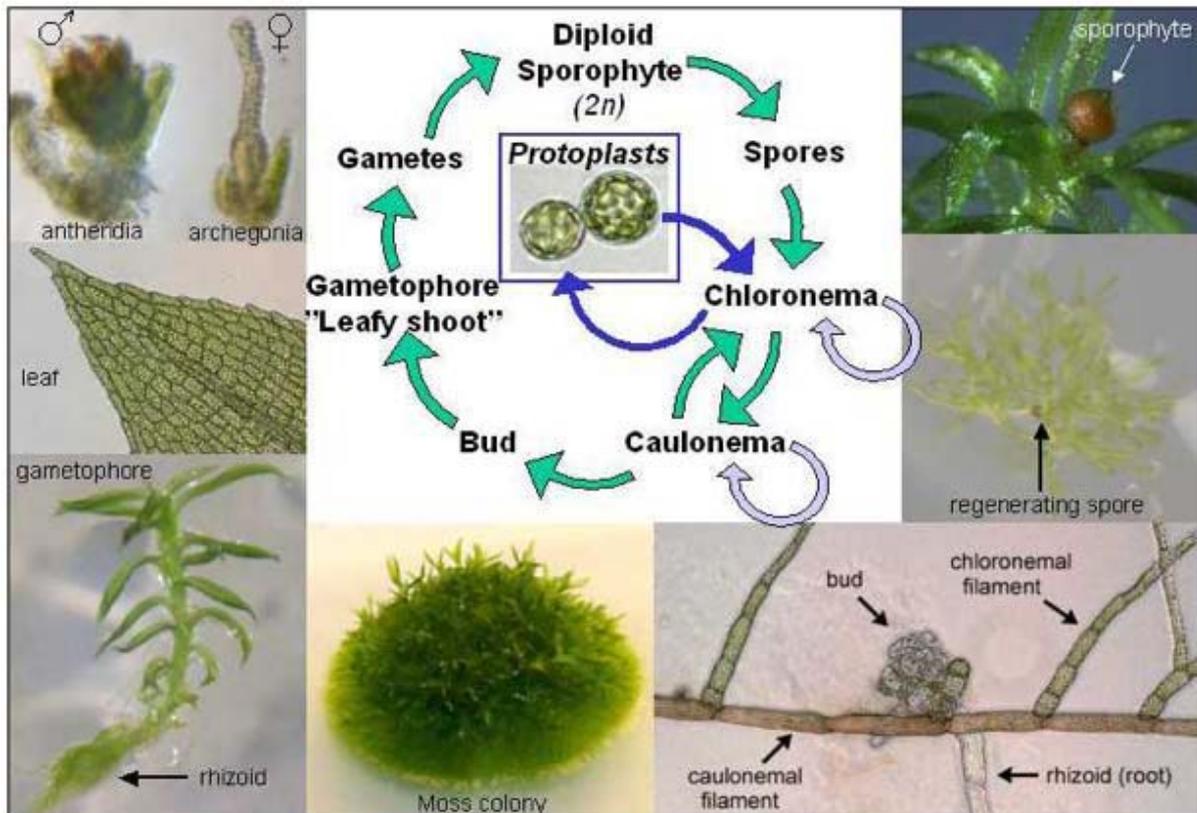


Figura 4. Ciclo de vida de *P. patens*. En la fase haploide, el gametofito produce los órganos sexuales masculinos (anteridios) y femeninos (arquegonios). Las células sexuales masculinas (anterozoides) y las células sexuales femeninas (oosfera) se producen por mitosis. Luego de la fecundación se forma un pequeño esporofito diploide dependiente del gametofito. En la cápsula del esporofito se forman las esporas, haploides, que se liberan al alcanzar la madurez. Luego de ser liberadas germinan y forman filamentos que se denominan protonema y se forman nuevos gametofitos (www.cfg.uu.se/models_Physcomitrella.html).

Las primeras células en emerger a partir de una espora son las del cloronema, las cuales también pueden surgir de filamentos ya existentes o de tejido dañado. Las células del cloronema tienen tabiques perpendiculares al eje del filamento principal. Las células del caulonema contienen menos cloroplastos que las del cloronema y los tabiques se encuentran oblicuos al eje del filamento principal (Figura 5). Tanto las células del cloronema como las del caulonema presentan crecimiento apical, es decir que la expansión de las células se encuentra restringida a una única región de la célula, el ápice (Mendand, *et al.*, 2007; Furt, *et al.*, 2012; Jang & Dolan, 2011). Una vez que las células del cloronema surgen de la espora se da su transición a células del caulonema. Esta transición está regulada por factores ambientales como la luz y la disponibilidad de nutrientes así como también por auxinas (Vidali & Benzanilla, 2012).

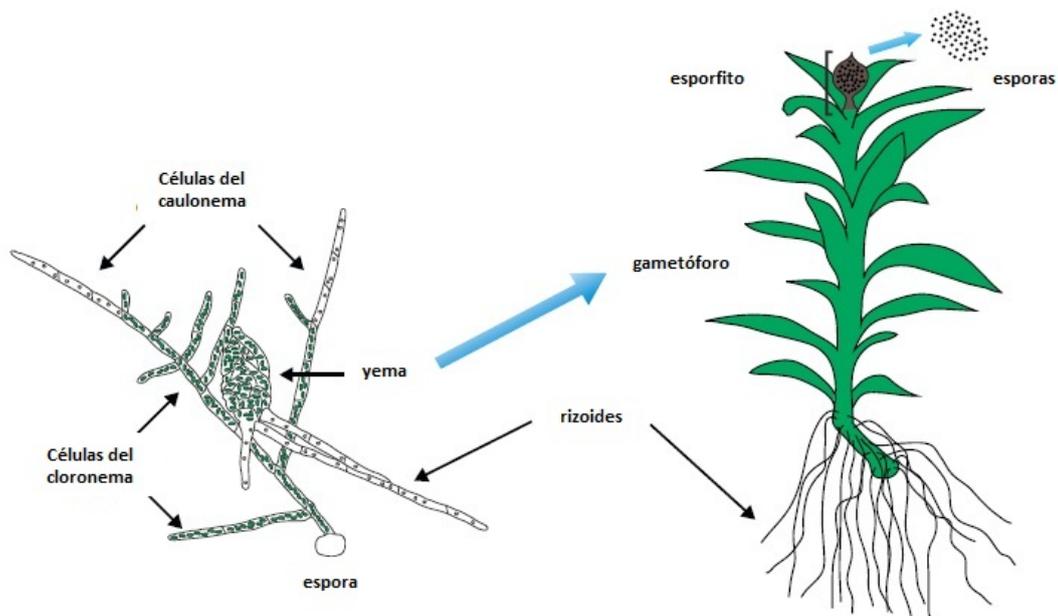


Figura 5. Representación esquemática de los tejidos y células de *P. patens*. Extraído y adaptado de Vidali & Benzanilla, 2012.

El genoma de *P. patens* ha sido secuenciado, es de libre acceso desde el 2007 (Rensing, *et al.*, 2008, http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html) y está organizado en 27 cromosomas (Reski, *et al.*, 1994). El tamaño del genoma de *P. patens* es de 480 Mb (Rensing, *et al.*, 2008), alrededor de cuatro veces el tamaño de *Arabidopsis thaliana* (125 Mb) y de un tamaño similar al del arroz (420-466 Mb). El genoma contiene aproximadamente 27.949 genes que codifican para proteínas (Lang, *et al.*, 2008).

P. patens presenta una respuesta similar a la de plantas vasculares frente a diversos estímulos ambientales como luz y temperatura y frente a factores de crecimiento como las auxinas y el ácido abscísico (Knight, *et al.*, 1995; Paponov, *et al.*, 2009). Además, *P. patens* se utiliza como modelo para el estudio de las respuestas al estrés abiótico ya que es muy tolerante frente al estrés salino y osmótico (Frank, *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de defensa que se activan en este musgo frente a la infección con distintos patógenos. En los últimos años *P. patens* ha surgido también como una fuente de genes para aumentar la tolerancia a diferentes tipos de estrés, transfiriendo genes de *P. patens* a plantas de interés agrícola. Dado que se sugiere que *P. patens* es más resistente a patógenos (Lawton & Saidasan, 2009), resulta una planta

interesante como fuente de genes que aumenten la resistencia de los cultivos a enfermedades causadas por patógenos.

Estudios recientes revelan que varios de los mecanismos de defensa están conservados entre *P. patens* y plantas vasculares (Ponce de León, 2011, Ponce de León & Montesano, 2013). Se ha demostrado que dos patógenos de plantas vasculares como la bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) (ex *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) y el hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) son capaces de infectar *P. patens* y pueden inducir una respuesta de defensa la que se evidencia por la inducción de genes que codifican para proteínas con homología a PR-1, chalcona sintasa (CHS), fenil-amonioliasa (PAL) y lipoxigenasa (LOXs) de plantas vasculares. Se observó que tanto el tratamiento con el filtrado de cultivo (CF) de la bacteria *Pcc*, el cual contiene los elicitores que activan la defensa vegetal, como con esporas de *B. cinerea*, generan muerte celular de los tejidos de *P. patens* con características de PCD como el colapso del citoplasma, la acumulación de compuestos fenólicos y el amarronamiento de los cloroplastos (Ponce de León, *et al.*, 2007). Se ha observado que tras el tratamiento de *P. patens* con esporas de *B. cinerea* se acumulan ROS en las células infectadas. Mediante ensayos con “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling” (TUNEL) se confirmó que *B. cinerea* induce PCD en los tejidos de *P. patens*, en particular en células infectadas por las hifas del hongo (Ponce de León, *et al.*, 2012). También se ha demostrado que luego de la infección de *P. patens* con *B. cinerea* aumentan los niveles de SA, sugiriendo que esta hormona cumple un rol en la defensa de este musgo (Ponce de León *et al.*, 2012). Sin embargo, *P. patens* no es capaz de sintetizar JA y solo se acumula el precursor del JA, el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA, 12-oxo-phytodienoic acid) luego de la infección con *B. cinerea* (Ponce de León, *et al.*, 2012). Esta característica difiere de plantas vasculares en las que el OPDA si es metabolizado a JA, y aunque en plantas vasculares el OPDA induce genes de defensa, en *P. patens* podría cumplir un rol central en la respuesta frente a patógenos, incluyendo *B. cinerea* (Ponce de León, *et al.*, 2012).

También se demostró que los oomicetes *Pythium irregular* y *Pythium debaryanum*, los cuales causan el “damping’off” en plantas vasculares, activan una respuesta de defensa en *P. patens* provocando cambios en las células vegetales incluyendo el amarronamiento de las paredes de las células y un cambio en la distribución de los cloroplastos. Se observó la inducción de genes de defensa como los que codifican para

LOXs, enzimas que participan en la síntesis de JA, CHS y PAL que participan en la vía de los fenilpropanoides (Oliver, *et al.*, 2009). Además, la infección con estos oomicetes induce la acumulación del OPDA demostrando la activación de la vía de oxilipinas derivadas de las LOXs (Oliver, *et al.*, 2009).

1.2.1 Estudios de Genética Reversa en el musgo *Physcomitrella patens*

A diferencia de la Genética Directa en donde a partir de una función o característica conocida se busca el gen responsable de la misma, en la Genética Reversa a partir de la información de secuencia de un gen o proteína en particular, se busca o se genera una mutación que ayude a identificar la función de ese gen o proteína. Las alteraciones genéticas más frecuentemente generadas son la inactivación o la sobreexpresión del gen en estudio. La inactivación puede darse por introducción de mutaciones en sitios específicos, mediante silenciamiento génico, disrupción de la estructura génica o delección del gen o “Knockout” (KO) (Kamisugi, *et al.*, 2006). En el caso de *P. patens*, la sobreexpresión del gen o su inactivación, se ve facilitada por el proceso de recombinación homóloga con frecuencias elevadas, similares a las observadas en levaduras (Schaefer, 2002). Al transformar con construcciones conteniendo secuencias genómicas de la planta, estas son dirigidas con alta frecuencia al locus genómico relacionado, inactivando el mismo por “target gene replacement” (TGR). El TGR consiste en la inserción de un “cassette” de selección en la secuencia del gen que se quiere modificar. Para esto se realiza una construcción en la que el “cassette” de selección se encuentra flanqueado por secuencias homólogas al gen (Figura 6) (Quatrano, *et al.*, 2007). La recombinación homóloga se usa para generar disrupciones génicas dirigidas o TGR mediante el reemplazo del gen salvaje por el alelo mutado. Luego de la transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG), la integración de ADN foráneo en *P. patens* se da predominantemente por recombinación homóloga (Schaefer, 2001). Cuando ocurre recombinación homóloga, el locus genómico es reemplazado por la construcción (Quatrano, *et al.*, 2007).

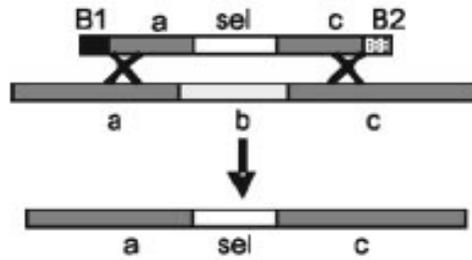


Figura 6. Mecanismo de TGR. El fragmento transformado se integra por recombinación homóloga en ambos extremos del vector. Sel: cassette de selección. (Kamisugi, *et al.*, 2006)

En las transformaciones pueden existir productos no deseados en los que el TGR no ocurre correctamente como es el caso de la inserción de la construcción sin la delección del locus a ser mutado. Esto ocurre cuando en uno de los extremos se da la recombinación homóloga y en el otro sucede un evento denominado “non-homologous end-joining”. También puede ocurrir un fenómeno denominado concatenación que consiste en la inserción en forma consecutiva de varias construcciones (Kamisugi, *et al.*, 2006). Por esto es importante realizar ensayos para descartar la ocurrencia de estos fenómenos.

1.2.2 Antecedentes en el estudio de la enzima α -DOXs en *P. patens*

A diferencia de lo que ocurre en plantas vasculares donde existen varios genes que codifican para α -DOXs, en *P. patens* existe un solo gen que codifica para una α -DOX cuya secuencia aminoacídica deducida presenta una alta homología a las α -DOXs de plantas vasculares (49-53% de identidad) (Figura 7A), ubicando a la α -DOX de *P. patens* en un grupo filogenéticamente distinto (Figura 7B) (Hamberg, *et al.*, 2005).

Estudios donde se incubaron extractos, que contienen la enzima α -DOX, de *P. patens* con ácidos grasos cuyo largo de cadena varía entre C12 a C20 y en los que la obtención del ácido 2-hidroperoxi se determinó mediante GC-MS, demostraron que el ácido palmítico (C16:0) es el sustrato preferido por esta enzima (Figura 8) (Hamberg, *et al.*, 2005). Este resultado no coincide con lo observado en tabaco y *Arabidopsis* en los que el sustrato preferido por la α -DOX es el ácido oleico (Hamberg, *et al.*, 2005). Por otro lado se obtuvo la α -DOX de *P. patens* recombinante tras infectar células de insecto “High Five” con baculovirus transfectados con una construcción en la que se encuentra clonado el ADNc de *Pp* α -DOX (Hamberg, *et al.*, 2006). Mediante GC-MS se determinó que al usar el ácido 3-oxalinolenico, los productos mayoritarios de la reacción catalizada por la α -DOX recombinante son el 6,9,12-pentadecatrienol y 6,9,12-pentadecatrienyl formiato. Lo mismo se realizó para la α -DOX1 de *Arabidopsis* obteniéndose resultados similares aunque se observó que *Pp* α -DOX es un 20% más activa que *At* α -DOX en la oxigenación del ácido 3-oxalinolenico (Hamberg, *et al.*, 2006).

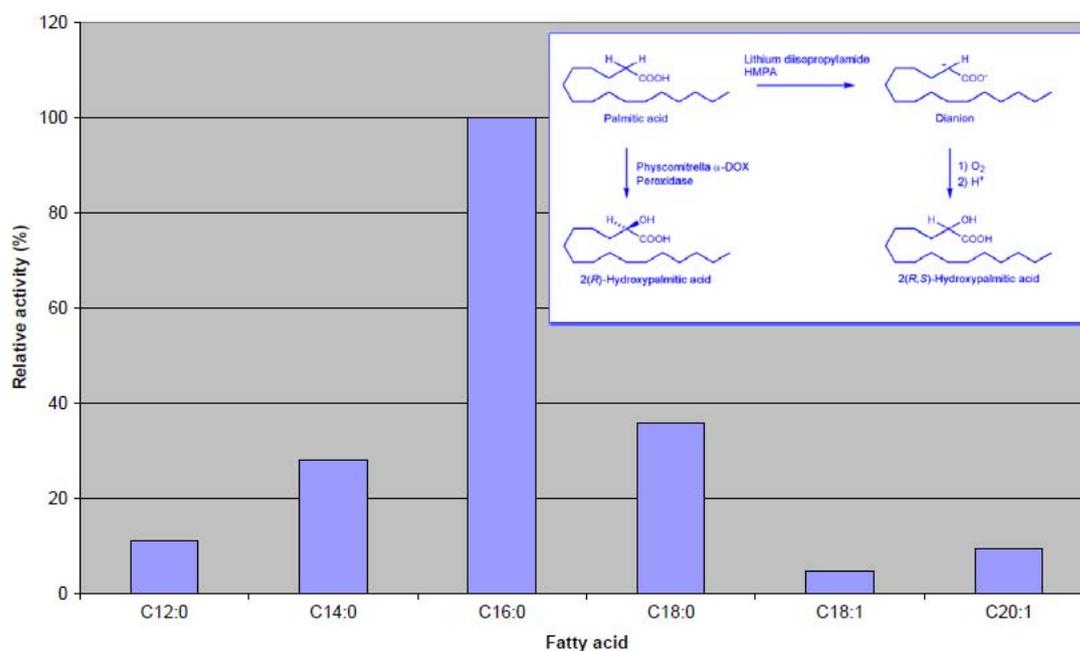


Figura 8. Oxidación de ácidos grasos por medio de la α -DOX de *P. patens*. Homogenizados de *P. patens* fueron incubados a 23°C durante 30 minutos con ácidos grasos C12-20 (300 μ M) y la cantidad obtenida del ácido graso 2-hidroperoxi correspondiente se determinó mediante GC-MS. Recuadro: oxidación de C16:0 mediante la α -DOX de *P. patens* y síntesis química del ácido 2-hidroxipalmítico (Hamberg, *et al.*, 2005).

El análisis del patrón de expresión de la α -DOX de *P. patens* han demostrado que este gen se expresa con tratamientos que inducen la PCD, incluyendo el CF de la cepa SCC1

de *Pcc*, esporas de *B. cinerea* y varios ROS, lo cual sugiere un posible rol de estas enzimas en este proceso (Castro, 2006).

Con el fin de estudiar la función que cumple la α -DOX en *P. patens*, se obtuvo en nuestro laboratorio un mutante KO para el gen *Pp α -DOX*, el cual se denominó *Pp α -dox* (Castro et al., datos no publicados y Castro, 2006). Este mutante presentó una actividad α -DOX residual de 17 % (Hamberg, et al., datos no publicados). Se generó en nuestro laboratorio una construcción conteniendo la α -DOX bajo el promotor constitutivo de la Ubiquitina (pTHUbi-DOX) para complementar el mutante *Pp α -dox* (Machado, 2010). Mediante esta complementación se observó que frente al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc* existe una disminución significativa de la muerte celular en plantas mutantes *Pp α -dox* complementadas comparado con plantas KO (Machado, 2010). Estos resultados sugieren que los productos generados por la α -DOX de *P. patens* podrían estar involucrados en la protección de la muerte celular causada por patógenos al igual que ocurre en plantas vasculares. Recientemente se obtuvo un mutante KO para el gen *Pp α -DOX*, el cual presenta actividad α -DOX nula (Castro, et al., datos no publicados), el cual está siendo analizado en mayor detalle con respecto a su respuesta de defensa a patógenos.

Estudios de la expresión del gen *Pp α -DOX* frente a diversas condiciones de estrés abiótico muestran que éste también se induce levemente por estrés salino (NaCl), no se induce en respuesta a factores de estrés osmótico como ABA y manitol, y se induce fuertemente frente al tratamiento con auxinas (2,4D) (Castro, 2006).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el análisis funcional del gen *Pp α -DOX* de *Physcomitrella patens*.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtener una planta transgénica de *P. patens* con el gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) fusionado a *Pp α -DOX*.
- 2) Analizar la expresión de *Pp α -DOX*/GUS en los diferentes tejidos y en respuesta a auxinas y patógenos.
- 3) Realizar la sobreexpresión de *Pp α -DOX* en *P. patens*.
- 4) Analizar el fenotipo de los sobreexpresantes obtenidos en relación a su desarrollo y su respuesta a patógenos en comparación con plantas salvajes.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

El musgo *P. patens* tipo salvaje (Schaefer *et al.*, 1991) se utilizó 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 & Cove, 1977) y en algunos casos cubiertos con discos de celofán estéril. *P. patens* se creció 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 Condiciones de cultivo que favorecen el desarrollo del caulonema

Para analizar el desarrollo del caulonema, las colonias de *P. patens* se crecieron en medio BCDTA suplementado con 0.15 M de glucosa durante 10 días. Luego se colocaron las placas hacia abajo y en oscuridad y así se crecieron las colonias durante 10 días más (Olsson, *et al.*, 2003).

3.1.3 Cepa y cultivo de microorganismos

3.1.3.1 *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa DH10B 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). 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”).

La cepa DH10B de *E. coli* se incubó en medio LB a 20°C hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0.3. 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 200 µL en nitrógeno líquido. Las células competentes se almacenaron a -80°C y fueron chequeadas con ADN plasmídico de concentración conocida. La eficiencia de transformación de las células competentes que se utilizaron en este trabajo fue de 1×10^6 ufc/mL. Las células de *E. coli* transformadas se incubaron 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 competentes 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. Estas fueron incubadas a 37° durante toda la noche.

3.1.3.2 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Se utilizó la cepa SCC1 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) (ex *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Rantakari, *et al.*, 2001). Las bacterias se cultivaron 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 a 600 nm de 1.9-2.0). El cultivo bacteriano fue centrifugado a 3000g por 10 minutos, y el sobrenadante fue esterilizado por filtración con filtros de 0,2 µm y conservado en alícuotas a -20°C.

3.1.3.3 *Botrytis cinerea*

El hongo *Botrytis cinerea* fue crecido en medio “Potato Dextrose Agar” (PDA) [PDB comercial (Applichem); 1.5% agar]. Las esporas se recogieron a partir de cultivos de aproximadamente 3 semanas, se resuspendieron en H₂O mQ (bidestilada) y se contaron

en una cámara Improved-Neubauer. Para inocular se utilizaron dos concentraciones, 5×10^5 esporas/mL y 1×10^5 esporas/mL.

3.2 Vectores y construcciones

Se utilizaron los siguientes vectores de clonación

- **pGEM-T Easy** (Promega): vector diseñado para el clonado de fragmentos de PCR generados por la enzima Taq polimerasa ya que posee un nucleótido de timina protuyente en posición 3' (Figura 9). Este vector se utilizó para el clonado de un fragmento 3' de la región 3' UTR de *Ppα-DOX*.

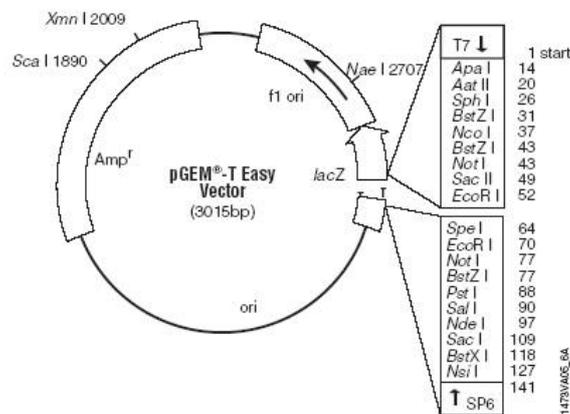


Figura 9. Mapa del vector pGEM-T Easy.

- **pTN83**: vector de transformación (pGUS-NPTII; número de acceso AB538275Ñ pedido al Physcobase) (Figura 10). Este plásmido posee el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima β-glucuronidasa (GUS) y el “cassette” de selección que confiere resistencia a kanamicina. También tiene incorporados dos sitios de multiclonado, uno en posición 5' respecto al gen *uidA* y otro 3' respecto a la secuencia del “cassette” de selección. Este plásmido se utilizó para el análisis de la expresión de *Ppα-DOX*. Para obtener la construcción para la transformación se clonó un fragmento 5'DOXGUS correspondiente al último exón de *Ppα-DOX*, eliminando el codón stop (1000 pb), en posición 5' respecto del gen *uidA*. Para ello, el plásmido se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacII*. También se clonó un fragmento 3'DOXGUS de la región 3' UTR de *Ppα-DOX* (990 pb) en posición 3' respecto de la secuencia del “cassette” de selección. Esto se hizo utilizando la enzima *PstI* del vector.

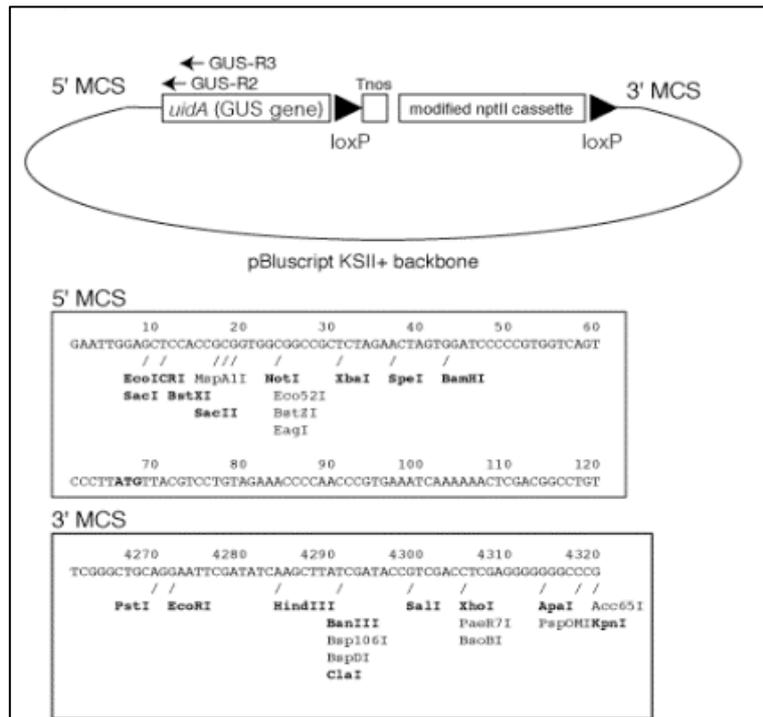


Figura 10. Mapa del vector de reemplazo pTN83.

- **pTHUbi-DOX** (Machado, 2010; trabajo final de la Licenciatura en Bioquímica): Este vector se utilizó para la sobreexpresión de *Ppα-DOX* en *P. patens* (Figura 11). En el plásmido pTHUbi-DOX se encuentra clonado el ADNc de *Ppα-DOX* bajo el control del promotor constitutivo de la ubiquitina (proveniente de maíz). Este plásmido se obtuvo a partir del vector pTHUbi cedido por Pierre-Francois Perroud, Universidad de Washington, USA. Posee un “cassette” de selección que confiere resistencia a hygromicina (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 & Zrýd, 1997).

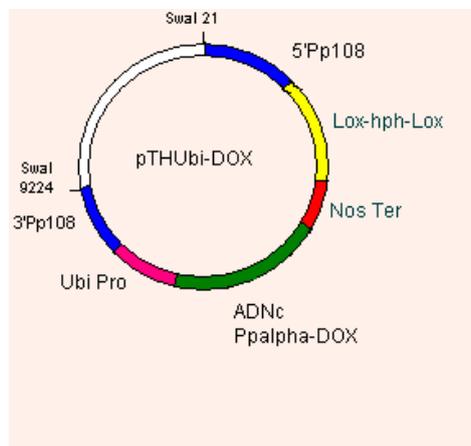


Figura 11. Esquema del plásmido pTHUbi-DOX

3.3 Tratamientos

3.3.1 Tratamientos con microorganismos fitopatógenos

Se trataron colonias de *P. patens* salvajes, sobreexpresantes de *Pp α -DOX* (OEDOX) y transgénicas α -DOX/GUS con el CF de *Pcc* SCC1 y como control se utilizaron colonias sin tratar o tratadas con agua. La inoculación con *B. cinerea* se realizó con suspensiones de esporas con concentraciones de 5×10^5 esporas/mL y 1×10^5 esporas/mL. Como control se utilizaron colonias sin tratar o tratados con agua según se indica en las figuras. Los tratamientos se realizaron rociando con un atomizador (aproximadamente 150 μ L por colonia) colonias crecidas en medio BCDAT con celofán durante aproximadamente tres semanas.

3.3.2 Tratamiento con auxinas

Se trataron colonias de *P. patens* transgénicas α -DOX/GUS con ácido α -naftaleno acético (NAA, α -naphthalene acetic acid) 5 μ M. Los tratamientos se hicieron incorporando este compuesto al medio de cultivo luego de tres semanas de crecidas las colonias en medio BCDAT. Los análisis se realizaron a 1, 2 y 3 días post-tratamiento.

3.4 Modificaciones generales del ADN

3.4.1 Digestiones con 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 *GenCatch (TM) Gel Extraction Kit* o *GenCatch (TM) PCR Cleanup* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA).

3.4.2 Ligaciones

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 20 μ L 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 toda la noche a 16°C.

3.4.3 Defosforilación de vectores

Para evitar la religación del vector digerido mediante la T4 DNA ligasa, 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 h a 37°C. Posteriormente el ADN se limpió usando el kit *GenCatch (TM) PCR Cleanup* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA).

3.4.4 Fosforilación de productos de PCR

Para mejorar la eficiencia de la ligación, previo a la digestión del producto de PCR generado con *pfu polimerasa*, este puede ser fosforilado. Se realizó la fosforilación del producto de PCR 5'DOXGUS con 10 U de *T4 PNK* (*T4 Polynucleotide Kinase*) (New England Biolabs) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.4.5 Relleno con la polimerasa *Klenow*

En ocasiones los fragmentos de ADN digeridos necesitan tener extremos romos para poder ligarlos a los extremos romos de un vector. Para ello se rellenaron con polimerasa *Klenow* aquellos sitios de restricción con extremos cohesivos. Para las reacciones se utilizaron 10 U de la polimerasa *Klenow* (Fermentas), buffer 1X, 10-20 μ M dNTPs e incubación a 37°C por 30 minutos.

3.5 Preparación y análisis de ácidos nucleicos

3.5.1 Obtención de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico a pequeña escala se realizaron a partir de cultivos líquidos de 3-5mL en medio LB y el antibiótico correspondiente. Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 13000 rpm y el pellet bacteriano se resuspendió en 300 μ L de buffer 1 (50 mM tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 μ g/mL RNAsa). Se agregaron 300 μ L de buffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregó 300 μ L de buffer 3 (3.0 M KAc pH 5.5) y se incubó 5 minutos en hielo. Luego se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. El ADN plasmídico se precipitó 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 H₂O. También se utilizó el kit comercial de extracción

GenCatch (TM) 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 (TM) Plasmid DNA Midiprep* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA).

3.5.2 Obtención de ADN a partir de tejidos vegetales

Las extracciones de ADN genómico de *P. patens* se realizaron a partir de tejidos de *P. patens* correspondientes a 3-4 placas crecidas en estadio de protonema de 15-20 días. Las plantas se maceraron en N₂ líquido y se resuspendieron en 15 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 10 mM β-mercaptoetanol) y 1 mL de SDS 20% con agitación suave. Las muestras se incubaron a 65°C durante 15 minutos e inmediatamente se agregaron 5 mL KAc 5 M y se mezclaron suavemente. Luego, se incubaron las muestras a 0°C por 30 minutos y se centrifugaron por 30 minutos a 7000 rpm. Se agregaron 10 mL de isopropanol a los sobrenadantes, se mezcló e incubó a -20°C durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos y los pellets se lavaron con 1 mL de EtOH 70% y se secaron a temperatura ambiente. A continuación se resuspendieron con 450 μL de TE (10-1) y 50 μL de NaCl 3 M y se incubaron por 30 minutos a 37°C con 2 μL de RNasa (10mg/mL). Luego se procedió a la purificación del ADN a través de una extracción con fenol y dos extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el ADN con 0.8 volúmenes de isopropanol y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm. Los pellets se lavaron con 0.5 mL de EtOH 70%, se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 μL de H₂O. Se controló una alícuota de la preparación en un gel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio (BrEt) incorporado para visualizar la calidad del ADN; y la concentración y la pureza se estimaron utilizando un Nanodrop modelo Nanodrop1000 spectrophotometer Thermo scientific.

3.5.3 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). De tres a cuatro placas de colonias de *P. patens* de aproximadamente tres semanas se maceraron en N₂ líquido y resuspendieron 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 homogenizaron en vortex durante 3 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 se precipitaron con 0.1 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH 96% a -20°C durante toda 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 toda 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 toda 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.

3.5.4 Recuperación 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 (TM) Gel Extraction Kit* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA) o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa teñidos con BrEt 500ng/mL, utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M) A las muestras se les agregó buffer de carga 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*.

3.5.6 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes

Se mezclaron 10 µg de ARN total con una solución conteniendo formaldehido 2.2M, formamida al 50% (v/v), 1X buffer MOPS pH 7.0 [0.2M MOPS (ácido 3-N-morfolinopropansulfónico), 0.05M NaAc, 0.01M EDTA] y BrEt 70 ng/µL. Posteriormente, los ARNs se desnaturalizaron a 55°C durante 15 min y luego se separaron en geles de agarosa desnaturalizante con formaldehido 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.

3.5.7 Análisis por “Northern blot” con sistema quimioluminiscente

Diez μg de ARN total se separaron en geles de agarosa desnaturizante y transfirieron a membranas de nylon (Hybond -N+, Amersham, GE Healthcare) mediante capilaridad en solución SSC (Standard Saline Citrate) 20X [NaCl 1.5 M y $\text{Na}_3\text{citrato}$ 150 mM] (Sambrook et al. 1989). A continuación el ARN se fijó a la membrana mediante horneado a 120°C durante 45 minutos.

La ribosonda se generó utilizando el *DIG RNA labeling kit* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). El plásmido conteniendo el ADNc de *Ppa-DOX* se linearizó con la enzima *XhoI* y luego se purificó a partir de gel (3.5.4). La reacción de marcado se realizó en un volumen final de 20 μL durante 2 h a 37°C utilizando T3 polimerasa 2 U/ μL , buffer de transcripción 10X, mezcla de dNTPs marcados con dioxigenina-11UTP 10X y 1 μg de ADN molde. Para finalizar la transcripción se agregó 2 μL de EDTA 0.2 M, pH 8.0 a cada tubo de reacción. La concentración de la sonda se estimó sembrando diluciones en membrana de nylon, junto con diluciones de un control estándar y procediendo a la etapa de detección y exposición tal como indica el fabricante.

La membrana se prehibridó durante 2 h a 68°C con solución de formamida al 50% (v/v) 5X SSC, 0.2% SDS, 0.125 g de leche descremada en polvo, y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de esperma de salmón desnaturizado. Posteriormente, se agregó la ribosonda previamente desnaturizada a 68°C y se incubó toda la noche a 68°C . A continuación se realizaron dos lavados de 15 min con solución 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente y dos lavados de 15 min con solución 0.5X SSC, 0.1% SDS a 68°C . Se procedió a la detección utilizando el *DIG Luminescent Detection Kit* (ROCHE, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El sistema de detección utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, que se visualizó mediante incubación con el sustrato alcalino quimioluminiscente CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 3,7]decan}-4-yl) phenyl phosphate). Finalmente se expuso la membrana a film de rayos X KODAX durante 3 h a 37°C y se reveló incubando durante 5 minutos en revelador manual Revematic (Química MediQ) y 5 minutos en fijador Fixomatic (Química MediQ).

3.5.8 Análisis por Southern blot

La integración de la construcción α -DOX/GUS en el genoma de *P. patens* se confirmó mediante Southern blot. Para esto 10 μ g de ADN genómico de plantas salvajes y transgénicas se digirió con la enzima *StyI*. El ADN digerido se separó en gel de agarosa 0.8%. Una vez finalizada la corrida el gel se expuso 5 minutos a luz UV y se realizaron cuatro lavados: el primero con una solución desnaturante (NaOH 0.5 M; NaCl 1.5 M) durante 30 minutos; el segundo y tercer lavado con una solución neutralizante (Tris-HCl 1 M; NaCl 1.5 M; pH 8) cada uno de 15 minutos y el último con SSC 20X por 20 minutos. Luego se procedió a realizar la transferencia a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham, GE Healthcare) mediante capilaridad en solución SSC 20X (Sambrook, *et al.*, 1989). Luego el ADN se fijó a la membrana mediante horneado a 120°C durante 45 minutos.

La sonda radiactiva de ADN se sintetizó a partir de un fragmento obtenido de la digestión del plásmido pTN83-DOXGUS con la enzima *StyI*, que libera un fragmento de 1800 pb correspondiente a la región 3' del gen *nptII* y a 900 pb aproximadamente del fragmento 3'DOXGUS, utilizando α -[³²P]dCTP y los kits *Ready-to-go DNA Labelling Beads (-dCTP)*, GE Healthcare e *Illustra MicroSpin G-25 Columns*, GE Healthcare. La sonda se desnaturizó a 95°C durante 10 minutos, antes de ser añadida a la mezcla de hibridación. La membrana se prehibridó durante 2 h a 65°C con una solución 6X SSC, 0.5% SDS, 0.125 g de leche en polvo, 15 μ g/mL de esperma de salmón desnaturizado. A esta solución se le agregó la sonda marcada con α -[³²P]dCTP previamente desnaturizada a 95°C y la hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C. A continuación se realizaron dos lavados de 30 minutos con una solución 5X SSC, 0.1% SDS a 65°C y dos lavados de 30 minutos con una solución 2X SSC, 0.1% SDS a la misma temperatura. Finalmente se expuso la membrana a film de rayos X KODAX durante distintos tiempos a -80°C y se reveló incubando durante 5 minutos en revelador manual Revematic (Química MediQ) y 5 minutos en fijador Fixomatic (Química MediQ).

3.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se hicieron con el aparato PxE Thermal cycle de la casa comercial Thermo electron corporation.

3.6.1 Amplificación por PCR de las regiones 5' y 3' del gen *Ppα-DOX* para la generación de la construcción de reemplazo pTN83-DOXGUS

Para la amplificación del fragmento denominado 5' DOXGUS correspondiente al último exón de *Ppα-DOX*, se diseñaron los oligonucleótidos específicos DOXGUS5'fw (cebador sentido) y DOXGUS5'rv (cebador antisentido). La PCR se realizó a partir del plásmido pBSKS-DOX1.5 (Castro, 2006), el cual tiene clonado la secuencia genómica de *Ppα-DOX*. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µL utilizando 1.25 U de *Pfu* DNA polimerasa (Fermentas), 1X *Pfu* buffer, 2mM MgSO₄, 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cada cebador y 10 ng de ADN plasmídico. El programa de PCR utilizado fue: 95°C 3 min; 35 ciclos: 95°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 2 min.; 72°C 10 min. El producto de amplificación se analizó en gel de agarosa 1%, purificó con el *GenCatch (TM) Gel Extraction Kit* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA), fosforiló con T4 PNK, digirió con *SacII* y ligó al vector pTN83. Se transformaron células competentes de *E. coli* DH10B con la mezcla de ligación. La presencia de inserto se verificó mediante restricción con las enzimas *SacI* y *BamHI*, las cuales cortan a ambos lados del sitio de clonado.

Para la amplificación del fragmento denominado 3' DOXGUS de la región 3' UTR de *Ppα-DOX* se diseñaron los oligonucleótidos específicos DOXGUS3'fw (cebador sentido) y DOXGUS3'rv (cebador antisentido). La PCR se realizó en un volumen final de 50 µL, utilizando: 1 U de *Taq* DNA polimerasa (preparada en nuestro laboratorio), 1X buffer, 2mM MgSO₄, 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cada cebador y 100 ng de ADN genómico de *P. patens*. El programa de PCR utilizado fue: 94°C 2 min; 40 ciclos: 94°C 30 seg, 61°C 30 seg, 72°C 1 min.; 72°C 5 min. El producto de amplificación se analizó en gel de agarosa 1%, purificó con el *GenCatch (TM) Gel Extraction Kit* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA) y ligó con el vector pGEM-T Easy (Promega). Se transformaron células competentes de *E. coli* DH10B con la mezcla de ligación. Se verificó la presencia de inserto mediante restricción con *EcoRI*. Posteriormente se digirió el pGEM-T con inserto utilizando la enzima *EcoRI* y el plásmido pTN83-5' DOXGUS con *PstI*. Luego se trataron con *klenow* y se purificaron a partir de gel de agarosa 1% con el *GenCatch (TM) Gel Extraction Kit* (Epoch Biolabs, Missouri City, USA). El plásmido se desfosforiló con *CIAP* (New England Biolabs) y purificó nuevamente a partir de gel. Se ligó el inserto al vector y se transformaron células

competentes de *E. coli* DH10B con la mezcla de ligación. La presencia de inserto se verificó mediante restricción con *HindIII*.

3.6.2 Análisis de líneas transgénicas α -DOX/GUS mediante PCR

Para poder identificar la correcta inserción de la construcción en el ADN genómico de *P. patens* se diseñaron los cebadores DOX3F y 3'DOXUTRrv para la región flanqueante por fuera de la inserción y GUS-R3, Ter-pTN83 y sensenptII los cuales son específicos de la construcción. Como control negativo se utilizó ADN genómico de plantas de genotipo salvaje.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ L. Para confirmar la inserción de la construcción se utilizaron los siguientes juegos de cebadores: DOX3F-GUS-R3 y sensenptII-3'DOXUTRrv. La reacción de PCR contenía: 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Fermentas), 1X reaction buffer, 2.5 mM MgSO₄, 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 μ M de cada cebador y 100 ng de ADN genómico de *P. patens*. El programa de PCR utilizado para el par de oligos DOX3F-GUS-R3 fue: 94°C 5 min; 4 ciclos: 94°C 40 seg, 58°C 40 seg, 72°C 1 min 30 seg; 4 ciclos: 94°C 40 seg, 57°C 40 seg, 72°C 1 min 30 seg; 3 ciclos: 94°C 40 seg, 56°C 40 seg, 72°C 1 min 30 seg; 3 ciclos: 94°C 40 seg, 55°C 30 seg, 72°C 1 min 30 seg; 30 ciclos: 94°C 40 seg, 54°C 30 seg, 72°C 1 min 30 seg; 72°C 10min. El programa de PCR utilizado para el par de oligos sensenptII-3'DOXUTRrv fue: 94°C 5 min; 2 ciclos: 94°C 40 seg, 58°C 40 seg, 72°C 2 min; 2 ciclos: 94°C 40 seg, 57°C 40 seg, 72°C 2 min; 2 ciclos: 94°C 40 seg, 56°C 40 seg, 72°C 2 min; 25 ciclos: 94°C 40 seg, 55°C 40 seg, 72°C 2 min; 72°C 10min.

Los cebadores GUS-R3 y Ter-pTN83 se utilizaron para secuenciar los fragmentos 5'DOXGUS y 3'DOXGUS una vez clonados en el plásmido pTN83.

3.6.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 1. En minúscula se marcan los nucleótidos que fueron modificados para crear los sitios de restricción para las distintas enzimas los cuales se señalan en negrita. En rojo se marcan los sitios que se utilizaron para la clonación de los fragmentos en el vector PTN83.

Tabla 1. Cebadores diseñados para la amplificación de los fragmentos 5'DOXGUS y 3'DOXGUS y para el análisis de las líneas transgénicas.

Nombre	Oligonucleótido (orientación 5'-3')	Enzima de restricción	Tm
DOXGUS5'fw	CGGCAA CcGCGg GCAGTAGC	<i>SacII</i>	66°C
DOXGUS5'rv	GGCTTCTCTGGTGTCTGATTCC		57°C
DOXGUS3'fw	TGTCGTTGATCTCA AGCt TGTAGAG	<i>HindIII</i>	56°C
DOXGUS3'rv	CAATTCACCAGTTCT cTCGAGG ATTC	<i>XhoI</i>	59°C
DOX3F	ACCGGTTACATCCTTTGCTG		55°C
3'DOXUTRrv	GCGGGATGGTATCAACTGTG		56°C
GUS-R3	TCTTGTAACGCGCTTTCCCACCAACGCTGA		66°C
sensenptII	CTACCCGTGATATTGCTGAAGAGC		57°C
Ter-pTN83	AGGGCCATGAATAGGTCTATG		54°C

3.7 Obtención y transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens*

Se transformaron protoplastos de *P. patens* con el plásmido pTHUbi-DOX (Figura 11) o con el plásmido pTN83-DOXGUS (Figura 17) digeridos con las enzimas *SwaI* y *KpnI* respectivamente. Luego de las digestiones con *SwaI* y *KpnI* el ADN se precipitó con dos volúmenes de EtOH absoluto y 1/10 volumen de NaAc 3 M, pH 5.2 incubando a -20°C toda la noche. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C, el pellet se lavó con EtOH 70% y 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. Para obtener los protoplastos se partió de una a tres placas de tejido en estadio de protonema de 10-13 días, que habían sido subcultivadas sucesivamente por lo menos tres veces con intervalos de 7-10 días. El material vegetal se incubó en una solución de D-manitol 8% con Driselasa (SIGMA) 0.2% a temperatura ambiente durante toda la noche. La

digestión se colocó sobre un colchón de sacarosa 0.44 M, se centrifugó a 80 g durante 10 min y se extrajo la interfase donde se encuentran los protoplastos. Se realizaron tres lavados, uno con solución de D-manitol 8% y dos con solución CaPW (D-manitol 8%, CaCl₂·2H₂O 50 mM). Posteriormente se contaron los protoplastos en una cámara de Neubauer, siendo la concentración ideal para la transformación 1.6×10^6 por mL. Luego se resuspendieron en solución 3M (9.1% (0.49 M) D-manitol, 15 mM MgCl₂, 0.1% MES 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 (40% PEG 8000, 8% D-manitol, 1 M Ca(NO₃)₂, 1 M Tris-HCl pH 7.8), y se realizó el shock térmico a 45°C durante 5 min. Luego se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se realizó un lavado con la solución CaPW. Finalmente los protoplastos se resuspendieron 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%) e incubados con luz continua por 7-9 días. La selección se realizó mediante pasaje de los celofanes con protoplastos a placas de medio BCDAT con Hygromicina (Hyg) (SIGMA) 25 µg/mL para la construcción pTHUbi-DOX o Geneticina (G418, SIGMA) 50 µg/mL para la construcción pTN83-DOXGUS.

Para la obtención de protoplastos para analizar el desarrollo de los mismos se realizó el mismo protocolo exceptuando el paso en el que se agregó 3M, PEG y el ADN.

3.8 Análisis de los posibles transformantes

3.8.1 Análisis de plantas transgénicas α-DOX/GUS

La correcta inserción de la construcción se verificó mediante PCR (3.6.2). Los productos de amplificación, tanto del fragmento 5'DOXGUS como 3'DOXGUS, se analizaron en gel de agarosa 1%. Con el objetivo de determinar el número de copias de la construcción en el genoma se realizaron estudios de Southern blot (3.5.8).

3.8.2 Análisis de los sobreexpresantes OEDOX

Los niveles de transcritos de α-DOX de los posibles transformantes se analizaron mediante “Northern blot” (3.5.7) y compararon con los de plantas salvajes. Las

extracciones de ARN de los sobreexpresantes (3.5.3) se realizaron en plantas a las que no se les hizo ningún tratamiento.

3.9 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo

Para determinar el nivel de ploidía de las plantas OEDOX y las transgénicas α -DOX/GUS respecto a plantas salvajes de *P. patens* se realizó citometría de flujo. Para esto se tomó una colonia de cada línea vegetal crecida por tres semanas en condiciones normales y se picó con 1 mL de Woody Plant Lysis Buffer (WPB) [0.2M Tris-HCl, pH 7.5; 4 mM MgCl₂.6H₂O; 2 mM EDTA Na₂.2H₂O; 86 mM NaCl; 1 % Tritón; 10 mM K₂O₅S₂; 1% PVP10]. La suspensión obtenida se incubó 15 minutos en baño de hielo y luego se pasó a través de un filtro de 0.45 μ m. Posteriormente se agregó 50 μ L de RNasa (concentración final: 1 mg/mL) y 50 μ L de yoduro 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 laser Innova 300 de emisión a 488nm (100mW de potencia durante el análisis). La fluorescencia emitida por los núcleos teñidos con Yoduro 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.

La adquisición de los datos y su posterior análisis se efectuó 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 Determinación de la actividad Pp α -DOX

Para realizar las medidas de la actividad Pp α -DOX se enviaron muestras de las distintas líneas sin tratar y tratadas con la cepa SCC1 de *Pcc* al Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia. Dado que los ácidos 2-hidroperóxidos son muy inestables, se miden los niveles del 2-hidroxi palmítico y del aldehído correspondiente (C15) que se producen en las

reacciones catalizadas por la α -DOX mediante GC-MS por el Dr. Mats Hamberg. La suma de los valores del 2-hidroxipalmitico y del aldehído C15, corresponden a la actividad α -DOX. 0.3 g de tejido de plantas salvajes y transgénicas α -DOX/GUS sin tratar y tratadas con la cepa SCC1 de *Pcc* y sobreexpresantes OEDOX se homogenizaron en buffer KPO_4 0.1M, pH 7.4 a 0°C utilizando un Polytron. Este fue filtrado y se incubó con ácido palmítico (C16:0) 200 μM a 23°C durante 30 minutos. Luego se agregaron tres volúmenes de una solución en metanol de metoxiamina-HCl 30 mM y se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incorporó a cada una de las muestras una solución estándar en etanol (d2-3-hidroxi-16:0 6.44 μM y d3-pentadecanal-metoxima 17.44 μM). Las medidas de actividad se llevaron a cabo mediante GC-MS utilizando un detector selectivo de masa Hewlett-Packard modelo 5970B conectado al cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890. Como gas portador se utilizó Helio a una velocidad de 25 cm/s. Las muestras se analizaron por triplicado y como control negativo se incluyeron muestras sin C16:0.

3.11 Medida de muerte celular

Se trataron colonias de *P. patens* rociándolas mediante aspersión, con el filtrado de cultivo (CF) obtenido de la cepa SCC1 de la bacteria *Pcc*. La muerte celular se midió a las 24 h del tratamiento. Para esto se incubaron las colonias de *P. patens* en una solución 0.1% de azul de Evans (AppliChem) durante 30 min. Posteriormente se hicieron cuatro lavados con agua desionizada para remover el exceso de colorante. El colorante unido a las células muertas se solubilizó en 50% de metanol con 1% de SDS 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 (1×10^5 esporas/mL) de *B. cinerea* en solución 0.05% de azul de Evans (AppliChem) durante 2 horas. Posteriormente se hicieron cuatro lavados con agua desionizada para remover el exceso de colorante. El colorante unido a las células muertas se solubilizó en una solución 50% metanol con 1% SDS durante 45 min a 50°C y cuantificó por espectrofotometría a 600nm (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.

3.12 Tinciones para visualizar tejidos vegetales y fitopatógenos

Con el fin de visualizar las células de los distintos tejidos de *P. patens* se realizó una tinción con azul de toluidina 0.05% m/v, el cual tiñe la pared celular. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Marca: Olympus, Modelo: IX81, Cámara CCD: DP71)

Para visualizar el hongo *B. cinerea* se utilizó el colorante solofenil flavina 7 gfe. Para esto se incubaron gametóforos, infectados con *B. cinerea*, con una solución de solofenil flavina 7 gfe 0.1% en agua. Las hojas infectadas se observaron en un microscopio Confocal Leica TCS-SP5.

3.13 Determinación de actividad β -glucuronidasa

Para analizar la actividad β -glucuronidasa (GUS) el tejido vegetal se sumergió en una solución Tris 100 mM pH 7, NaCl 50 mM, Ferrocianuro potásico 2 mM, Tritón X-100 0.5 % y sustrato ácido 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol β -D-glucurónico (X-Gluc) 2 mM y se sometió tres veces a vacío durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se incubaron toda la noche a 37 °C en oscuridad. Tras la incubación, se realizaron sucesivos lavados en etanol 70 y 95 % para eliminar la pigmentación endógena del tejido. Luego el tejido se mantuvo en H₂O. En los tejidos donde hay actividad GUS se observa la aparición de color azul debido a la acción de la enzima sobre el sustrato X-Gluc.

3.14 Análisis estadísticos

Para analizar la muerte celular en las distintas líneas frente a los tratamientos realizados con microorganismos patógenos, el diámetro de las colonias, el largo de los rizoides y el tamaño de las células del caulonema se efectuó una comparación de los promedios por medio de un análisis no paramétrico de variables independientes. Para dicho fin se utilizó el programa estadístico STATISTICA, versión 5.0.

4. Resultados

4.1 Análisis de la expresión de *Ppα-DOX* mediante la utilización del gen reportero *β-glucuronidasa* (GUS)

4.1.1 Obtención del vector de reemplazo para el análisis de la expresión de *Ppα-DOX* mediante la observación de actividad GUS

Con el objetivo de analizar la expresión de *Ppα-DOX* en células y tejidos vegetales se construyó un vector de reemplazo alélico para generar plantas transgénicas en las que el gen *Ppα-DOX* queda fusionado al gen reportero GUS bajo el control del promotor endógeno de *Ppα-DOX*. Para la obtención de la construcción, se utilizó el plásmido pTN83 (Tomoaki Nishiyama & Mitsuyasu Hasebe). Este plásmido posee el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) y el “cassette” de selección que confiere resistencia a kanamicina. También tiene incorporados dos sitios de multiclonado, uno en posición 5' respecto al gen *uidA* y otro 3' respecto a la secuencia del “cassette” de selección.

A partir de la secuencia genómica de *Ppα-DOX* (Figura 12) se diseñaron los oligonucleótidos específicos DOXGUS5' fw (cebador sentido), en el que se creó un sitio de restricción para la enzima *SacII* y DOXGUS5' rv (cebador antisentido), que posee un sitio de restricción para *BamHI*; DOXGUS3' fw (cebador sentido) y DOXGUS3' rv (cebador antisentido).

```
CCTGGATTGGGTATTTATAAAACCGTAAGCCACCTCGGTTGCGACGCTACTGGACATATTTGCTGGCGAAGTGGGTGAAGCGTT
GGTGCTTTATGCGTTTTCGCTAGACAAGCTCGAGTGTGGAGTAACGTTGGGTCAGTTGCTGGGGATCGACAGTGATTGATTGCA
GGTTGAGTTGGTCTCAGAGGGTTTGATCAACATGGGACAAGTTTTCGGAGCTCTGACTTCGTGGATGGTCTCCAGATCTTCG
ACCCACGTACAGACAGATGAGCTTCGTTACGAAACCATGTTTCTCGTGAGCACTACCACCTTCGCCGATGCCCTCGTATGTG
ATTGGATTGTTACACCAAGGAATGTGTCGTTATGTTTCGAAATGCCATGTTTTGAACATCATGCTTCACGTACCATGTCTTTTAG
GTATTGAGGACCGGTCGATTGGCAGATCATAATAAGTTTTCGGGATTCAAGGTTTCGAGACCGGCTCTGTAATGTTTCGACAACC
AAATACTTGATACGACGTTGAACACACTTCAAGTGTAGTAATCTTTCAAATCACATCCATTGCAATTTAAGATACTCCACCAGG
TAGATGCCAACAAAGGAAGTATACTTCTGCTGAATATCCGGAACCTCATCGAATTGTTGCTCTTTTCAAGAACAGAACCGCAGAAA
AGTGACATAGAAGTTTGAAGGTTCTGCTCATTTTAACGGTGATTATGTGCACTGAATGGGTGTTGAACCTTCATGGGGTAGT
TTCTTGGGGCTTACTGTGTAGGGCTGTATCGATGTTCTCGCGCTTCATTATGCATCTTCGTTACAGATGCCTCACTTGGATA
AATTCGCTACTAACAAGCTCGTGATAAATCTGCATCAAACACAGCATGCGTTCCACATGGCCTTTGACGCAAGCGATTGTAGA
TTACTAGTATTGTCTGCAGCAATTCTCTGACACCAGAATCTCTGACTAAAAAACTGAACCATCTCGTCCCCAACAGGTAGTGC
ACTTCTCCGACCGCTTCTGGAGATGGTACAACACCCCTGTTGTGTTGCGGTCTGTTGTACCTGGAACCTTCGACGAACCTTTCAGCA
GAACTACAACCTCATAGCTGTCGGAATGCGAAGGATCGCAATCTCCAGTTCCAACCTCAAGTCAATGGCGGTTGTCAATTA
TATTGATCAACCAGGAAGCAGTAGCCACACCACATTTGATGAGGAAGATTATGCTGGCTTCTTTGGGCGCAACATGGGGCCTCA
AAAGAGCGAGGTGACCTCTCTGACACTTATAATTGATCAATATGGTATAGCTTCTAGGGGCGTAATAGCATTGCGTAAGTAC
TAGAGTTAGCAAACCTGCAAACCTGATCTCTGTTGCTGTTGTGTCAGTCTGGTCAACCCCATCCATCTGTTGTGGCCGCGAAGTT
GCTATCTAGGACGGAATTGAAAGATTACGGAACCAATTTAACATGATAGCTGCTTCATGGATCAACTTCATGATTACGACTG
```

GGTTGATCACCTAGAGGAATTGAGCAAGGTGCAATTCATCATTAGTAACCATGGCTAGAAACTCATGTGCTCACTGATCAA
 TGAAACTCGAACTGAACAGAATCTAACAGTGCCAGTCTGGTGCTCAGGAAGTCGAGATTACGGCTCCACCCTCTGTTTCGGCG
 CAGTGTCTTTGAAGAATTCATGTTTACCCTACGAAGGAGGTTCTGCAGGCAACAACGTGACCGGTCACATCAACTCGAA
 CACCTTGGTGGTACGGTTCCTCTGGGAGGAAGGCTTAATTTCAAATAAAAAATGCCACTAAGCTCTGCTTCCGAAAGACAAGC
 TAATTGAGTAGAATTATGTGTATGTTGTGACGAGCAGGGACGCAAGTGAATCTACGGAAGCACTAAAGAAGCCGAGCGTAAT
 GTTCGAACATTCGAGACGGCAAGCTCAAGGTCGACCAGATGGTTGGCTAATGACCGACGAGGACAACCTCCCGGCTCACTGG
 CGACATCCGCAACCTCTGGGTGCGAGTGCGGATGCTCCAATCTGTTTTATTGCAGAGCACAACATGGTCTGCGATAACAATCAA
 GGTCAGTCACATATGAAGCGCAATTTCTCTCCACACCTTGTAGCCACGACTAGTTGAGGTTAATGCTGCAGACTTGCTGCGC
 GGTGCTGGGACTTACCAACGAATCTCCAAACGTCTCCCGCTTGAACAGAAAGCGCATCCAGACTTCAATGACGAGGAGCTC
 TTCCAGCACGCCAGGGTTGTACTGCTGCGGTTACTCGGAAGATCCACACTATTGACTGGACGCCGAGCTGCTGAAGAAACAAT
 GTCTTGCTCGCAGCAATGCGTGCCAACTGTAAGCTAATGTGCCCTCAATCATCTTTAGAAACGGAGATCACAACGTGCACATG
 AACATTCGAATCTTATGAATGTTGTCTCACGTCCATCATGTTTTACTCACTTCTGCACGAGGCTCTGTCTGCATAGGTATGGAT
 TGTGGGAAAGAGATTCAAGGATACGTTCCGACTACTCTATCTCGCTTTGAGTGGGTTGGTCGGCATGAAGAAACCAAGTGG
 ATCATGGTGTGCCCTACTCACTCACAGAGGAGTTTACAGCAGTGTACCGGTTACATCCTTTGCTGCTGAGAAGATTGACATTA
 GAACATTAAGGCAACCGCGGCGAGTAGCCTACACACACCACCAACCGTAGACGATAAGTCCGTTCTCTGTTGCCAGTTTATC
 GAACATTAACCCATTGACAAGAAGCTCCAAACAAGAAAGGAGTTCAATGATTTGACATTAACATTGGCAGGATTGCTG
 TGCCTGAGCTGCTTGAACAAGGGGAACGACAAGGCACTGAAACTGGGTTGAAGACGCTTCTCACATCTCTAGGACATCAA
 TCCGACGAGCTTTACAATTGTTCAATTACCCTCAATGGATGCGGGAAGTACCTCTCAGAACAGGGACGGTACTGACCGGCCG
 GACAAGTGGACATGGCCAGCCTTGAGATAAGTGTATCATTGTAAGAATATCCAGCATAATTCAGTCTGCGGTGATATAATTG
 TGCATAAGAATATTGCTATCAAGTGTAAAGTGCATTGCAACGTTGCTCTTGCAAGTTTATCGAGACCGGGAGCGCTCTGTGGCTC
 GCTACAACAGTTCCGAAGGAACCTGGTGATGCCACCATTGGGAAGTGGGAAGATTTGACAGAAGACAAGCAAACGCTAGCA
 ATTCTTCGCGAGCTTACGGCAACAATGTGGAGAGCCTTGATTGCTAGTAGGGCTGCTGGTGGAGAAGAAACCCCGAGGTTT
 GCCATCAGCGAGACTGCCTTCGTCATTTTGTCTCATGGCCTCCAGGTGACGGTGTACACGACGCTCAAATTTTATTCATGAGT
 CCATAGAAGTGTGCTGACCCATATTAACCTACTGGTTCCAATCGCTGGCCAATTTGTGTTTCTGTGCAGGCGTTTGAAGCG
 GATCCGCTTTTACTTCACACTTCAACGAAAAAGTGTATACCGAGGAGGGATTGAAGTGGGTGAACACCACGAGGGCCTCAA
 GGATGTGCTGCTGCGCACCATCCCGAGCTGGTGGGAGACTGGATGACGGCATCTTCGGCATTCTCGCTATGGAAATCAGACACC
 AGAGAAGCCGAGTTGGATCCCTTTGTACCTCCGCTGGGCGCGAACTCCCTGCAGCGAGCTCTGAAGACCTACGGCAGACT
 GCCAAAACGAATATGTCGTTGATCTCAAGCTGTAGAGATATAGAGGAAACATAGTTGTCTTAAATTTGATATTGCCTATTGTG
 CATATTGAAAACCCAGTTGTAATTCCTCATCATGAATTCATATCCTTTCTATGCAGTACTTTCAAGTGTGTGCCATTGACTCAT
 TTCTTGACCTGGCTACAGTGAAAGATGTGAAGAGCTTCTCAAAGTTGAGTGCATGTATCGTAACAAGGTTGTTGGCGTACAAAG
 TTTCTGACAAGTTTGTCTGAGAGTTTGCAGACCATGAGAAATACTATGTCCATAGAATACGAAGAAGGCATTTTCAAGACAGTCG
 GTGGTTCTCTGGTGGTTACAGGAATCTGAAGCTGTGGGGGATTGCTCCGAGGTAGATGCGTGCACACGTGATAATTGACAGTC
 TAACTCACTACCCCGACAATTAATTAATTTGTTTGGCATGCACTTCAATTTAAAATACACAGCACTACACTGCACA
 TTTCTATTATTTCTCATAATGAGACCGGGCCACGAGGTGAGGTTCTCGGTGGTTCCGGATGCACAATCCGATGTTTCTAATTG
 ACTGTTGACAGGCAAGACAAGATGAGACGGAATACTTCAACGCTGAAGGTATACTCCGGTGAATACCAAATGAGAAGCA
 TACTGTTACAGTTAGAAGCGGACAAGGACTCGAATGCAAGGACTGAATTACGCACCACCCATGAACAAAACAAATGGAAGA
 TGAACCTGTTAATTTCTTATCGAAATTTAGCTCCGGTTTCTAGGAACGGTTGAGGTGGCCAGTTCTCCACTTGAGAAATTC
 TCTATCCATCGATCAAAAATGTAGTAAGATTTACTAAACTAAGGCAAGAAGAGAAGAACCGGACCGCCAGCTTTGCTACGGCG
 GTAACAGCTGCTTCTTGAAGGCTCTCCAATGTCCAGCAGATAACGATTTCTCGAGTCGGAAGCAAGACGAAATGAATCCT
 CGAGAGAAGTGGTGAATTTGCTGCCTTACTTGGACGCCGGCCACAGTGTGATACCATCCCGCCAAAGCAGACGCCAGCCCGCTG
 AGACCAGCGTGATGGTGTGCGACACGAAGGGTTAGGATCCACAACGGCAAGCGCAATGAAGAGGTCCGCCGTTGGCTA
 TGATGGAAGTACCGCCATTACCCTCTGCAACCTGATGGAGGAAAGTTTTGCCTTCAAGCTTTGATCTGCTCCCGGTTGCTGA
 ATCCTCCATCAACGGGGCAGTGCTTGGTCTCAGACTTACCAGCTTAGCCAAGTGTTTTTGAGCTCTACCTCAGTCTCAAGC
 CCC

Figura 12. Secuencia genómica de *Ppα-DOX*. En verde se señala la región 5'UTR, en celeste los exones, en blanco los intrones y en rosado la región 3'UTR. Las regiones amarillas corresponden a los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región 5'DOXGUS y 3'DOXGUS. Las regiones violetas con letras blancas representan los oligonucleótidos utilizados para chequear la correcta inserción de la construcción.

El primer paso para obtener la construcción fue amplificar un fragmento 5', utilizando los oligonucleótidos DOXGUS5' fw y DOXGUS5' rv, a partir del plásmido pBSKS-DOX1.5 en el que se encuentra subclonado *Ppα-DOX* empleando *Pfu* polimerasa. Se

obtuvo un fragmento de aproximadamente 1000 pb, denominado 5'DOXGUS (Figura 13A), el cual se purificó. Este fragmento se fosforiló, purificó y digirió con *SacII*. Posteriormente se purificó el fragmento y se cuantificó mediante un Nanodrop modelo Nanodrop1000 spectrophotometer Thermo. El plásmido pTN83 se digirió con *BamHI* y se verificó la digestión en un gel de agarosa 1% (Figura 13B). Luego se inactivó la enzima incubando durante 20 minutos a 80°C y se trató con klenow, para generar extremos romos. El plásmido se aisló de gel, se digirió con *SacII* y se purificó nuevamente a partir de gel. Luego se cuantificó mediante Nanodrop modelo Nanodrop1000 spectrophotometer Thermo scientific. Posteriormente se ligó el fragmento 5'DOXGUS a este plásmido y con la mezcla de ligación se transformaron células competentes *E. coli* DH10B. Se seleccionaron las colonias transformantes con resistencia a ampicilina y se confirmó la presencia de inserto mediante restricción con las enzimas *SacI* y *BamHI* (Figura 13C).

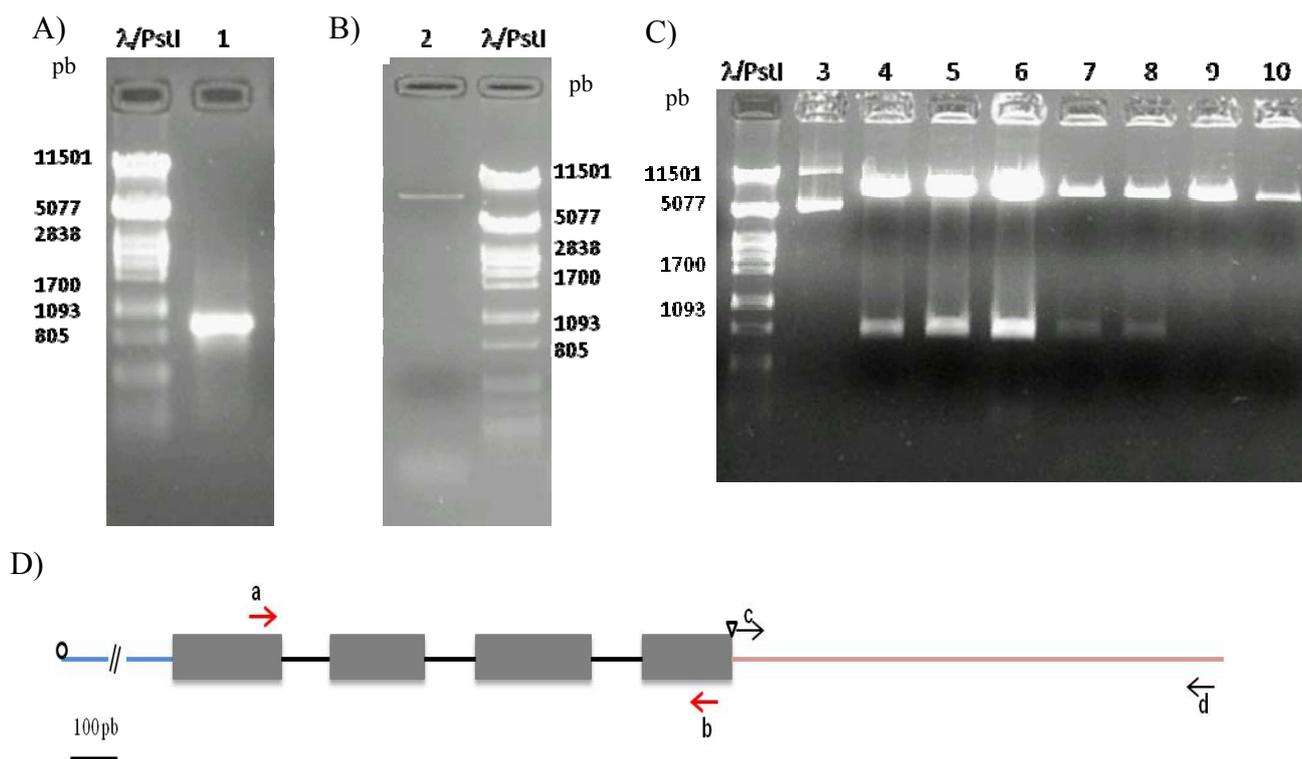


Figura 13. Amplificación, clonado y confirmación de la presencia de inserto correspondiente a la región 5'DOXGUS. **A)** carril 1: producto de PCR correspondiente al fragmento 5'DOXGUS. **B)** carril 2: plásmido pTN83 digerido con *BamHI*. **C)** Análisis de la presencia de inserto en el plásmido pTN83 mediante digestión con *SacI* y *BamHI*. Carril 3: pTN83 sin digerir. Carriles 4-10: plásmido obtenido de los distintos clones digerido. Carriles 4-8 y 10 representan clones positivos. **D)** Representación esquemática del extremo 3' de *Ppa-DOX*. Los cuadrados grises representan los exones, las líneas negras los intrones y la línea rosada el extremo 3'UTR. El círculo representa el codón de inicio y el triángulo el codón stop. Las flechas rojas y negras indican los cebadores utilizados para la

B) AGGAACTTGGTGATGCCACCATNNGGAAGTGGGAAGATTTNACAGAAGACAAGCAAACGCTAGCAATTNTTCG
 CGAGCTTTACGGCAACAATGTGGAGAGCCTNGATTTGCTAGTAGGGCTGCTGGTGGAGAAGAAACCCCAAGGGT
 TTGCCATCAGCGAGACTGCCTTCGTATTTTTGTTCTCATGGCCTCCAGGTGACGGTGTACACGACGCTCAAATTTT
 ATTTTCATGAGTCCATAGAAGTGATGCTGACCCATATTAACCTACTGGTCCAATCGCTGGCCAATTTGTGTTTCTCT
 GTGCAGGCGTTTGGGAAGCGGATCCGCTTTTACTTCACACTTCAACGAAAAAGTGTATACCGAGGAGGGATTGAA
 GTGGGTGAACACCACGGAGGGCCTCAAGGATGTGCTGCGTCGCCACCATCCCGAGCTGGTGGGAGACTGGATGA
 CGGCATCTTCGGCATTCTCGCTATGGAATCAGACACCAGAGAAGCCGATCCCC **CGT GGT CAG TCC CTT ATG**
 TTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGC

Figura 14. A) Alineamiento de la región comprendida entre el séptimo exón y el codón stop de *Ppa-DOX* y la secuencia obtenida con el cebador GUS-R3. B) Reverso y complementario de la secuencia obtenida con el cebador GUS-R3. En rojo se señala la secuencia correspondiente al gen *Ppa-DOX* y el subrayado representa el gen *uidA*. En verde se muestran los codones de *Ppa-DOX* en fase con el ATG de *uidA*.

A continuación se procedió a clonar un fragmento 3' correspondiente a la región 3' UTR de *Ppa-DOX*. Para esto se amplificó a partir de ADN genómico de *P. patens* y utilizando los oligonucleótidos DOXGUS3' fw y DOXGUS3' rv un fragmento de aproximadamente 1000 pb (Figura 15A). Este fragmento denominado 3'DOXGUS, se purificó, se cuantificó en gel de agarosa 1% y se ligó al plásmido pGEM-T Easy. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes *E. coli* DH10B y se seleccionaron las colonias transformantes con resistencia a ampicilina y la presencia de inserto se verificó por restricción con *EcoRI* (Figura 15B). Se obtuvieron 5 clones positivos, se seleccionó uno del cual se guardaron gliceroles y se obtuvo plásmido puro.

Posteriormente se digirió el pGEM-T con inserto con la enzima *EcoRI* y el plásmido pTN83-5'DOXGUS con *PstI* (Figura 15C). Tanto el plásmido digerido como el inserto se purificaron a partir de gel y se trataron con *klenow* para generar extremos romos. Luego el plásmido y el inserto se purificaron y el plásmido se desfosforiló, para evitar que se religue y se purificó nuevamente. Ambos se cuantificaron mediante gel de agarosa (Figura 15D).

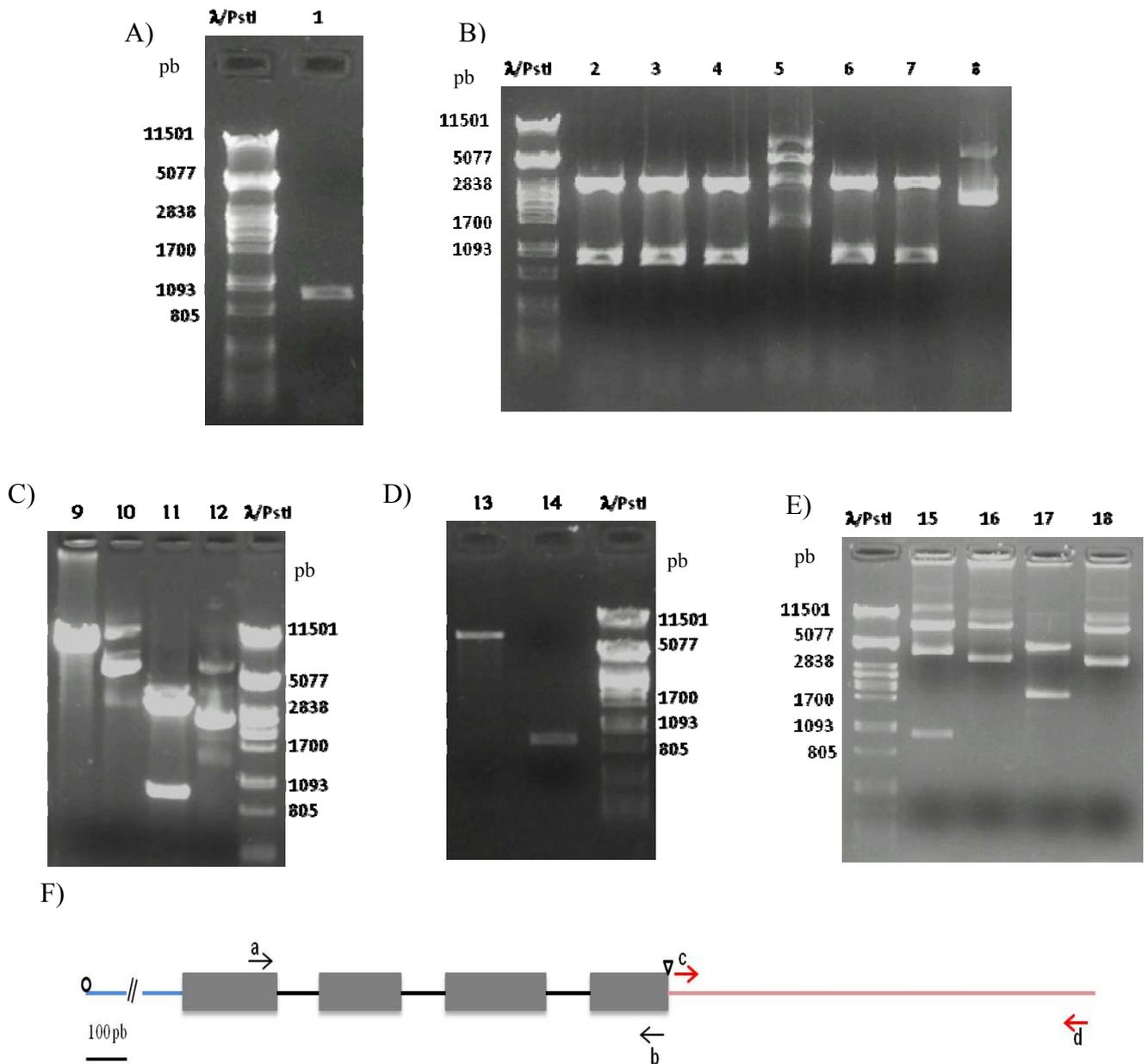


Figura 15. Amplificación, clonado y confirmación de la presencia de inserto correspondiente a la región 3' DOXGUS. **A)** Carril 1: Producto de PCR correspondiente al fragmento 3' DOXGUS. **B)** Análisis de la presencia de inserto en el plásmido pGEM-T Easy mediante restricción con *EcoRI*. Carriles 2-7: plásmido obtenido de los distintos clones digerido. Carril 8: pGEM-T Easy sin digerir. **C)** Digestión de pTN83-5' DOXGUS con *PstI* y de pGEM-T-3' DOXGUS con *EcoRI*. Carril 9: pTN83-5' DOXGUS digerido. Carril 10: pTN83-5' DOXGUS sin digerir. Carril 11: pGEM-T-3' DOXGUS digerido. Carril 12: pGEM-T-3' DOXGUS sin digerir. **D)** Cuantificación del plásmido y fragmento purificados. Carril 13: pTN83-5' DOXGUS. Carril 14: 3' DOXGUS. **E)** Análisis de la presencia de inserto en el plásmido pTN83-5' DOXGUS mediante restricción con *HindIII*. Carriles 15-18 plásmido obtenido de los distintos clones digerido. **F)** Representación esquemática del extremo 3' de *Ppa-DOX*. Los cuadrados grises representan los exones, las líneas negras los intrones y la línea rosada el extremo 3' UTR. El círculo representa el codón de inicio y el triángulo el codón stop. Las flechas rojas y negras indican los cebadores utilizados para amplificarlos fragmentos 5' DOXGUS y 3' DOXGUS. Las flechas rojas representan los cebadores usados para la amplificación del fragmento 3' DOXGUS. a: DOXGUS5'fw, b: DOXGUS5'rv, c: DOXGUS3'fw, d: DOXGUS3'rv.

El fragmento 3'DOXGUS y el plásmido pTN83-5'DOXGUS purificados se ligaron y con la mezcla de ligación se transformaron células competentes *E. coli* DH10B. La selección de las colonias transformantes se realizó con ampicilina y la presencia y orientación del inserto se chequeó mediante restricción con *HindIII* (Figura 15E). Esta enzima corta el fragmento 3'DOXGUS, en un sitio generado con el cebador DOXGUS3' fw, y también corta en el plásmido pTN83-5'DOXGUS por lo que se espera obtener como resultado de la digestión un fragmento de aproximadamente 1000pb. Aunque las digestiones fueron parciales en todos los plásmidos, se logró detectar un clon con inserto del tamaño esperado (1000 pb) en el carril 15 (Figura 15E). Este clon se denominó pTN83-DOXGUS. De este clon se guardaron gliceroles y se obtuvo plásmido puro. Al secuenciar la construcción utilizando el oligonucleótido Ter-pTN83 que hibrida con la secuencia del terminador del gen *nptII* del plásmido pTN83 (Tabla 1, Figura 20), se verificó la presencia y correcta orientación del inserto clonado (Figura 16A y B).

A)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GCGTTTGGAAAGCGGATCCGCTTTTACTTCAACTTCAACGAAAAAGTGATACCGAGGAGGGATTGAAGTGGGTGAACACCACGGAGGG
      100      110      120      130      140      150      160      170      180
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CCTCAAGGATGTGCTGCGTCGCCACCATCCCGAGCTGGTGGGAGACTGGATGACGGCATCTTCGGCATTCTCGCTATGGAATCAGACACC
      190      200      210      220      230      240      250      260      270
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 AGAGAAGCCGAGTTGGATCCCTTTGTACCTCCGCTGGGGCCGAACTCCCTGCAGCGAGCTCCTGAAGACCTACGGCAGACTGCCAAAA
      280      290      300      310      320      330      340      350      360
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CGAATATGTCGGTGTCTCAAGCTTTGTAGAGATATAGAGGAAACATAGTTGTCTTAAATTTGTATATTGCCATTGTGCATATTGAAAAC
      370      380      390      400      410      420      430      440      450
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 TGTGTTGATCTCAAGCTTTGTAGAGATATAGAGGAGACATAGTTGTCTTAAATTTGTATATTGCCATTGTGCATATTGAAAAC
      460      470      480      490      500      510      520      530      540
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CCAGTTGTAATCTTCATCATGAATTCATATCCTTCTATGCAGTACTTCAAGTGCCTGCCCCATTGACTCATTCTTGACCTGGCTA
      550      560      570      580      590      600      610      620      630
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CCAGTTGTAATCTTCATCATGAATTCATATCCTTCTATGCAGTACTTCAAGTGCCTGCCCCATTGACTCATTCTTGACCTGGCTA
      640      650      660      670      680      690      700      710      720
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CAGTGAAGAATGTGAAGAGCTTCTCAAAGTTGAGTGCATGATCGTAACAAGGTTGTTGGCGTACAAAGTTTCGTACAAGTTTGCTGAGA
      730      740      750      760      770      780      790      800      810
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CAGTGAAGAATGTGAAGAGCTTCTCAAAGTTGAGTGCATGATCGTAACAAGGTTGTTGGCGTACAAAGTTTCGTACAAGTTTGCTGAGA
      820      830      840      850      860      870      880      890      900
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GTTGCAGACCATGAGAAATACTATGTCCATAGAAATACGAAGAAGCCATTTTCAAGACAGTCCGGTGGTCTCTGGTGGTTACAGGAATCT
      910      920      930      940      950      960      970      980      990
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GPTTGCAGACCATGAGAAATACTATGTCCATAGAAATACGAAGAAGCCATTTTCAAGACAGTCCGGTGGTCTCTGGTGGTTACAGGAATCT
      1000      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GAAGCTGGGGGATTGCTCCGAGGTAGATCGGTGCACACGTGATAATTGACAGTCTAACTCACFACCCCGGACAAATTAATTAATTAATTA
      1090      1100      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GAAGCTGGGGGATTGCTCCGAGGTAGATCGGTGCACACGTGATAATTGACAGTCTAACTCACFACCCCGGACAAATTAATTAATTAATTA
      1180      1190      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 APTTGGTTGGCATGCACCTTCAATTTAAAATACACAGCACTACACTGCACATTTCTATTATTTTCTCATAAATGAGACCAGGGCCACGAGG
      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 APTTGGTTGGCATGCACCTTCAATTTAAAATACACAGCACTACACTGCACATTTCTATTATTTTCTCATAAATGAGACCAGGGCCACGAGG
      1360      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 TGAGGTTCCGGTGGTCCGGATGCACAATCCGATGTTTCTAAATTGACTGGTTGCAGGCCAAGACAAAGATGAGACGGAAATACTTCAA
      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520      1530
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 CGCTGTAAGGTATACTCCGGTGAATACCAATGAGAAGCATACTGTTTACAGTTAGAAGCGGACAAAGGACTCGAATGCAGGGACTGAAT
      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 TAOCACCACCCATGAACAAAAAAATAATGGAAGATGAACCTGTTAATATTTCTTATCGAAATATTAGCTTCGGTTTCCAGGAAAGGGTTG
      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 AGGTGGCCAGTTCTCCACTTGAGAAATCTCTATCCATCGATCAAAAATGTAGTAAGATTTACTAAACTAAGGCAAGAAGAGAAGAACG
      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GACCCCCAGCTTTCTACGGCGTAAACAGCTGCTTTCCTTGAGGCCCTCCCAATTTGCCAGCAGATAACGATTTCTCGCAGTCGGAAGC
      1800      1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 AAGACGAAATGAAATCCTCGAGAGAACTGGTGAATTTGGCTTACTTGGACGCCGCCACAGTTGATACCATCCCGCCAAGCAGAC
      1890      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GCCAGCCCGCTGAGACCCAGCGTGTGGTGGCAGACAGAAAGGGTTAGGATCCACAAAGGCAAGCGCAATGAAGAGGTTCGGCGTCTTG
      1980      1990      2000      2010      2020      2030      2040      2050      2060
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 GCTATGATGGAACTGACCCGCAATACCTCTGCAACCTGATGGAGGAAAGTTTGCCTTCAAGCTCTTGATCTGCTCCCCCGTTGCTGAA
      2070      2080      2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150
alfa-DOX .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SecTer-pTN83 TCCTCCATCAACGGGGCAAGTGTGGTCCCTCAGACTTACCAGCTTAGCCAACGTGTTTTTGGAGCTTACCTCAGTCTTCAAGCCCC

```

B)
 TTCTTACTCTAAAGATAAAAGATCTTTCAAGATCAAAACTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCCCT
 CACACCGGTGACGGGGATCGGGCAATTGCGATTGTCGTTGATCTCAAGCTTGTAGAGATATAGAGGAGACATAGT
 TGTCTTAAATTTGTATATTGCTATTGTGCATATTGAAAACCGATTGTAATTCCTCATCATGAATTCATATCCTTC
 TATGCAGTACTTTCAAGTGCTGTGCCATTGACTCATTCTTGACCTGGCTACAGTGAAAGATGTGAAGAGCTTCTC
 AAAGTTGAGTGCATGTATCGTAACAAGTTGTTGGCGTACAAAGTTTCGTACAAGTTTGCTGAGAGTTGCAGACC
 ATGAGAAATACTATGTCCATAGAATACGAAGAAGGCATTTTCAAGACAGTCGGTGGTTCTCTGGTGGTTACAGGA
 ATCTGAAGCTGTGGGGATTGCTCCGAGGTAGATGCGTGACACGTGATAATTGACAGTCTAACTCACTACCCCG
 GACAATTAATACTTTTAATTTGGTTTGGCATGCACTTCAATT

Figura 16. A) Alineamiento de la región comprendida entre el último exón y el 3'UTR de *Ppa-DOX* y la secuencia obtenida con el cebador Ter-pTN83. En negro se subraya el codón stop de *Ppa-DOX*. B) Secuencia obtenida con el cebador Ter-pTN83. En rojo se señala la secuencia correspondiente al gen *Ppa-DOX* y el subrayado representa la secuencia del terminador que posee una señal de poliadenilación del virus del mosaico de coliflor. Las letras violetas representan la secuencia correspondiente al pGEM-T Easy.

Se obtuvo el plásmido pTN83-DOXGUS el cual tiene clonado un fragmento 5'DOXGUS, homólogo a una región 3' del gen *Ppa-DOX*, en fase al gen *uidA* y un fragmento 3'DOXGUS, homólogo a una zona de la región 3'UTR de *Ppa-DOX*. Este vector fue el utilizado para transformar protoplastos de *P. patens* salvaje.

4.1.2 Transformación de protoplastos de *P. patens*

Se realizaron varios experimentos independientes de transformación de protoplastos de *P. patens* salvaje mediada por PEG utilizando la construcción pTN83-DOXGUS (Figura 17). El PEG actúa estimulando la compactación y agregación del ADN aumentando así su incorporación en los protoplastos.

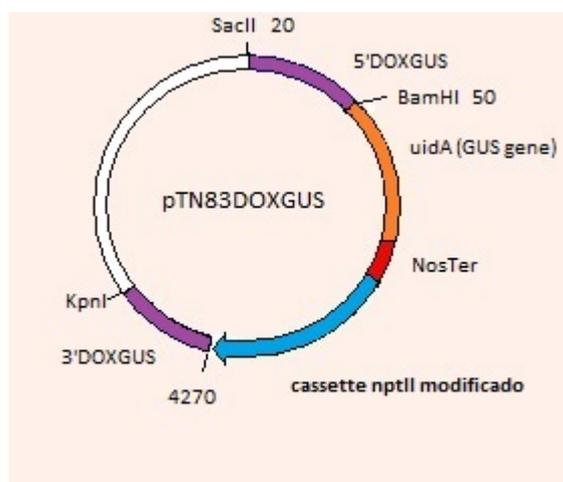


Figura 17. Esquema del plásmido pTN83-DOXGUS

Para la transformación se partió de material vegetal en estadio de protonema de entre 10 y 13 días, del cual se obtuvieron los protoplastos mediante digestión de la pared celular con driselasa y se utilizaron 1.6×10^6 células. Estas se transformaron con 20 μg de ADN lineal obtenido a partir de la digestión del plásmido pTN83-DOXGUS con la enzima *KpnI*. El plásmido digerido se precipitó y cuantificó en gel de agarosa (Figura 18).

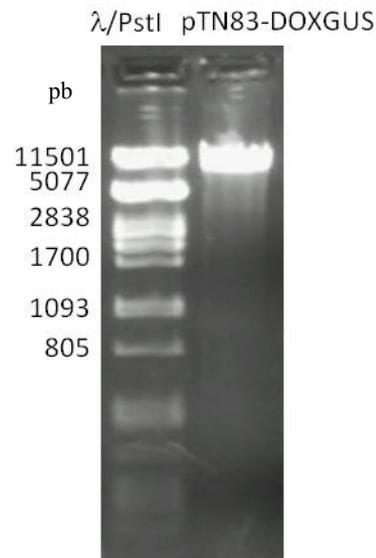


Figura 18. Cuantificación en gel de agarosa 1% teñido con BrEt del plásmido pTN83-DOXGUS digerido con *KpnI* y precipitado.

Luego de realizada la transformación, los protoplastos se regeneraron durante 7-10 días en medio PRMB/PRMT. Pasado este tiempo se transfirieron a medio selectivo con el antibiótico geneticina (G418) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego de unas semanas aquellos clones sin transformar mueren, los restantes son transferidos a medio sin antibiótico y luego de unas semanas se llevan nuevamente a medio con selección (Figura 19). De esta forma se favorece que los clones inestables, clones que presentan un crecimiento en medio con antibiótico más lento en comparación a aquellos que tienen un ritmo de crecimiento similar al de plantas salvajes, pierdan la resistencia.

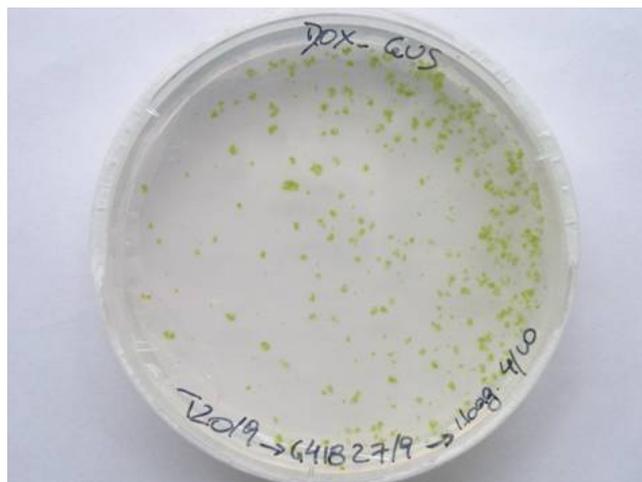


Figura 19. Crecimiento de los clones transformantes de *P. patens* que sobrevivieron a la primera etapa de selección creciendo en medio normal con celofán.

Se obtuvieron en total 22 clones al finalizar las etapas de selección.

4.1.3 Análisis de los transformantes mediante PCR

Se realizaron extracciones de ADN genómico a partir de plantas salvaje de *P. patens* y de los 22 clones que sobrevivieron las etapas de selección con el antibiótico G418. Con este ADN se analizó mediante PCR la correcta inserción de la construcción en el genoma de *P. patens*. Para ello se utilizaron cebadores específicos del transgen y cebadores que hibridan en la secuencia genómica de *Ppα-DOX* (Figura 20).

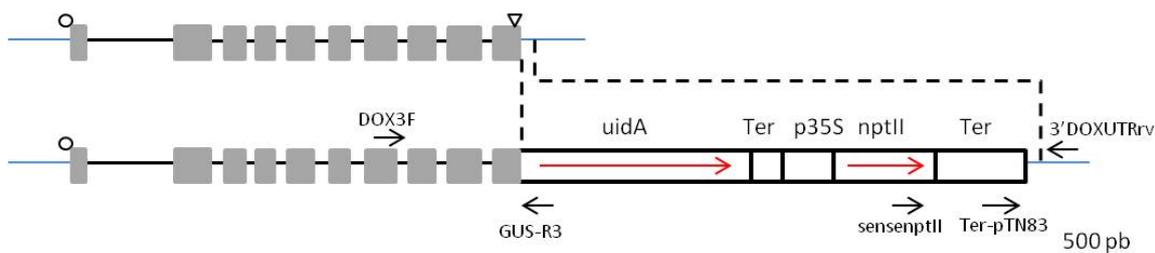


Figura 20. Representación esquemática de la secuencia genómica salvaje del gen *Ppα-DOX* y de la construcción génica. Los cuadrados grises representan los exones, las líneas negras los intrones y las líneas azules los extremos 5' y 3' UTR. Los círculos indican la posición del codón de inicio y el triángulo el codón “stop”. La posición de los cebadores utilizados para el análisis por PCR de plantas salvajes y clones transformantes están indicados con flechas negras.

Se procedió a confirmar que la construcción se insertó correctamente utilizando los cebadores DOX3F y 3'DOXUTRrv por fuera de la construcción y los cebadores GUS-R3, específico del gen *uidA* y sensenptII, específico del “cassette” de selección *nptII*. El

tamaño esperado de los productos de amplificación utilizando los pares de cebadores DOX3F_GUS-R3 y senseptII_3'DOXUTRrv es de 1000 y 2000 pb, respectivamente.

Como se indica en la Figura 21A se obtuvo producto de amplificación del tamaño esperado, con el conjunto de cebadores DOX3F_GUS-R3, solamente para los clones 12 y el clon 11, aunque en este último se obtuvieron además productos inespecíficos de menor tamaño. En la Figura 21B se observa que para el conjunto de cebadores senseptII_3'DOXUTRrv se obtuvo el producto de amplificación esperado para los clones 2, 12 y 13. Aunque en la Figura 21A no se observó amplificación para el clon 2 en otro ensayo de PCR se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado con el conjunto de cebadores DOX3F_GUS-R3, aunque se observó además una banda de menor tamaño (Figura 21C). Con el mismo conjunto de cebadores se obtuvo también una banda del tamaño esperado para los clones 3 y 4 observándose además en ambos clones una banda de menor tamaño. También se observó el amplicón del tamaño esperado con el conjunto de cebadores senseptII_3'DOXUTRrv para el clon 2 aunque en este caso también se obtuvieron bandas adicionales de menor tamaño tanto en el clon 2 como en plantas salvajes (Figura 21C). En la Figura 21B no se observaron estas bandas de menor tamaño para el clon 2 en la Figura 21C, indicando que estas bandas adicionales corresponden a ADN contaminante. No se observaron bandas del tamaño esperado para los clones 3 y 4 con los cebadores senseptII_3'DOXUTRrv (Figura 21C). Para el clon 1 no se detectó banda del tamaño esperado con ninguno de los pares de cebadores pero se observó una banda de menor tamaño para el par de cebadores senseptII_3'DOXUTRrv. En la Figura 21A y B no se observó producto de PCR en el salvaje con ninguno de los conjuntos de cebadores como era de esperar ya que este carece de la construcción. La presencia de productos de PCR en el salvaje en la Figura 21C indica la presencia de ADN contaminante. Para los clones restantes no se obtuvo producto de amplificación con ninguno de los pares de cebadores (no se muestran en la figura). La no amplificación de algunos transformantes con los dos conjuntos de cebadores, no descarta la posibilidad de que sean transformantes verdaderos, ya que la ausencia del producto de PCR puede haberse debido a otros factores tales como poco molde para la reacción de PCR y/o la presencia de agentes inhibidores de la misma.

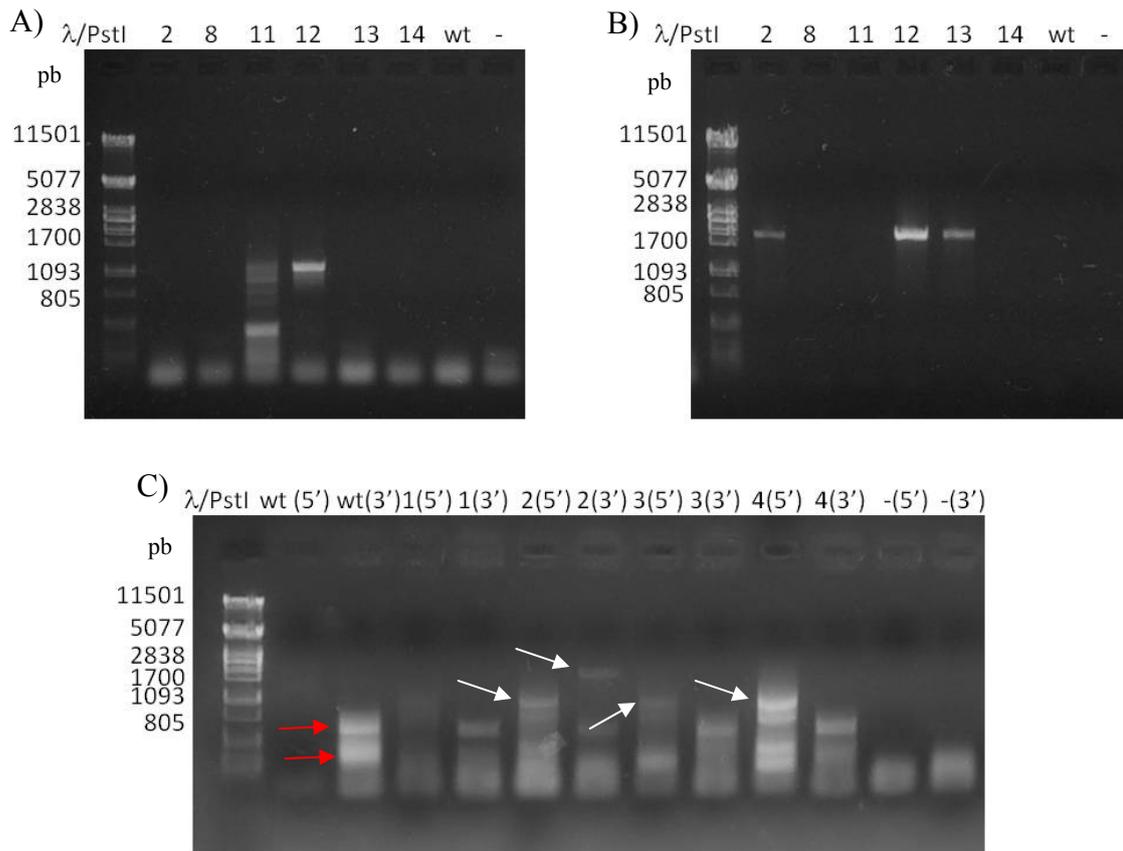


Figura 21. Geles de agarosa 1% teñidos con BrEt. **A)** Análisis por PCR de plantas salvajes y transformantes α -DOXGUS con el conjunto de cebadores DOX3F_GUS-R3. Carriles: 2, 8, 11, 12, 13, 14: clones α -DOX/GUS, wt: plantas salvajes, (-) control negativo. **B)** Análisis por PCR de plantas salvajes y transformantes α -DOXGUS con el conjunto de cebadores senseptII_3'DOXUTRrv. Carriles 2, 8, 11, 12, 13, 14: clones α -DOX/GUS, wt: plantas salvajes, (-) control negativo. **C)** Análisis por PCR de plantas salvajes y transformantes α -DOXGUS. Carriles: wt: plantas salvajes; 1, 2, 3, 4: clones transformantes α -DOX/GUS; (-) control negativo. En los carriles (5') se realizó la PCR con el conjunto de cebadores DOX3F_GUS-R3 y en los carriles (3') con el conjunto de cebadores senseptII_3'DOXUTRrv. Las flechas blancas señalan las bandas de los tamaños esperados y las flechas rojas señalan las bandas contaminantes.

Por lo tanto, los resultados mostrados confirman que la construcción se insertó correctamente en el genoma de *P. patens* en los clones 2 y 12, denominados α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12 respectivamente.

4.1.4 Análisis por Southern blot

Para corroborar la inserción de la construcción en el sitio del genoma de *P. patens* correspondiente al gen *Pp α -DOX* se realizó un análisis por Southern blot. Diez μ g de ADN genómico de *P. patens* salvaje y transgénicas α -DOX/GUS se digirieron con la enzima *StyI*, se separaron en un gel de agarosa y transfirieron a una membrana de nylon.

La membrana se hibridó con una sonda de 1800 pb, correspondiente a un fragmento obtenido de la digestión del plásmido pTN83-DOXGUS con *StyI* que hibrida con la región 3' del gen *nptII* y con 900 pb aproximadamente del fragmento 3'DOXGUS. En la Figura 22A se observa el patrón de digestión esperado para el genotipo salvaje y para los clones α -DOX/GUS. También se observa la ubicación de la sonda. En la digestión del ADN genómico con *StyI* la sonda hibridaría con un fragmento de 2800 pb en *P. patens* salvaje, mientras que en los clones α -DOX/GUS la sonda hibridaría con un fragmento de 1800 pb. En la Figura 22B se muestran los resultados obtenidos que indican que en el genotipo salvaje la sonda hibridó con un fragmento de ADN del tamaño esperado. Para los clones α -DOX/GUS se obtuvo el patrón de hibridación esperado solamente para el clon 12, detectándose una única banda de 1800 pb, lo que indicaría que la construcción se insertó en copia única en el genoma de *P. patens*. Para los clones 2, 11 y 13 además de la banda del tamaño esperado se pueden ver bandas de mayor tamaño. Estos resultados sugieren que la construcción se insertó en más de una copia en el genoma de *P. patens*. En los carriles correspondientes a los clones 8 y 14 no se observaron bandas. Tampoco se observaron bandas para el clon 4 (resultado no mostrado). No se logró obtener en el mismo análisis de Southern blot el patrón de digestión de plantas salvajes y del clon 12 y por eso se hizo una foto conjunta (Figura 22B).

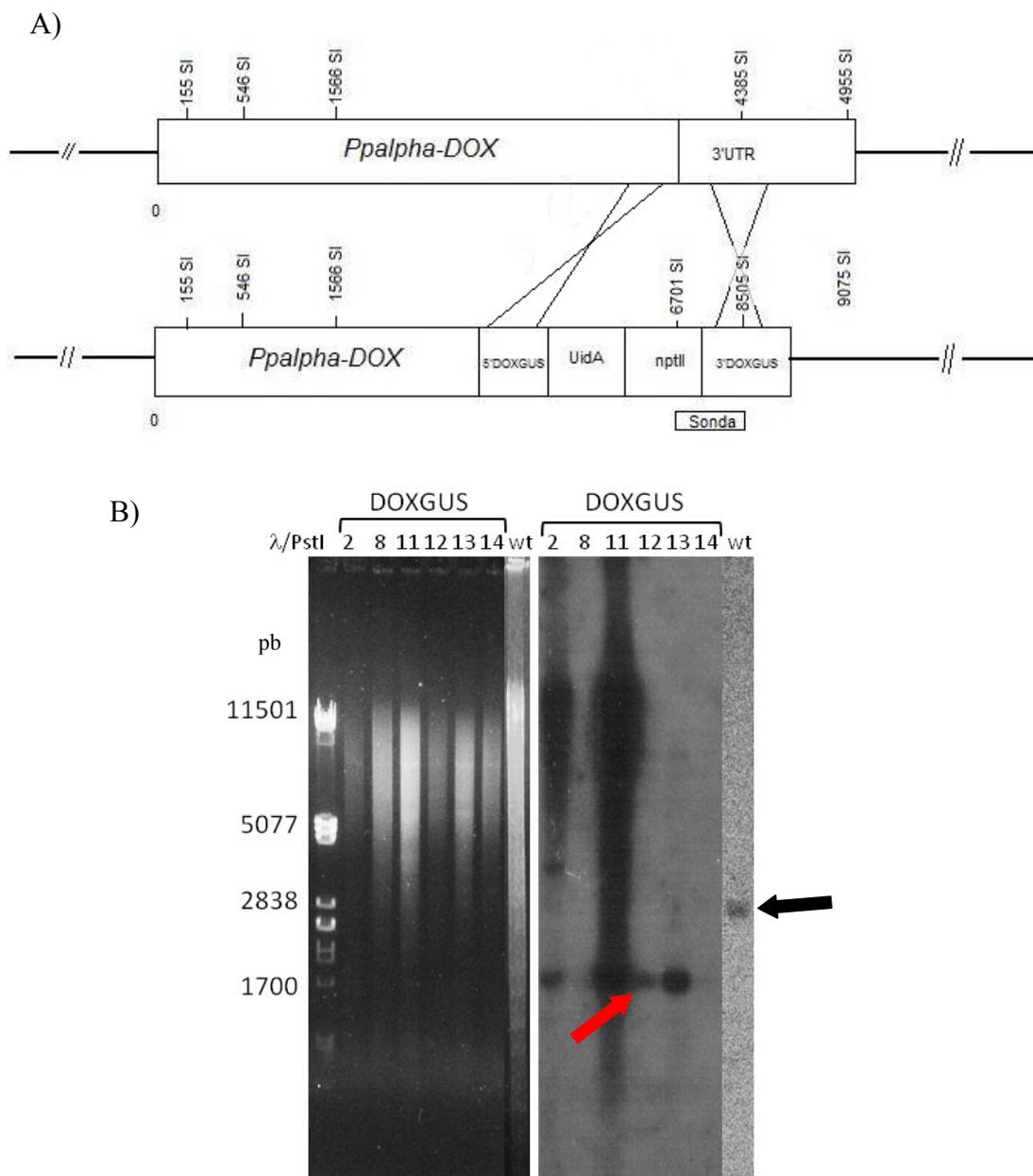


Figura 22. A) Representación esquemática del gen *Ppa-DOX* en el genoma de *P. patens* salvaje y transgénicas DOXGUS. Se muestra la sonda utilizada para el Southern blot y los sitios de restricción de la enzima *StyI* (SI). **B)** Análisis de Southern blot de *P. patens* salvaje y transgénicas α -DOX/GUS. 10 μ g de ADN genómico se digirieron con *StyI*. El ADN se separó en gel de agarosa 0.8% y transfirió a membrana de nylon cargada positivamente, la que se hibridó con una sonda de 1800 pb. A la izquierda se indican los tamaños del marcador de peso molecular. wt: *P. patens* salvaje. DOXGUS 2, 8, 11, 12, 13, 14: clones transgénicos α -DOX/GUS. La sonda que se utilizó fue marcada con α -[32 P]dCTP. La flecha negra indica la banda esperada para el genotipo salvaje y la flecha roja señala la banda esperada para plantas transgénicas α -DOX/GUS.

Dado que el método de transformación de *P. patens* empleado involucra la generación de protoplastos, los cuales al regenerarse pueden fusionarse y por lo tanto podemos obtener plantas provenientes de protoplastos fusionados (Schween, 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.

Se chequearon mediante citometría de flujo el nivel de ploidía de las plantas transgénicas en comparación con el plantas salvajes. Este estudio mostró que las plantas transgénicas α -DOX/GUS2 y α -DOX/GUS12 son haploides al igual que las plantas salvajes (Figura 23).

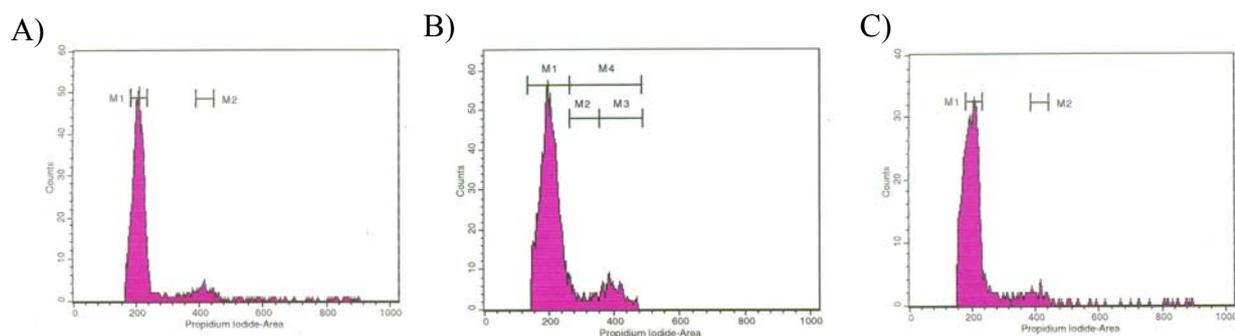


Figura 23. Diagramas de citometría de flujo. **A)** Plantas salvajes. **B)** α -DOX/GUS 2. **C)** α -DOX/GUS 12.

4.1.5 Análisis de actividad Pp α -DOX

Mediante análisis por GC-MS se determinó la actividad Pp α -DOX de plantas transgénicas α -DOX/GUS 2, 12 y salvaje sin tratar y tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc* (medidas realizadas por el Dr. Mats Hamberg; Karolinska Intitute, Suecia) (Figura 24). Las medidas se realizaron por triplicado.

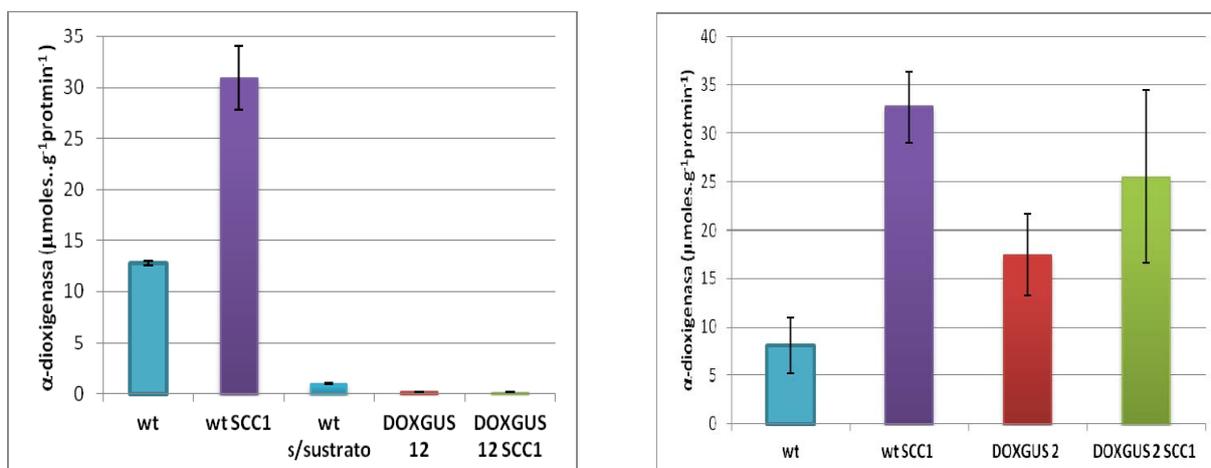


Figura 24. Homogenizados de *P. patens* se incubaron 30 minutos a 23°C con el ácido graso C16:0 y se determinó los niveles del ácido 2-hidroxipalmitico y su aldehído correspondiente (C15) mediante GC-MS. Las medidas de actividad

corresponden a la suma de ambos productos. wt: plantas salvajes; wt SCC1: plantas salvajes tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*; DOXGUS 12: transgénicas α -DOX/GUS 12 DOXGUS 12 SCC1: transgénicas α -DOX/GUS 12 tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*; DOXGUS 2: transgénicas α -DOX/GUS 2; DOXGUS 2 SCC1: transgénicas α -DOX/GUS 2 tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*; wt s/sustrato: control realizado con un homogenizado de *P. patens* salvaje sin el sustrato C16:0.

Se realizaron dos experimentos independientes de medidas de actividad. En uno de estos experimentos se observó que el clon denominado α -DOX/GUS 12 no presenta actividad Pp α -DOX, mientras que si se detectó actividad para plantas salvaje sin tratar y tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*, la cual aumenta respecto a plantas control. En el segundo ensayo se determinó que el clon α -DOX/GUS 2 presenta actividad α -DOX y esta tiene un leve aumento frente al tratamiento con el CF de *Pcc* cepa SCC1. Al comparar la actividad de este clon con la de plantas salvajes se observa que esta es mayor para α -DOX/GUS 2.

Dado que no se obtuvo un clon en el que la construcción se insertara en copia única, en el lugar correcto y que además la actividad Pp α -DOX no se viera alterada, se decidió continuar trabajando con los clones α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12. Pudimos determinar que en el clon α -DOX/GUS 12, la construcción se insertó en copia única en el lugar correcto pero como resultado de la inserción la enzima no presenta actividad, mientras que en el clon α -DOX/GUS 2 se detectó que la construcción se insertó en el lugar correcto del genoma de *P. patens*, pero en varias copias, y que esta inserción no afectó la actividad Pp α -DOX.

4.1.6 Análisis de la actividad GUS

4.1.6.1 Localización de la actividad GUS en plantas transgénicas no tratadas

En una primera instancia se analizó si el patrón de acumulación de la actividad GUS era similar en los clones α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12. Se observó la acumulación de GUS en diferentes estadios del desarrollo y con tratamientos con los CFs de *Pcc* y esporas de *B. cinerea*, siendo el patrón de expresión en ambos clones idénticos para todos los tratamientos y condiciones de crecimiento de *P. patens*. En la Figura 25 se observa el mismo patrón de acumulación del GUS en los clones α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12 de plantas crecidas en condiciones normales. En el resto de los resultados se muestran los clones α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12 indistintamente.

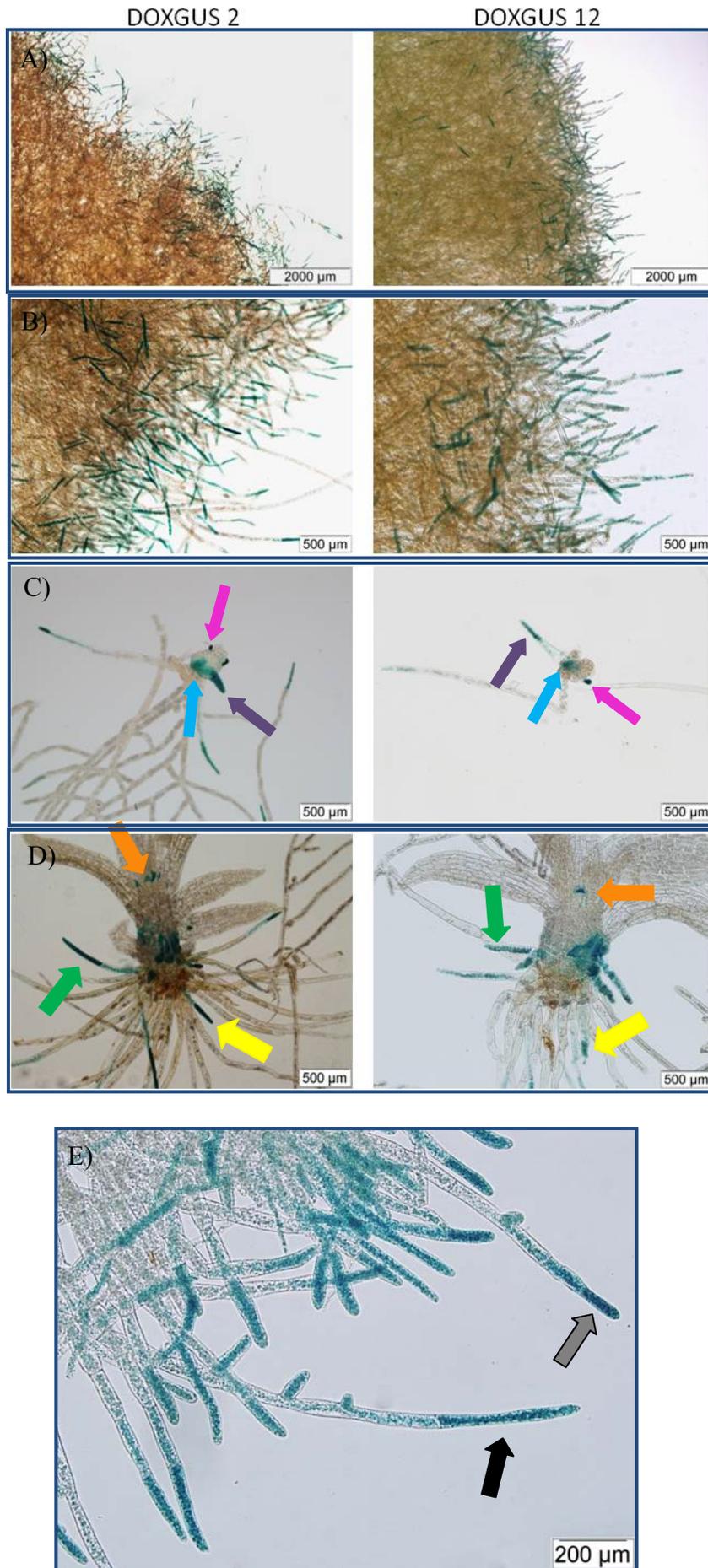


Figura 25. Análisis de actividad GUS de plantas transgénicas α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12. **A) y B)** Borde de las colonias **C)** Yemas. Las flechas rosadas señalan primordios de pelos axilares, las flechas violetas señalan células apicales de rizoides y las flechas celestes indican primordios de rizoides. **D)** Gametóforos. Las flechas naranjas señalan los pelos axilares, las flechas amarillas células apicales de rizoides y las flechas verdes muestran rizoides laterales. Se observa que la localización de actividad GUS es igual para las dos plantas transgénicas. **E)** Acercamiento al protonema de una colonia α -DOX/GUS. Las flechas negras indican células del caulonema y las flechas grises con borde negro señalan células del cloronema.

En colonias de plantas α -DOX/GUS de aproximadamente tres semanas se observó el protonema, las yemas y los gametóforos (Figura 25). Al analizar las colonias, se observó actividad GUS solo en los bordes de las colonias, lo cual corresponde a células apicales y subapicales del cloronema y caulonema (Figuras 25A, B y E). En yemas que surgieron a partir de una célula del caulonema se observó expresión del gen GUS en células apicales de rizoides (flechas violetas) y en células precursoras de rizoides y primordios de rizoides (indicado con flecha celeste) (Figura 25C). También se detectó actividad GUS en las células de las yemas que van a dar lugar a la formación de pelos axilares, también denominadas primordios de pelos axilares (flechas rozadas). En los gametóforos se observa expresión en células apicales de rizoides (flecha amarilla), en rizoides laterales (flechas verdes) y en pelos axilares (flechas naranjas) (Figura 25D).

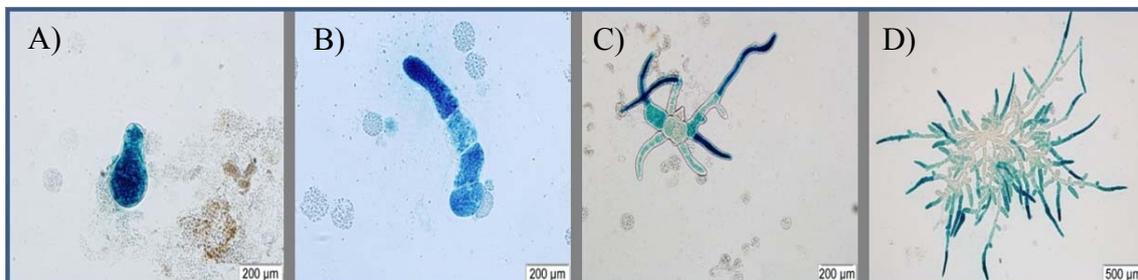


Figura 26. Tinción histológica de la actividad GUS en protoplastos regenerándose. Se muestra la regeneración de los protoplastos y la actividad GUS 6 días (A), 7 días (B), 8 días (C) y 12 días (D) después de plaqueados los protoplastos.

Para obtener información sobre lo que ocurre con la expresión de *Pp α -DOX* en estadios tempranos del desarrollo se analizaron protoplastos de plantas α -DOX/GUS regenerándose en medio normal. En la Figura 26 se observa actividad GUS en la célula individual que comienza a dividirse y a medida que aumenta el número de células se observa mayor actividad GUS en las células apicales.

Por otro lado se ha demostrado que al incubar hojas cortadas de *P. patens* en medio de cultivo sin fitohormonas exógenas, a partir de las células cercanas al corte se comienza a evidenciar la aparición de células con características similares a las células apicales del cloronema (Ishikawa, *et al.*, 2011). En el desarrollo normal, a partir de una espора surgen células del cloronema las que tienen la capacidad de dividirse y generar nuevas células del cloronema. Al igual que las células apicales del cloronema las células que surgen de las hojas cortadas sufren una reprogramación y entran nuevamente en el ciclo celular generando células del cloronema (Nishiyama, *et al.*, 2012). Dado que observamos expresión del gen GUS en células apicales, analizamos lo que ocurre en las células que se generan a partir de hojas cortadas de plantas transgénicas α -DOX/GUS. Para esto se cortaron hojas de gametóforos de plantas transgénicas y se incubaron en medio de cultivo BCDTA. A partir de los 6 días de incubación se comienza a observar que algunas células de la hoja se dividen y presentan actividad GUS. A partir de estas células que se dividieron se observa la generación de células del cloronema y al realizar el ensayo de actividad GUS se detecta expresión en las mismas (Figura 27).

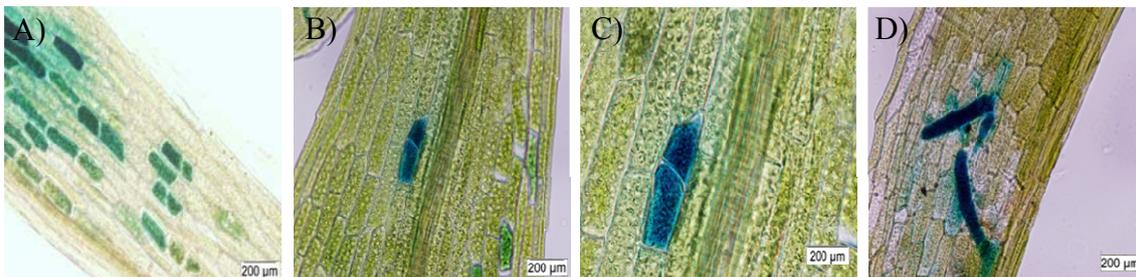


Figura 27. Tinción histológica de actividad GUS de hojas cortadas de plantas transgénicas sanas. **A y B)** Hoja de *P. patens* donde se observa actividad GUS en células que se están dividiendo. **C)** Acercamiento a una célula en división con actividad GUS. **D)** Filamentos de protonema surgiendo de células de la hoja.

La observación de actividad GUS en células en división sugiere que *Pp* α -DOX se expresa en células mitóticamente activas.

4.1.6.2 Localización de actividad GUS en tejidos tratados con elicitores de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y esporas de *Botrytis cinerea*

Anteriormente se había observado en nuestro laboratorio que el gen *Pp* α -DOX se expresa en respuesta al tratamiento con el filtrado de cultivo (CF) de la cepa SCC1 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), detectándose un aumento en la acumulación de transcritos a las 4, 8 y 24 horas post tratamiento (Castro, 2006). Los

CFs son preparaciones acelulares que contienen enzimas capaces de degradar la pared celular, como celulasas, proteasas y pectinasas y se ha demostrado que estos inducen síntomas y la expresión de genes de defensa de manera muy similar a lo que sucede con la bacteria *Pcc* (Vidal, *et al.*, 1997; Vidal, *et al.*, 1998). Con el tratamiento con suspensión de esporas del hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) se observó que los niveles de transcriptos aumentan a las 24 horas (Castro, 2006).

Con el fin de estudiar la localización de la actividad GUS en los tejidos en respuesta a patógenos, se realizaron tratamientos de plantas transgénicas α -DOX/GUS de 3 semanas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc* y con una suspensión de esporas de *B. cinerea*, correspondiente a 1×10^5 esporas/mL. La tinción histológica para detectar actividad GUS se efectuó a las 24 horas post tratamientos. Como se observa en la Figura 28 se detectó un aumento de actividad GUS en el borde de las colonias en plantas tratadas con los elicitores en comparación con plantas sin tratar. No solo se observa actividad GUS en las células apicales y subapicales, sino que la actividad GUS se extiende hacia el interior de la colonia, mostrando que los filamentos del protonema en contacto con el CF o las esporas de *B. cinerea* expresan *Pp* α -DOX. Debido a la maceración del tejido por la acción de *B. cinerea* y del CF de la cepa SCC1 (Ponce de León, *et al.*, 2007), las imágenes para estos tratamientos se ven poco definidas. También se observa la aparición de actividad GUS en las hojas de plantas transgénicas tratadas mientras que en plantas sin tratar no se detecta.

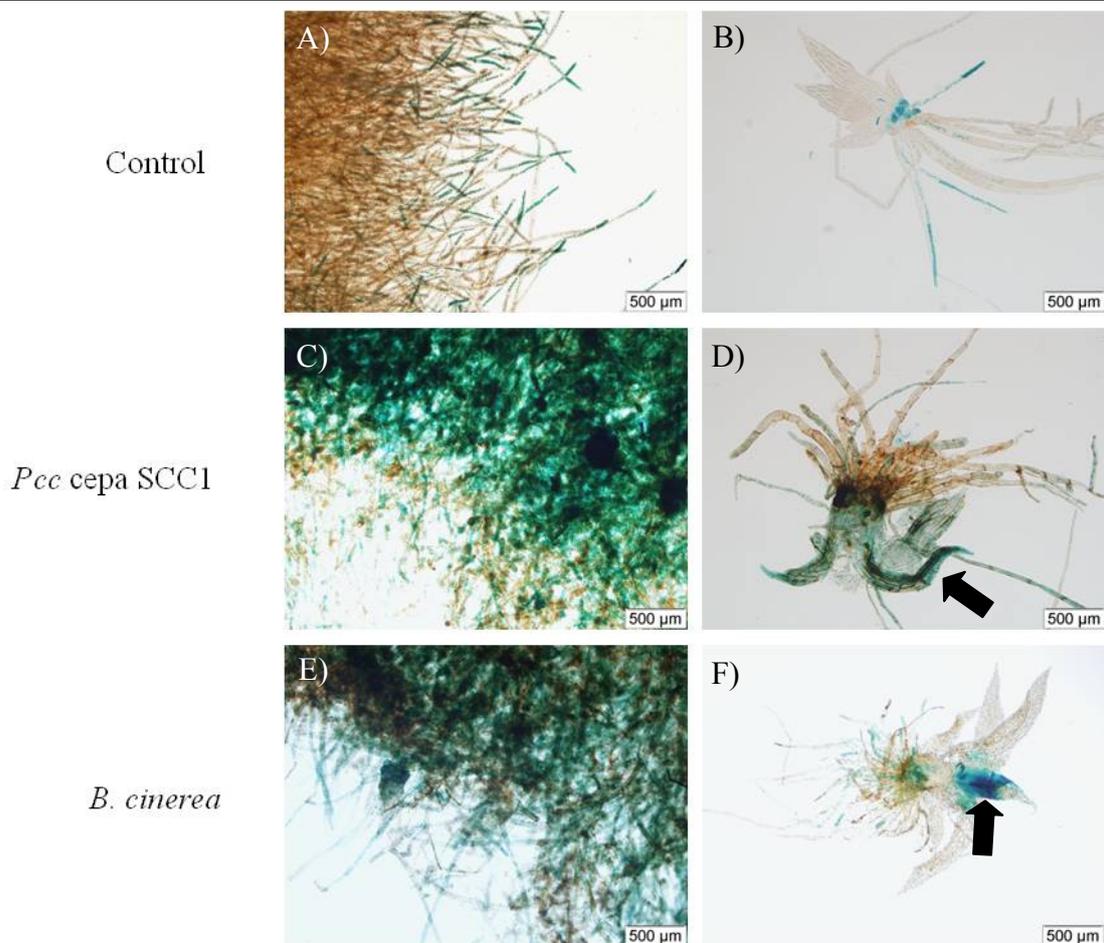


Figura 28. Tinción histológica de la actividad GUS en plantas transgénicas luego del tratamiento con el CF de *Pcc* cepa SCC1 y con esporas de *B. cinerea* (1×10^5 esporas / mL). **A)** Protonema de plantas transgénicas α -DOX/GUS sanas. **B)** Gametóforo de plantas α -DOX/GUS sanas. Control: plantas sin tratar. **C)** Protonema de plantas α -DOX/GUS tratadas con el CF de *Pcc*, SCC1. **D)** Gametóforo de plantas α -DOX/GUS tratadas con el CF de *Pcc*, SCC1. **E)** Protonema de plantas α -DOX/GUS tratadas con *B. cinerea*. **F)** Gametóforos de plantas α -DOX/GUS tratadas con *B. cinerea*. Las flechas negras indican la aparición de actividad GUS en hojas de plantas tratadas.

Para analizar con más detalle lo que ocurre durante la infección con *B. cinerea* se trataron plantas transgénicas con una solución de esporas de concentración 1×10^5 esporas/mL y a las 24 horas se realizó el ensayo de actividad GUS. Luego se incubaron las plantas infectadas con el colorante solofenil, el cual tiñe la pared del hongo y se observaron las hojas (Figura 29A y B)

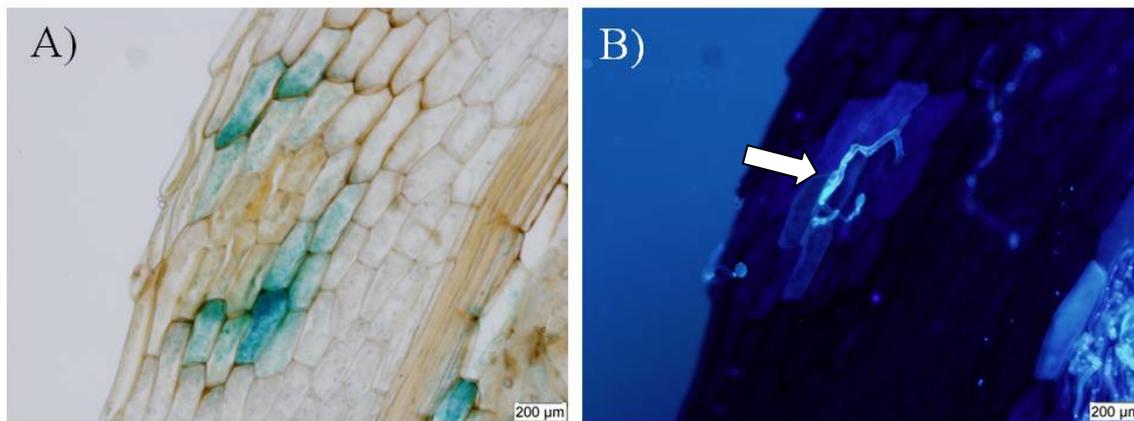


Figura 29. **A)** Tinción histológica de la actividad GUS en una hoja de planta transgénica α -DOX/GUS con síntomas a 24 horas de la infección con *B. cinerea*. **B)** Tinción con solofenil de una hoja de planta transgénica α -DOX/GUS infectada con *B. cinerea*. La flecha blanca señala la hifa de *B. cinerea*.

Como se muestra en la Figura 29 se detectó actividad GUS en las células que rodean el sitio de la infección con *B. cinerea*, el cual fue detectado con el colorante solofenil. También se observó que las células infectadas presentan amarronamiento. Esto ha sido descrito en la literatura previamente, indicando que los cambios que ocurren en *P. patens* tras la infección con *B. cinerea* son similares a los observados en plantas vasculares, incluyendo el amarronamiento de los cloroplastos, el colapso de citoplasma y la acumulación de compuestos fenólicos (Ponce de León, *et al.*, 2007). También se observó que el solofenil se une a las células infectadas que presentan amarronamiento, indicando una modificación en la pared de estas células (Figura 29B).

4.1.6.3 Localización de actividad GUS en plantas transgénicas α -DOX/GUS en respuesta a auxinas

Al igual que ocurre en plantas vasculares, en las briofitas la aplicación de hormonas produce la activación de una respuesta fisiológica como la transición de cloronema a caulonema (Johri & Desai, 1973), alargamiento del tallo (Fujita, *et al.*, 2008) y la aparición de rizoides en los brotes (Ashton, *et al.*, 1979).

Anteriormente se demostró en nuestro laboratorio que al tratar *P. patens* con auxinas aumenta la expresión del gen *Pp* α -DOX (Castro, 2006). Con el propósito de verificar dicha inducción se realizaron ensayos de actividad GUS en plantas transgénicas α -DOX/GUS tratadas con ácido α -naftaleno acético (α -naphthalene acetic acid, NAA) 5 μ M. Se realizaron observaciones a 1, 2 y 3 días (Figura 30).

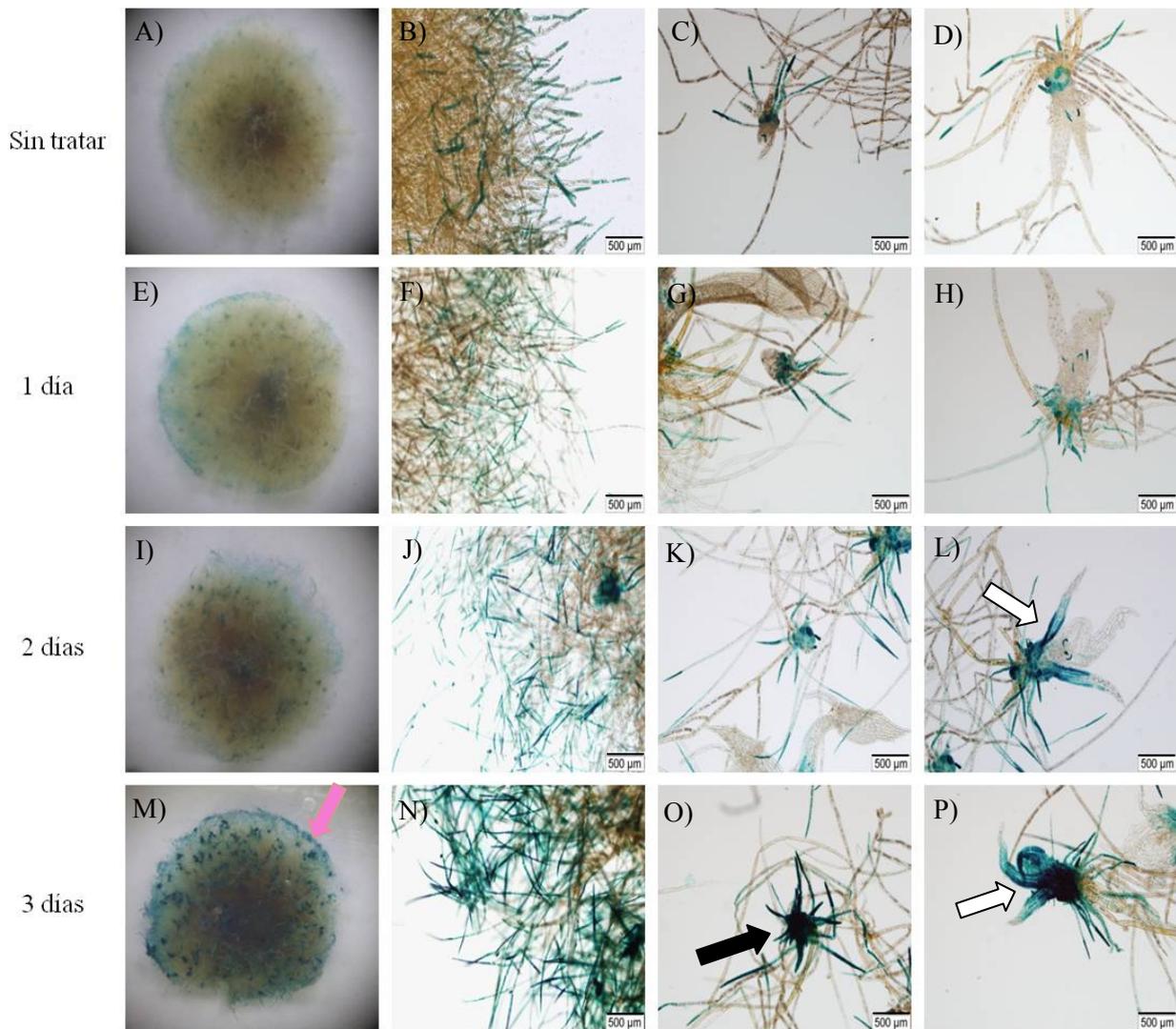


Figura 30. Tinción histológica de la actividad GUS en plantas transgénicas α -DOX/GUS tratadas con α -naphthalene acetic acid (NAA) 5 μ M. Control: sin tratar. **A, E, I y M)** Colonias. **B, F, J y N)** Bordes de las colonias. **C, G, K y O)** Yemas. **D, H, L y P)** Gametóforos. La flecha negra señala el aumento del número de rizoides, las flechas blancas muestran la aparición de actividad GUS en hojas y la flecha rosada señala los puntos azules que se observan en la colonia 3 días post tratamiento que corresponden a tallos de gametóforos con actividad GUS.

Como se muestra en la Figura 30 se detecta un aumento en la expresión del gen GUS y por lo tanto de *Pp α -DOX* en plantas transgénicas α -DOX/GUS tratadas con NAA. A partir del primer día luego del tratamiento se observa un aumento de expresión GUS en el borde de las colonias tratadas en comparación con colonias sin tratar (Figura 30 E y F). A los 2 días post tratamiento además de continuar el aumento de expresión en el borde de las colonias (Figura 30I y J) se detecta un aumento en la actividad GUS en yemas (Figura 30K) y aparece actividad GUS en las hojas de los gametóforos (Figura 30L). A los 3 días luego del tratamiento continúa el incremento de actividad GUS en el protonema de las colonias (Figura 30M y N), en yemas (Figura 30O) y se observa un

aumento de la actividad GUS en las hojas y además en los tallos de los gametóforos (Figura 30P).

4.2 Sobreexpresión del gen *Pp α -DOX*

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobreexpresión de *Pp α -DOX* en *P. patens* se generaron líneas transgénicas que expresan este gen bajo el control del promotor constitutivo de ubiquitina de maíz utilizando una construcción generada previamente en nuestro laboratorio (Machado, 2010).

4.2.1 Transformación de protoplastos de *P. patens*

Se realizaron varios experimentos independientes de transformación de protoplastos de *P. patens* salvaje mediada por PEG utilizando la construcción pTHUbi-DOX (Figura 11). Para la transformación se partió de material vegetal en estadio de protonema de entre 10 y 13 días, del cual se obtuvieron los protoplastos mediante digestión de la pared celular con driselasa y se utilizaron 1.6×10^6 células. Estas fueron transformadas con 20 μ g de ADN lineal obtenido a partir de la digestión del plásmido pTHUbi-DOX con la enzima *SwaI* la cual posee dos sitios de corte a ambos lados del locus 108 (Figura 11) por lo que se obtienen dos fragmentos luego de la digestión. La transformación se realizó con los dos fragmentos siendo el que posee el inserto y el que se va a integrar al genoma el de mayor tamaño. Luego de la digestión ambos fragmentos se precipitaron y cuantificaron en gel de agarosa (Figura 31). Dado que el fragmento que se requiere para transformar es el que contiene el ADNc de la α -DOX (9kb) y siendo este de un tamaño que está muy cercano al límite sugerido por las instrucciones del kit para purificar fragmentos a partir de gel de agarosa, hemos observado un bajo rendimiento en la purificación a partir gel. Por esto se optó por precipitar los dos fragmentos obtenidos de la digestión y la transformación se realizó con ambos fragmentos, siendo el que se incorporará en el genoma de *P. patens* el que posee secuencias homólogas al mismo. El segundo fragmento no posee regiones con homología al genoma de *P. patens* y por lo tanto no podrá incorporarse mediante recombinación homóloga.

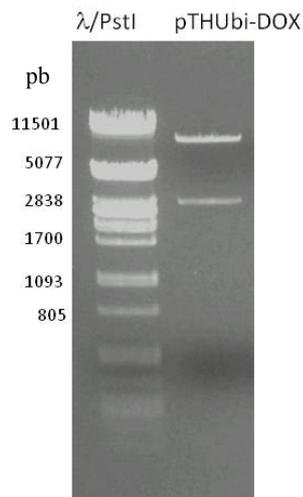


Figura 31. Cuantificación en gel de agarosa 1% teñido con BrEt del plásmido pTHUbi-DOX digerido con la enzima *SwaI* y precipitado.

Luego de realizada la transformación, los protoplastos se regeneraron durante 7-10 días en medio PRMB/PRMT. Pasado este tiempo se transfirieron a medio selectivo con el antibiótico, Hyg 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego de unas semanas aquellos clones sin transformar mueren, los restantes se transfirieron a medio sin antibiótico y luego de unas semanas se llevan nuevamente a medio con selección. De esta forma se favorece la obtención de transformantes estables y los clones inestables, clones que presentan un crecimiento en medio con antibiótico más lento en comparación con aquellos que tienen un ritmo de crecimiento similar al salvaje, pierdan la resistencia. En una de las transformaciones se obtuvieron seis clones al finalizar las etapas de selección.

4.2.2 Análisis de los transformantes mediante “Northern blot”

Mediante análisis de “Northern blot” se examinaron los niveles de expresión del gen *Pp α -DOX* en plantas salvajes y los clones transformantes que sobreexpresan la α -DOX denominados OEDO (por “overexpressors”). Para esto se utilizaron 10 μg de ARN extraído de colonias con tres semanas de crecimiento. Como se observa en la Figura 32 los seis clones presentan distintos niveles de expresión.

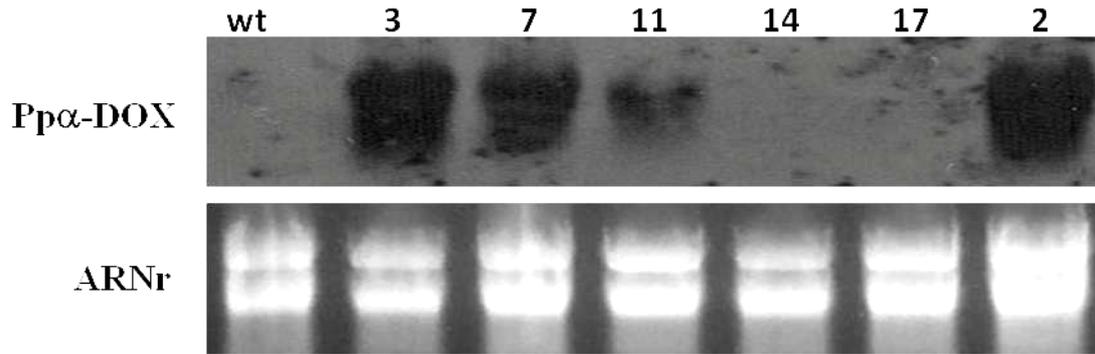


Figura 32. Análisis de la expresión de *Ppα-DOX* en plantas salvajes y sobreexpresantes OEDO. Se aisló ARN de plantas crecidas sobre celofán durante 3 semanas. wt: plantas salvajes; carriles 3, 7, 11, 14, 17 y 2: clones OEDO. Se utilizó una ribsonda de ADNc, obtenida a partir de plásmido, marcada con digoxigenina. Para la detección se utilizó un anticuerpo antidigoxigenina conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, y el sustrato alcalino quimioluminiscente CSPD. ARNr: ARN ribosomal como control de carga.

Se seleccionaron tres clones que presentan distintos niveles de expresión y se denominaron OEDO 3, 7 y 11. Mediante citometría de flujo se chequeó el nivel de ploídía de estos tres clones en comparación con plantas salvajes. Este estudio mostró que estos clones son haploides al igual que las plantas salvajes (Figura 33).

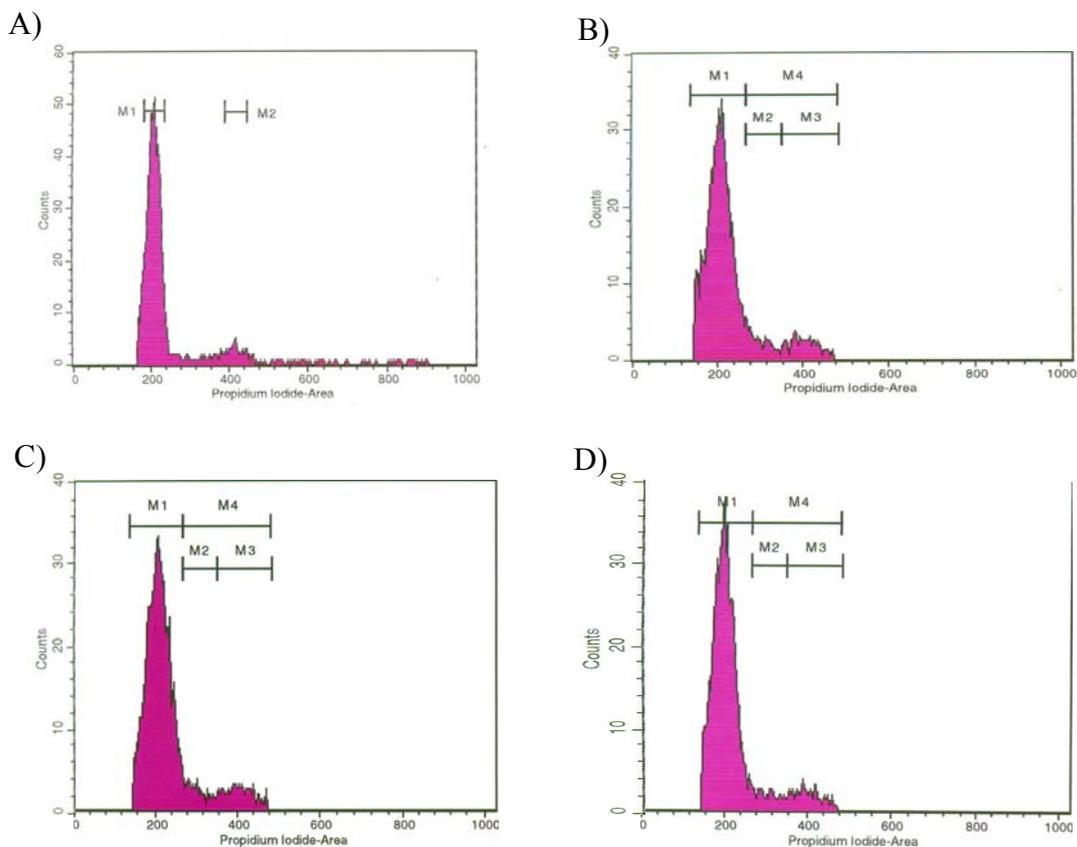


Figura 33. Diagramas de citometría de flujo. A) Plantas salvajes. B) OEDO 3. C) OEDO 7. D) OEDO 11.

4.2.3 Análisis de actividad Pp α -DOX

Para determinar si los clones con mayores niveles de transcripto presentaban mayor actividad Pp α -DOX con respecto a plantas salvajes, se midió la actividad Pp α -DOX mediante GC-MS (Dr. Mats Hamberg, Karolinska Institute, Suecia) (Figura 34)

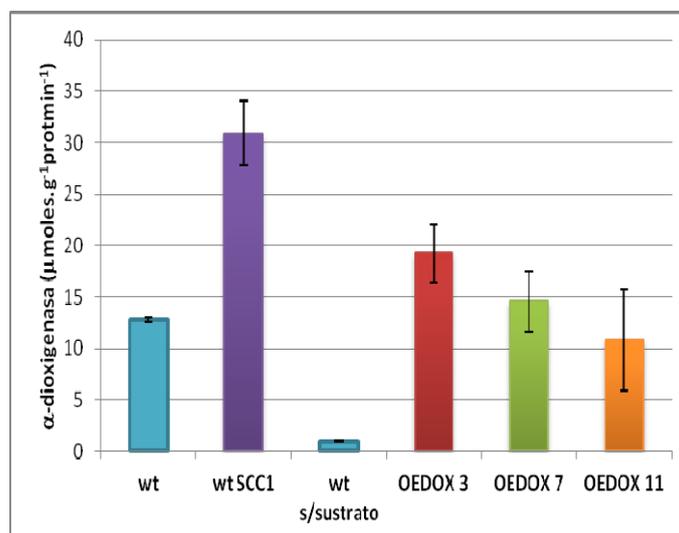


Figura 34. Homogenizados de *P. patens* salvaje y sobreexpresantes OEDOX 3, 7 y 11 se incubaron 30 minutos a 23°C con el ácido graso C16:0 y se determinó la actividad Pp α -DOX que corresponde a la suma de cantidad de ácido 2-hidroxipalmitico y el aldehído correspondiente (C15) mediante GC-MS. wt: plantas salvajes; wt SCC1: plantas salvajes tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*; wt s/sustrato: control realizado con homogenizado de *P. patens* sin C16:0.

Como se observa en la Figura 34 el clon sobreexpresante OEDOX 3 presenta un mayor nivel de actividad Pp α -DOX con respecto al de plantas salvajes, aunque esta no alcanza los niveles que se obtuvieron en plantas salvajes tratadas con el CF de *Pcc* cepa SCC1. Para los clones OEDOX 7 y 11 los niveles de actividad fueron similares al de plantas salvajes siendo la actividad del clon 11 un poco menor, aunque el error de la misma dio elevado.

4.2.4 Análisis fenotípicos de los transformantes

4.2.4.1 Crecimiento de las colonias

Analizando los clones en mayor detalle se observó que las colonias de los clones sobreexpresantes presentaban un diámetro de la colonia menor al del genotipo salvaje. Las colonias del clon denominado OEDOX 3 además de ser más chicas que las de

plantas salvaje son más chicas que las de los sobreexpresantes OEDOX 7 y 11. El diámetro de las colonias se midió utilizando el programa GIMP 2.8.0 y se realizó un análisis estadístico mediante el programa Statistica 5.0 (Figura 35A y B). Los resultados muestran que el diámetro de las colonias de los tres sobreexpresantes analizados es significativamente menor al diámetro de colonias salvajes.

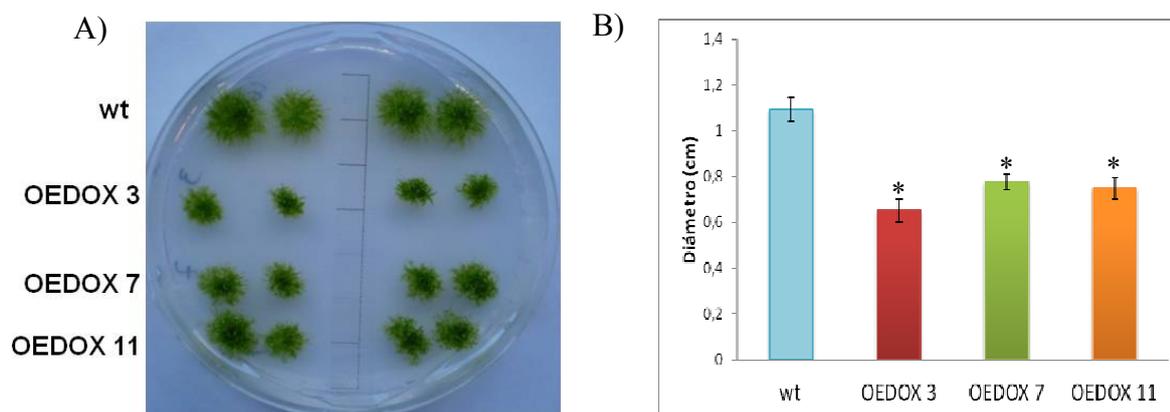


Figura 35. A) Colonias de *P. patens* salvaje (wt) y sobreexpresantes (OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11) crecidas 3 semanas. B) Medida del diámetro de colonias de *P. patens* salvaje (wt) y sobreexpresantes (OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11). Se realizaron 16 medidas independientes. Se utilizó el test estadístico de Kruskal–Wallis no paramétrico, $p < 0,0000001$. (*)

4.2.4.2 Desarrollo de los rizoides

Mediante análisis con la lupa de los gametóforos de plantas salvajes, OEDOX 3, 7 y 11 se detectó que las plantas de genotipo sobreexpresante presentaban rizoides más cortos en comparación con plantas salvajes. Para poder realizar con más detalle esta observación se realizaron tinciones con el colorante toluidina y se analizaron los gametóforos en un microscopio invertido (Marca: Olympus, Modelo: IX81, Cámara CCD: DP71) (Figura 36A). Las medidas del largo de los rizoides se hicieron utilizando el programa GIMP 2.8.0 y se realizó un análisis estadístico mediante el programa Statistica (Figura 36B).

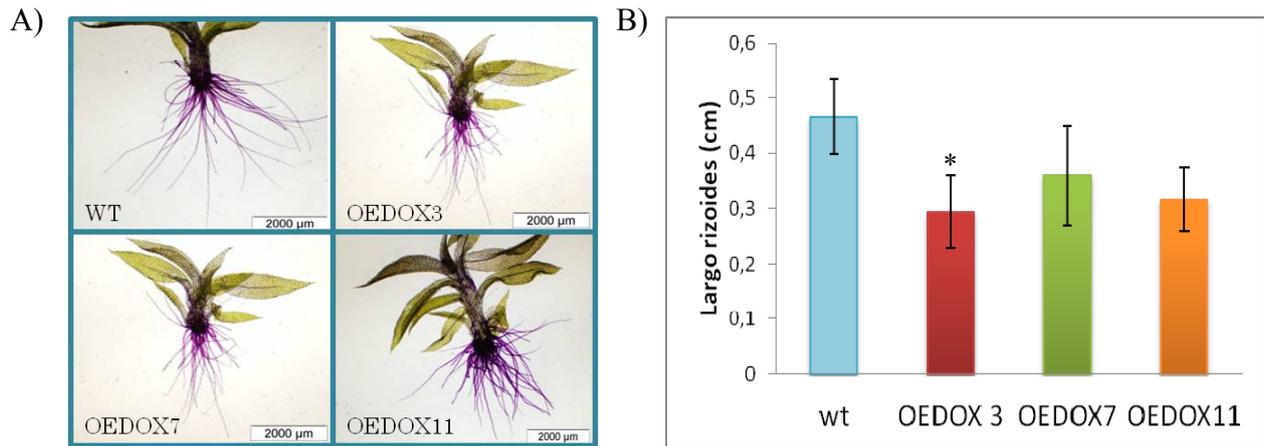


Figura 36. A) Tinción con toluidina de rizoides de *P. patens* wt, OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11 de 3 semanas. B) Medida del largo de los rizoides de *P. patens* wt, OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11 de 3 semanas. Se realizaron 20 medidas independientes del largo de los rizoides. Se utilizó el test estadístico de Kruskal–Wallis no paramétrico, $p=0,000001$ (*).

Se detectó mediante test estadístico no paramétrico que los rizoides de gametóforos salvajes son significativamente más largos en comparación con rizoides del sobreexpresante 3. Al comparar los rizoides de los sobreexpresantes 7 y 11 no se detectaron diferencias significativas.

4.2.4.3 Desarrollo del caulonema y cloronema

Al observar en mayor detalle el borde de las colonias, se detectó que los transformantes presentan menor proporción de protonema (Figura 37). Por este motivo se decidió estudiar con más detalle lo que ocurre en el desarrollo de los tejidos caulonema y cloronema.

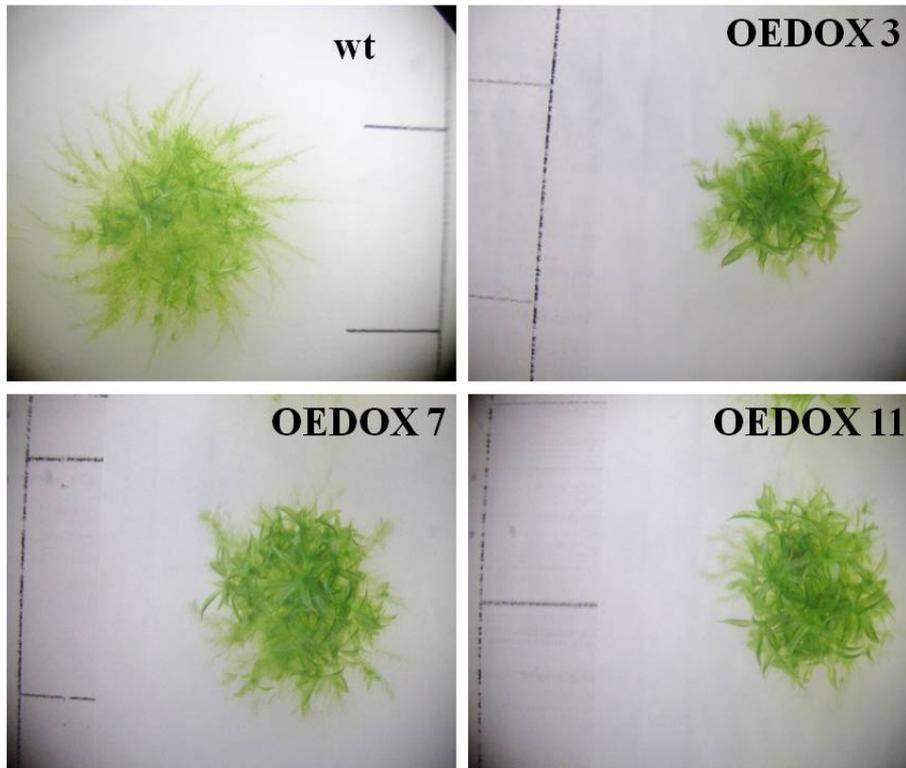
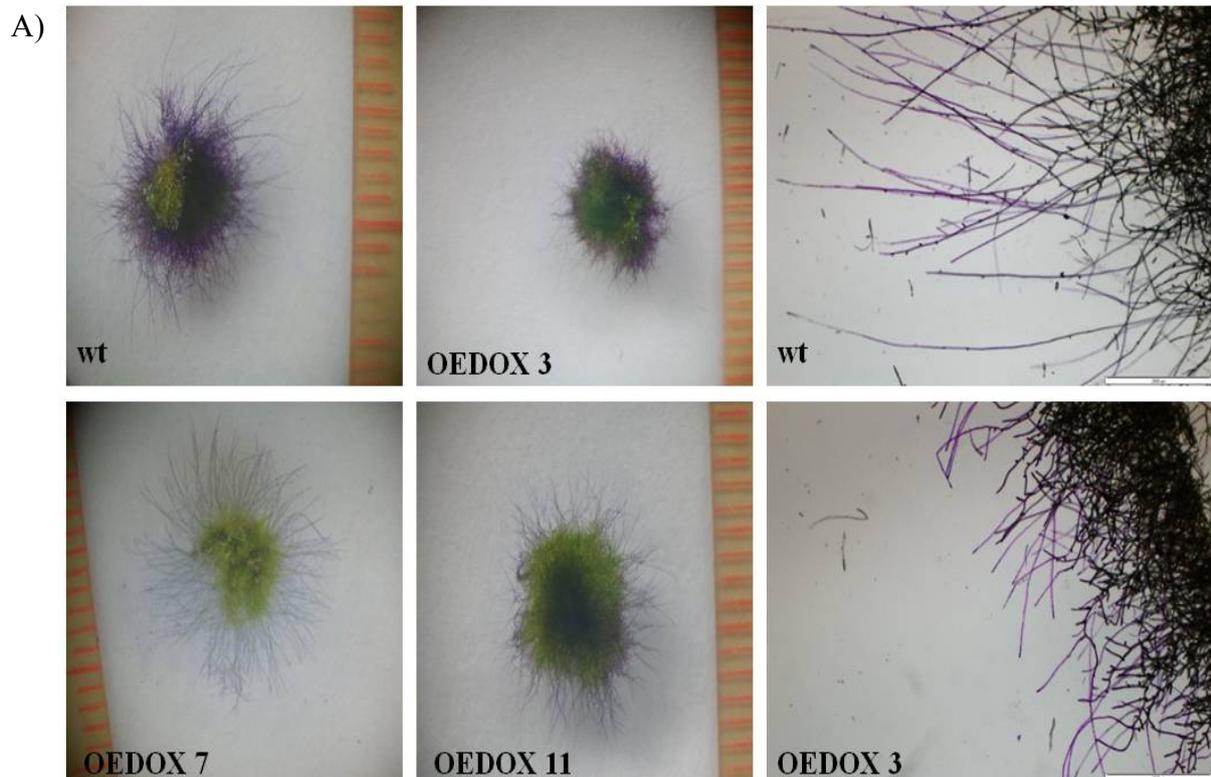


Figura 37. Colonias crecidas durante 3 semanas en medio normal, sin celofán. Las colonias OEDOX 3, 7 y 11 presentan menor proporción de protonema en comparación con colonias salvajes. wt: plantas salvajes.

Para estudiar el desarrollo del caulonema se crecieron colonias salvajes y sobreexpresantes en condiciones que favorece el desarrollo de este tejido. Luego de tres semanas se realizó una tinción con azul de toluidina y mediante lupa y microscopio se realizaron las observaciones. Como se muestra en las Figuras 38A, en una primera instancia se detectó un menor desarrollo del caulonema en las colonias de OEDOX 3 pero no para OEDOX 7 y OEDOX 11 en comparación con colonias salvajes. Al medir el largo de los filamentos de este tejido de 50 colonias se determinó que la diferencia entre plantas salvajes y el clon OEDOX 3 fue significativa mientras que para el clon OEDOX 7 y OEDOX 11 no lo fue (Figura 38B).



B)

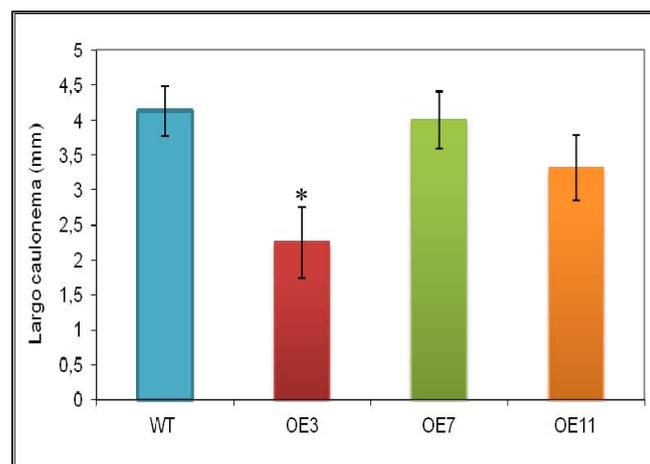


Figura 38. A) Tinción con toluidina de colonias de *P. patens* salvaje, OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11 de 3 semanas crecidas en medio que favorece el desarrollo del caulonema. B) Medida del largo del filamento de caulonema de colonias; wt: plantas salvajes, OE3: OEDOX 3, OE7: OEDOX 7 y OE11: OEDOX 11 de 3 semanas crecidas en medio que favorece el desarrollo del caulonema. Test estadístico de Kruskal–Wallis no paramétrico, $p < 0,0000001$ (*).

Para estudiar el desarrollo del cloronema se creció el protonema en medio BCDTA sin el agregado de tartrato de amonio y se observó el tejido a los 6 días (Figura 39). Se observó en una primera instancia que algunas células del cloronema de los clones OEDOX 3, 7 y 11 son más cortas que células del genotipo salvaje. Para confirmar esta

observación se midió el largo de las células y se contó el número de células según el tamaño para cada genotipo (Figura 39).

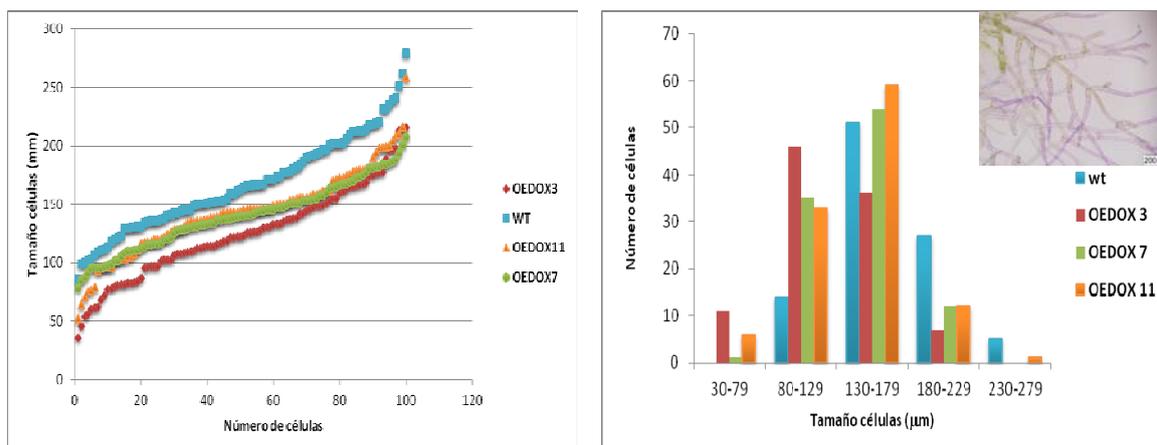


Figura 39. Gráficas donde se muestra la distribución de células según el tamaño para plantas salvajes: wt, OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11. Recuadro: foto representativa del tejido que se utilizó para medir el largo de las células del cloronema, teñido con toluidina.

Al medir el largo de 100 células para cada genotipo se observó que las células del clon OEDOX 3, si bien presentan diversos tamaños, en su mayoría son más pequeñas que las del genotipo salvaje. Los clones OEDOX 7 y 11 aunque presentan una distribución del tamaño celular con respecto al número de células menor al de plantas salvajes, esta no es tan marcada como para el clon OEDOX 3.

4.2.4.4 Análisis de la susceptibilidad de las plantas que sobreexpresan *Ppα-DOX* comparado con plantas salvajes en respuesta a patógenos

Para determinar si los sobreexpresantes OEDOX presentan cambios en los niveles de susceptibilidad frente a patógenos, se analizó el daño celular de los tejidos de los sobreexpresantes después del tratamiento con una suspensión de esporas del hongo *B. cinerea* y con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*. Para los dos tratamientos se realizaron ocho experimentos independientes, los cuales en su mayoría mostraron resultados similares. Las tinciones con azul de Evans se realizaron a las 24 horas post-tratamiento y se analizó la incorporación del colorante, el cual es proporcional al daño generado. Como control se utilizaron colonias sin tratar.

En la Figura 40 se muestran los datos correspondientes al tratamiento con suspensión de esporas del hongo *B. cinerea*. Los datos se analizaron mediante test estadístico no paramétrico y no se detectaron diferencias significativas entre el daño celular generado por *B. cinerea* en el genotipo salvaje y los sobreexpresantes OEDOX 3, 7 y 11.

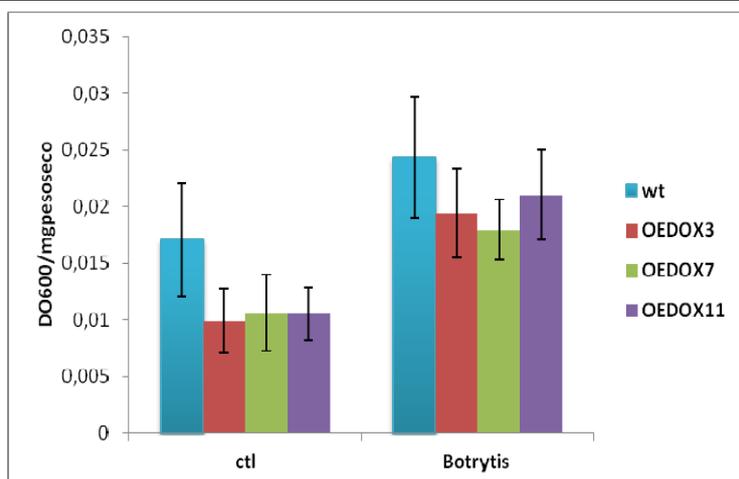


Figura 40. Evaluación de la muerte celular en plantas salvajes: wt, OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11 luego de 24 h de tratamiento con una suspensión de esporas del hongo *B. cinerea* (1×10^5). Ctl: control, plantas sin tratar. Todos los tratamientos se realizaron con colonias de tres semanas crecidas en medio normal con celofán. La tinción con azul de Evans se realizó como se describe en materiales y métodos. La captación del azul de Evans fue cuantificada por espectrofotometría a 600 nm. El peso seco fue medido luego de secar las muestras a 65°C ON.

Los resultados obtenidos para el daño celular generado por el tratamiento con el CF de la cepa SCC1 se muestran en la Figura 41. Los datos se analizaron mediante un test estadístico no paramétrico de variables independientes el cual determinó que la muerte celular en el clon OEDOX 3 generada por el CF es significativamente menor en comparación con plantas salvajes ($p=0,0003$), mientras que para los clones OEDOX 7 y 11 no se detectan diferencias significativas.

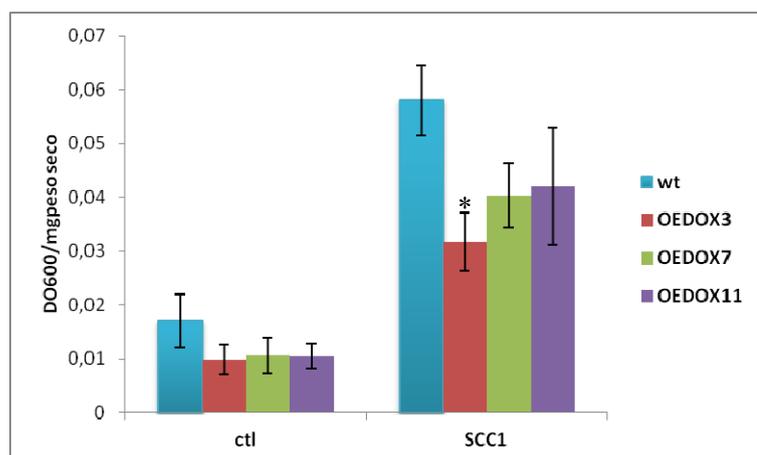


Figura 41. Evaluación de la muerte celular en plantas salvajes: wt, OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11 luego de 24 h de tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*. Ctl: control, plantas sin tratar. Todos los tratamientos se realizaron con colonias de tres semanas crecidas en medio normal con celofán. La tinción con azul de Evans se realizó como se describe en materiales y métodos. La captación del azul de Evans fue cuantificada por espectrofotometría a 600 nm. El peso seco fue medido luego de secar las muestras a 65°C ON. Test estadístico de Kruskal–Wallis no paramétrico, $p=0,0003$.

5. Discusión

5.1 Obtención de plantas transgénicas para el análisis de actividad GUS

Se utilizaron distintas aproximaciones para confirmar la obtención de plantas transgénicas en las que el gen *Pp α -DOX* se encuentre fusionado al gen GUS. Los análisis por PCR revelaron que los clones α -DOX/GUS 2 y 12 incorporaron la construcción en el lugar correcto del genoma de *P. patens* ya que se lograron amplificar los fragmentos correspondientes al extremo 5' y 3' de la construcción utilizando cebadores por fuera de la misma y cebadores ubicados en la construcción. Mientras que en el clon α -DOX/GUS 12 se amplificó una única banda del tamaño esperado tanto para el extremo 5' como para el extremo 3', en el clon α -DOX/GUS 2 se observaron además algunas bandas adicionales de tamaños no esperados. Al analizar los clones 4 y 11 sólo se pudo amplificar el fragmento 5' y con este conjunto de cebadores también se detectaron bandas que no coinciden con el tamaño esperado, observándose un patrón de amplificación similar en ambos clones. Para los clones 3 y 13 se observó amplificación con uno de los conjuntos de cebadores pero no con el otro. La presencia de producto de amplificación con uno de los conjuntos de cebadores y la ausencia de producto con el otro conjunto de cebadores, para alguno de los clones, indica que la construcción se insertó correctamente en uno de los extremos pero no en el otro. Esto podría estar indicando que la construcción fue incorporada en uno de los extremos mediante un evento de recombinación homóloga y probablemente mediante recombinación ilegítima en el otro extremo. Este tipo de inserciones ha sido descrito en la literatura, indicando que su frecuencia es mayoritaria, cuando existe en la construcción una asimetría en el tamaño de los fragmentos homólogos (Kamisugi, *et al.*, 2005; Kamisugi, *et al.*, 2006). Si bien la construcción generada en este trabajo es simétrica, no se descarta que este tipo de evento pueda haber ocurrido. También se ha reportado que el vector de reemplazo alélico puede incorporarse en tandem o múltiples copias denominadas concatémeros, durante la recombinación homóloga (Kamisugi, *et al.*, 2006). Este hecho podría explicar de igual forma la ausencia de amplificación en uno de los extremos en algunos clones. La aparición de bandas de tamaños no esperados, en los clones 2, 4 y 11 podría deberse tanto a la inserción en tándem o inespecífica, mediante recombinación ilegítima, en el genoma de *P. patens*.

Los análisis mediante Southern blot revelaron que en el transformante α -DOX/GUS 12 la construcción se incorporó en copia única ya que la sonda hibridó con un único fragmento de ADN del tamaño esperado. Al observar los carriles correspondientes al clon 2, 11 y 13 además de la banda del tamaño esperado se obtuvieron bandas adicionales. En el caso del clon 11 al tiempo de exposición que se muestra en la Figura 22B no se observan bandas discretas debido a la inserción de múltiples copias de la construcción en el genoma.

Por lo tanto, los análisis por PCR y Southern blot revelaron que en el clon denominado α -DOX/GUS 12 la construcción se incorporó en el lugar correcto y en copia única. Dado que durante la transformación de *P. patens* se pueden generar plantas poliploides, debido a la fusión de protoplastos (Schween, 2005), se chequeó el nivel de ploidía mediante citometría de flujo determinándose que este clon es haploide al igual que las plantas salvajes. Al determinar la actividad Pp α -DOX en α -DOX/GUS 12 encontramos que ésta es nula mientras que en plantas salvajes se detectó una actividad de aproximadamente 12 $\mu\text{moles.g}^{-1}\text{prot min}^{-1}$. Esta ausencia de actividad Pp α -DOX en α -DOX/GUS 12 puede deberse a que al estar fusionada al gen GUS alguno de los sitios activos de Pp α -DOX, His-163, Trp-165, His-318, Thr-323, Tyr-386, His-389, Phe-556, Phe-559, y Arg-566, no quedaron accesibles al producirse el plegamiento de la proteína de fusión. En los demás clones que se obtuvieron y fueron analizados por PCR y Southern blot no se encontró otro en el que la construcción se haya insertado en copia única. A pesar de esto decidimos medir la actividad Pp α -DOX del clon denominado α -DOX/GUS 2, para el cual se verificó por PCR la correcta inserción de la construcción aunque el análisis de Southern blot reveló múltiples inserciones de la misma. El transformante α -DOX/GUS 2 presentó un patrón de expresión de la actividad GUS, y por lo tanto de la α -DOX, idéntico al transformante α -DOX/GUS 12, tanto durante el desarrollo como con los tratamientos con *B. cinerea* y el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*. También se determinó el nivel de ploidía para el clon α -DOX/GUS 2 detectándose que este es haploide al igual que el genotipo salvaje. En el clon α -DOX/GUS 2 se detectó actividad Pp α -DOX similar a la que presentan plantas salvajes y esta aumenta al realizar el tratamiento con el CF de *Pcc* cepa SCC1. La presencia de actividad Pp α -DOX en este clon puede deberse a que la fusión del gen GUS a Pp α -DOX no provocó cambios en el sitio activo de la enzima. Los resultados obtenidos al chequear la

inserción de la construcción en el genoma de *P. patens* en el extremo 5' mostraron, en el clon α -DOX/GUS 2, una posible inserción en tándem ya que se obtuvo una banda adicional en el chequeo mediante PCR. Esta múltiple inserción puede haber provocado una conformación tridimensional de la α -DOX para el clon α -DOX/GUS 2 diferente a la del clon α -DOX/GUS 12 y en la cual el sitio activo de la enzima quedó accesible. Al analizar la actividad GUS en los clones obtenidos se observó que el clon 11, el cual tenía la mayor cantidad de inserciones, tenía una expresión constitutiva en el protonema y en todo el gametóforo, incluyendo hojas, tallo y rizoides (datos no mostrados). Este resultado indica que el “cassette” se insertó de manera ilegítima en alguna región del genoma bajo el control de un promotor constitutivo.

Dado que el patrón de expresión del gen GUS y por lo tanto de la α -DOX es idéntico en el clon α -DOX/GUS 12 que no tiene actividad Pp α -DOX y en el clon α -DOX/GUS 2 que si presenta actividad Pp α -DOX, podemos indicar que las oxilipinas producidas por Pp α -DOX no alteran el patrón de expresión de la α -DOX, y que por lo tanto se pueden utilizar ambos clones para analizar el patrón de expresión de esta enzima en los tejidos de *P. patens*.

5.2 La enzima α -DOX se expresa en células mitóticamente activas

En la mayoría de las plantas vasculares, las células de los rizoides, pelos radicales y tubos de polen presentan crecimiento apical (Carol & Dolan, 2002; Smith, 2003). En *P. patens* se ha demostrado que tanto las células del cloronema, del caulonema y los rizoides tienen crecimiento apical y que la célula ubicada en el ápice del filamento se divide continuamente (Menand, *et al.*, 2007; Cove, *et al.*, 1997; Vidali & Bezanilla, 2012).

Al realizar el análisis de la actividad GUS en plantas transgénicas α -DOX/GUS detectamos actividad en las células apicales del cloronema y caulonema presentes en el borde de las colonias (Figura 25A; B y E). En yemas se detectó actividad GUS en primordios de pelos axilares y en primordios de rizoides (Figura 25C). Además, en los gametóforos se observa actividad GUS en las células apicales de los rizoides y en pelos axilares (Figura 25 D).

También se observó actividad GUS en protoplastos regenerándose en medio BCDAT a partir de los 6 días luego de la siembra. En la célula inicial (protoplasto) que se comienza a dividir se detectó acumulación de GUS indicando un aumento de expresión de *Ppα-DOX* y a medida que aumentaba el número de células esta actividad se observó en las células apicales disminuyendo la actividad GUS en las células que están más hacia el centro de la colonia (Figura 26).

Estos resultados sugieren que el gen *Ppα-DOX* se expresa en células mitóticamente activas como lo son las células apicales del caulonema, cloronema y rizoides. Dado que observamos expresión del gen GUS en células apicales, analizamos lo que ocurre en las células que se generan a partir de hojas cortadas de plantas transgénicas *α-DOX/GUS* ya que se ha demostrado que al incubar hojas cortadas de *P. patens* en medio de cultivo sin fitohormonas exógenas, a partir de las células cercanas al corte se comienza a evidenciar la aparición de células con características similares a las células apicales del cloronema (Ishikawa, *et al.*, 2011). Se ha demostrado la existencia de una reprogramación celular en las células del borde de la hoja cortada, donde varias células entran nuevamente en el ciclo celular dando lugar a la formación de células del cloronema (Nishiyama, *et al.*, 2012). Se observó actividad GUS en células de la hoja que se dividen y en este tipo de células apicales del cloronema desarrollándose en medio normal a partir de hojas cortadas (Figura 27). Este resultado refuerza la idea de que *Ppα-DOX* se expresa en células mitóticamente activas.

5.3 *Ppα-DOX* se expresa en respuesta a auxinas y en tejidos donde se producen auxinas

P. patens presenta una respuesta similar a la de plantas vasculares frente a la aplicación de hormonas; se produce la activación de una respuesta fisiológica como la transición de cloronema a caulonema (Johri & Desai, 1973), alargamiento del tallo (Fujita, *et al.*, 2008) y la aparición de rizoides en los brotes (Ashton, *et al.*, 1979).

Se ha demostrado que *P. patens* sintetiza y responde a la aplicación exógena de auxinas (Cooke, *et al.*, 2002; Hayashi, *et al.*, 2008). Anteriormente en nuestro laboratorio se observó que al tratar colonias de *P. patens* con auxinas, se induce la expresión del gen *Ppα-DOX* (Castro, 2006). Para verificar este resultado se trataron plantas transgénicas *α-DOX/GUS* con la auxina ácido *α*-naftaleno acético (*α*-naphthalene acetic acid, NAA)

y se analizó la actividad GUS 1, 2 y 3 días post- tratamiento. Los estudios realizados con auxinas mostraron que a los 2 y 3 días post-tratamiento la expresión del gen GUS aumenta en el protonema del borde de las colonias y aparece en tallos y hojas. En los rizoides además de observarse un aumento en el número de estos, se detectó un aumento de actividad GUS (Figura 30). Estos resultados concuerdan con la observación de la inducción del gen *Ppα-DOX* frente al tratamiento con auxinas.

Al analizar yemas y gametóforos en diferentes estadios de desarrollo se observó actividad GUS en primordios de rizoides, rizoides, primordios de pelos axilares y pelos axilares. Estos sitios conjuntamente con las células apicales del caulonema son sitios de producción de auxinas (Eklund, *et al.*, 2010). Estos resultados demuestran que la α -DOX de *P. patens* se expresa en tratamientos con auxinas y en sitios de producción de auxina.

5.4 Obtención de sobreexpresantes del gen *Ppα-DOX*

Para confirmar la obtención de plantas sobreexpresantes de *Ppα-DOX* se realizaron análisis de “Northern blot” para verificar los niveles de transcripto en comparación con plantas salvajes. Se observó que cuatro de los seis clones obtenidos presentaban distintos niveles de expresión de *Ppα-DOX* siendo estos niveles superiores al de plantas salvajes. Los restantes dos clones no presentaron un aumento en los niveles de expresión de *Ppα-DOX* comparado con plantas salvajes. Se seleccionaron tres de estos clones denominados OEDOX 3, OEDOX 7 y OEDOX 11 para realizar la medida del nivel de ploidía y de actividad *Ppα-DOX*.

Por citometría de flujo se determinó que los tres clones son haploides al igual que *P. patens* salvaje. En cuanto a la medida de actividad *Ppα-DOX* se determinó que el sobreexpresante OEDOX 3 posee un nivel de actividad superior al de plantas salvajes pero no alcanza el mismo nivel de actividad detectado para plantas salvajes tratadas con *Pcc* cepa SCC1. Los clones OEDOX 7 y 11 presentaron niveles de actividad *Ppα-DOX* similar a plantas salvajes. Estos resultados no concuerdan con lo observado en el “Northern blot” ya que en éste los niveles de transcripto de los sobreexpresantes son mayores que los de plantas salvajes. Este resultado se contrapone a lo hallado en plantas de *Arabidopsis* transgénicas que contienen el ADNc de α -DOX1 fusionado al promotor constitutivo CaMV 35S (“plantas sense”) en las que los niveles de transcriptos

observados mediante “Northern blot” se correlacionan con los niveles de actividad de la enzima α -DOX1 (Ponce de León, *et al.*, 2002). Esta diferencia podría deberse a la existencia de diversos mecanismos de regulación post-transcripcionales y post-traduccionales los cuales podrían diferir entre *P. patens* y *Arabidopsis*.

Por otro lado, la no concordancia de los niveles de transcritos con los niveles de actividad Pp α -DOX podría deberse a la existencia de inhibición de la actividad Pp α -DOX por los productos generados por esta enzima. Se observó anteriormente que utilizando el ácido palmítico como sustrato, la obtención de los productos termina rápidamente cuando se ha consumido entre el 5-10% del C16:0 (ácido palmítico), lo cual podría sugerir una posible inhibición de la enzima por la formación de productos (datos no publicados obtenidos por Gerard Bannenberg, Centro Nacional de Biotecnología, España).

Anteriormente se demostró en nuestro laboratorio que protoplastos de plantas salvajes tratados con oxilipinas derivadas de las α -DOX no llegan a regenerarse correctamente, dando lugar a una menor proporción de filamentos de protonema comparado con tejidos regenerados de protoplastos control (resultado no publicado). Además, colonias de plantas salvajes crecidas en medio con oxilipinas derivadas de las α -DOX son más pequeñas que las colonias de plantas salvajes crecidas en medio sin oxilipinas (resultados no publicados). Observaciones al microscopio de plantas crecidas en medio con oxilipinas permitieron observar que el protonema de estas colonias presentaba una disminución en el tamaño de las células, lo que se reflejaba en un crecimiento más compacto y por lo tanto en un tamaño más chico de la colonia (resultados no publicados). Estos resultados indican que las oxilipinas alteran el desarrollo del protonema de *P. patens* y si consideramos que se observó la acumulación de GUS en células apicales del protonema, podríamos sugerir que probablemente se necesiten determinados niveles de oxilipinas para tener un desarrollo normal. Si estos aumentan mucho por encima de los niveles normales, las células son más chicas y se obtienen colonias pequeñas. Por lo tanto, los protoplastos de aquellos transformantes que presenten niveles altos de actividad Pp α -DOX no llegarían a desarrollarse correctamente o serían tan pequeños que no se seleccionarían en las etapas de regeneración. Esto podría explicar el hecho que no se hayan obtenido más clones con

altos niveles de actividad Pp α -DOX ya que se perderían en la etapa de regeneración de protoplastos.

5.5 La sobreexpresión de Pp α -DOX altera el desarrollo del musgo *P. patens*

En plantas vasculares como *Arabidopsis* y tomate, la α -DOX2 está involucrada en el desarrollo vegetal. La α -DOX2 no se induce frente a la infección con patógenos (Hamberg, *et al.*, 2005) y su expresión se observa en hojas en etapas tempranas del desarrollo y disminuye a medida que las plantas maduran aunque se observa expresión en hojas de plantas florecidas. Plantas de *Arabidopsis* mutadas en *Ata-DOX2* no presentan un efecto en el desarrollo, y fenotípicamente son similares a plantas salvajes. Sin embargo, plantas de tomate con mutaciones en α -DOX2 son más chicas en comparación con plantas salvajes (Bannenber, *et al.*, 2009). En *P. patens* existe un solo gen que codifica para una α -DOX cuya secuencia aminoacídica deducida presenta una alta homología con las α -DOXs de plantas vasculares (49-53% de identidad) (Hamberg, *et al.*, 2005). Con el objetivo de estudiar si la α -DOX de *P. patens* influye en el desarrollo se analizaron fenotípicamente colonias de los sobreexpresantes OEDOX 3, 7 y 11 en comparación con plantas salvajes.

Al analizar el tamaño de las colonias se detectó una disminución significativa en el diámetro de las colonias de los tres sobreexpresantes comparándolas con plantas salvajes, siendo el OEDOX 3 el de menor tamaño. Como se mencionó anteriormente, este resultado es similar al observado en nuestro laboratorio en plantas salvajes tratadas con oxilipinas en las que esta disminución del diámetro de las colonias se debe a que las células del protonema son más chicas. Es por esto que se analizó el tamaño de las células del protonema de los clones OEDOX 3, 7 y 11 en comparación con plantas salvajes.

Para estudiar el desarrollo del caulonema se crecieron colonias en un medio que favorece el desarrollo de este tejido y se midió el largo de los filamentos de caulonema. Se hallaron diferencias significativas en el clon OEDOX 3 en comparación con el genotipo salvaje siendo los filamentos de caulonema significativamente más cortos en el clon 3 (Figura 38). En cuanto al desarrollo del cloronema se analizó la distribución del número de células según el tamaño celular. Se observó claramente que hay una mayor

proporción de células del cloronema de los transformantes OEDOX 3 que tienen un menor tamaño en comparación con plantas salvajes, mientras que los clones OEDOX 7 y 11 presentan una distribución similar (Figura 39). Estos resultados indican que el clon que presenta mayor actividad Pp α -DOX, OEDOX 3, tiene filamentos del caulonema más cortos y una proporción mayor de células de menor tamaño comparado con plantas salvajes, lo que explicaría la clara disminución observada en el diámetro de las colonias del transformante OEDOX 3. En el caso de los clones OEDOX 7 y OEDOX 11 que presentan actividad Pp α -DOX similar a plantas salvajes, no se encontró una diferencia significativa en el largo de los filamentos del caulonema, aunque si existe una proporción mayor de células del cloronema de menor tamaño a la de plantas salvajes. Este resultado podría indicar que el menor tamaño observado en células del cloronema no se deba solamente a un efecto provocado por la α -DOX, sino que puede haber otro factor que induzca este cambio. En nuestro laboratorio se observó que las colonias del mutante KO de *Pp α -DOX* obtenido anteriormente, son más chicas que las de plantas salvajes (resultado no mostrado), lo que indica que podría haber un efecto de la transformación que afecta el tamaño de las colonias. Este efecto no se observó en los transformantes α -DOX/GUS, siendo el diámetro de las colonias similar al de plantas salvajes (resultado no mostrado). Estos resultados sugieren que aunque puede existir una disminución en el tamaño de las células provocado por la transformación de protoplastos de *P. patens*, la disminución observada especialmente en el OEDOX 3 también se debe a un efecto provocado por el aumento de la actividad Pp α -DOX.

Observando los gametóforos de plantas salvajes y sobreexpresantes se detectaron diferencias en el largo de los rizoides. Al medir el largo de los mismos hallamos que los rizoides de OEDOX 3 son significativamente más cortos que los de plantas salvajes, este clon es el que presenta mayor actividad Pp α -DOX. Si bien los rizoides de OEDOX 7 y 11 son más cortos que los de plantas salvajes esta diferencia no es significativa.

Al analizar el desarrollo del mutante KO del gen *Pp α -DOX* se observó que tanto el largo de los rizoides como el tamaño de las células del caulonema y el cloronema son similares al de plantas salvajes (resultado no publicado). Estos resultados indican que la falta de actividad Pp α -DOX no modifica significativamente el desarrollo de *P. patens* mientras que el aumento en la actividad de esta enzima si tiene un efecto en el desarrollo de varios tejidos de *P. patens*.

Dado que se observaron alteraciones en el desarrollo de *P. patens* al sobreexpresar *Ppα-DOX* y al tratar plantas salvajes con oxilipinas, podemos sugerir que probablemente exista un control a nivel celular de los productos de la α -DOX que se acumulan en las células para permitir un desarrollo normal de las colonias de *P. patens*.

5.6 La sobreexpresión de *Ppα-DOX* disminuye la susceptibilidad de *P. patens* frente a microorganismos patógenos

Se ha demostrado que dos patógenos de plantas vasculares como la bacteria *Pcc* y el hongo *B. cinerea* son capaces de infectar *P. patens* y pueden inducir una respuesta de defensa la que se evidencia por la inducción de genes que codifican para proteínas con homología a PR-1, chalcona sintasa (CHS), fenil-amonioliasa (PAL) y lipoxigenasa (LOXs) de plantas vasculares. Se observó que tanto el tratamiento con el filtrado de CF de la bacteria *Pcc* como con esporas de *B. cinerea* generan muerte celular de los tejidos de *P. patens* con características de muerte celular programada como el colapso del citoplasma, la acumulación de compuestos fenólicos y el amarronamiento de los cloroplastos (Ponce de León, *et al.*, 2007). Algunos estudios han demostrado que el gen que codifica para la α -DOX de *P. patens* se expresa con tratamientos que inducen la muerte celular programada, incluyendo el CF de la cepa SCC1, *B. cinerea* y varios ROS, lo cual sugiere un posible rol de estas enzimas en este proceso (Castro, 2006).

Para estudiar la muerte celular generada por *B. cinerea* se realizaron tinciones con azul de Evans de plantas salvajes y sobreexpresantes OEDOX tratadas con una suspensión de esporas del hongo (1×10^5 esporas/mL). En los resultados que se muestran en la Figura 40 no se observó una disminución significativa de la muerte celular en los tres clones OEDOX con respecto a plantas salvajes. Se esperaba observar un aumento de resistencia en plantas OEDOX 3 tratadas en comparación con el genotipo salvaje pero esto no ocurrió. Estos resultados conjuntamente con otras observaciones realizadas en nuestro laboratorio sugieren un problema técnico en la medida con azul de Evans cuando se inocula con esporas de *B. cinerea* y no con otros patógenos como *Pythium irregulare*. Esto puede deberse al modo de infección de *B. cinerea* o al tipo de daño que genera en las membranas. Al haber mucho daño celular el colorante azul de Evans podría difundir hacia el interior de las células y nuevamente hacia afuera de las células sin quedar retenido en el interior de las mismas. Como consecuencia, aunque las plantas

salvajes estén más dañadas comparado con plantas del OEDOX 3, no retienen más colorante y por eso no se observan diferencias. Como alternativa a la cuantificación de la muerte celular, se podrá comparar la susceptibilidad de plantas salvajes y OEDOX 3 mediante la cuantificación de micelio de *B. cinerea* mediante qPCR (técnica puesta a punto en nuestro laboratorio) y/o mediante el análisis del patrón de expresión de genes marcadores de muerte celular, en los distintos genotipos.

Los análisis de actividad GUS realizados en plantas transgénicas tratadas con *B. cinerea* 24 horas post-tratamiento revelaron que la expresión del gen GUS aparece en toda la colonia y en las hojas de los gametóforos. Estos son tejidos colonizados por el hongo y al teñir el hongo con el colorante solofenil que se une a las paredes de *B. cinerea*, pudimos observar actividad GUS en las células que rodean a las células infectadas de la hoja. Este resultado demuestra que el gen *Pp α -DOX* se expresa en respuesta al tratamiento con *B. cinerea* y sugiere que los productos de la α -DOX podrían proteger a las células que rodean al sitio de infección, activando la defensa de estas células y/o frenando el avance del patógeno al resto de los tejidos.

Anteriormente se demostró en nuestro laboratorio que la complementación del mutante *Pp α -dox* con la construcción utilizada para la sobreexpresión de *Pp α -DOX*, da lugar a una disminución significativa de la muerte celular en el clon complementado comparado con plantas KO cuando las plantas son tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc* (Machado, 2010). Este resultado sugiere que los productos generados por la α -DOX de *P. patens* podrían estar involucrados en la protección de la muerte celular causada por patógenos al igual que ocurre en plantas vasculares.

La cuantificación de la muerte celular, generada en respuesta al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc* en plantas salvajes y sobreexpresantes OEDOX, mediante tinciones con el colorante azul de Evans, revela que el único sobreexpresante que mostró menor muerte celular en comparación con plantas salvajes es el OEDOX 3 (Figura 41). Este resultado concuerda con el hecho de que el clon OEDOX 3 sea el único que muestra un aumento en la actividad *Pp α -DOX* comparado con plantas salvajes e indica que el aumento de actividad da lugar a una menor muerte celular de los tejidos tratados con elicitores de SCC1 de *Pcc*.

Al realizar el análisis de actividad GUS en plantas transgénicas α -DOX/GUS tratadas con el CF de la cepa SCC1 se detectó que a las 24 horas post-tratamiento la expresión del gen GUS aparece en toda la colonia y en el tallo y hojas de los gametóforos.

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de la muerte celular frente al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*, sumado a los resultados observados en plantas transgénicas α -DOX/GUS tratadas sugieren que el gen *Pp α -DOX* se induce en respuesta al tratamiento con elicitores de esta bacteria y que los productos de la enzima α -DOX podrían estar involucrados en la protección frente a la muerte celular programada.

Conjuntamente al análisis de muerte celular en los clones sobreexpresantes se estudió la respuesta frente a *B. cinerea* y el CF de la cepa SCC1 de *Pcc* del mutante KO obtenido en nuestro laboratorio. En ambos tratamientos la respuesta encontrada fue similar a la de plantas salvajes tratadas (resultado no publicado). Este resultado indicaría que la ausencia de actividad *Pp α -DOX* no afectaría la susceptibilidad frente a patógenos a diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis* donde si es necesario que la α -DOX1 sea funcional para tener una correcta respuesta de defensa. En *P. patens* se podrían producir oxilipinas derivadas de la vía de las LOXs que podrían sustituir las funciones de las oxilipinas que produce la α -DOX, lo que daría lugar a una respuesta de defensa en plantas KO similar a la de plantas salvajes.

6. Conclusiones

- Se lograron obtener plantas transgénicas de *P. patens* con el gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS) fusionado a *Pp* α -DOX.
- Se obtuvieron dos clones α -DOX/GUS denominados α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12 los cuales incorporaron la construcción en el lugar correcto del genoma de *P. patens*. El clon α -DOX/GUS 12 presenta una única inserción de la construcción, pero no se detectó actividad *Pp* α -DOX. El clon α -DOX/GUS 2 presenta múltiples inserciones de la construcción en el genoma y posee una actividad *Pp* α -DOX similar a la de plantas salvajes.
- El patrón de acumulación de la actividad GUS en los clones α -DOX/GUS 2 y α -DOX/GUS 12 son idénticos, indicando que los productos de la α -DOX no afectan su patrón de expresión de *Pp* α -DOX.
- Las plantas α -DOX/GUS permitieron demostrar que la α -DOX se expresa en células mitóticamente activas, en respuesta al tratamiento con auxinas y en tejidos dañados por el hongo *B. cinerea* y por el CF de la cepa SCC1 de *Pcc*.
- Se obtuvieron plantas que sobreexpresan la *Pp* α -DOX en *P. patens* siendo el transformante OEDOX 3 el único que presentó mayor actividad α -DOX que las plantas salvajes.
- El aumento de la actividad *Pp* α -DOX da lugar a un efecto en el desarrollo evidenciado en una disminución en el diámetro de las colonias y en un acortamiento de los rizoides.
- El protonema de OEDOX 3 tiene filamentos de caulonema más cortos y una proporción de células del cloronema de menor tamaño comparando con tejidos de plantas salvajes.
- El aumento de la actividad *Pp* α -DOX en el OEDOX 3 provoca una disminución en la muerte celular de los tejidos, causada por elicitores de la cepa SCC1 de *Pcc*, comparado con plantas salvajes, sugiriendo un posible rol de las oxilipinas generadas por la *Pp* α -DOX en la protección de la muerte celular de los tejidos.

7. Perspectivas futuras

- Las plantas transgénicas α -DOX/GUS generadas en este trabajo son una valiosa herramienta de trabajo que podrán ser utilizadas para analizar la expresión de *Pp α -DOX* en diferentes condiciones y en distintos tejidos.
- Mediante la utilización de plantas α -DOX/GUS se analizará la expresión de *Pp α -DOX* en el esporofito.
- Se estudiará la respuesta de plantas OEDOX 3 en comparación con plantas salvajes en respuesta a estrés abiótico como salinidad, sequía, entre otros.
- Se cuantificará el micelio de *B. cinerea* mediante qPCR en plantas salvajes y OEDOX 3.
- Se evaluará la respuesta del OEDOX 3 frente al tratamiento con otros patógenos que infectan *P. patens* como *Fusarium graminearum*.
- Dado que en nuestro laboratorio se obtuvo el transcriptoma de plantas salvajes y KO de *Pp α -DOX* tratadas con elicitores de la cepa SCC1 de *Pcc*, y sin tratar, se seleccionarán genes que mostraron una disminución en la expresión en el mutante, para analizar si estos se expresan más en el sobreexpresante OEDOX 3. Si observamos un aumento en la expresión de genes de defensa o en genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo antioxidante, podremos sugerir que el aumento de resistencia observada en el clon OEDOX 3 se debe a una mayor activación de la respuesta de defensa.

8. Referencias bibliográficas

- Apel K, Hirt H** (2004) Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373–399.
- Ashton NC, Cove DJ** (1977) The isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet.* 154: 87-95.
- Ashton NW, Grimsley NH, Cove DJ** (1979) Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427-435.
- Bannenberg G, Martínez M, Rodríguez MJ, López MA, Ponce de León I, Hamberg M, Castresana C** (2009) Functional analysis of alpha-DOX2, an active alpha-dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant Physiol.* 151:1421-1432.
- Bate NJ, Rothstein SJ** (1998) C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* 16: 561-569.
- Beckers GJM, Spoel SH** (2006) Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* 8: 1–10.
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA** (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 12053-12058.
- Blée E** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res.* 37: 33-72.
- Bonas U, Lahaye T** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol.* 5:44-50.
- Boller T, Felix G** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol.* 60: 379-406.
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X** (1997) The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell.* 9: 1573-1584.
- Bowling SA, Guo A, Cao H, Gordon AS, Klessig DF, Dong X** (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 6: 1845-1857.
- Browse, J** (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 183–205.

- Carol RJ, Dolan L** (2002) Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357: 815–821.
- Castro A** (2006) Estudio de la función de las alfa-Dioxigenasas en la respuesta de defensa del musgo *Physcomitrella patens* frente a microorganismos patógenos. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.
- Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X** (1998) Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis* cpr6-1 mutant. *Plant Cell*. 10: 557-569.
- Cooke TJ, Poli D, Sztein AE, Cohen JD** (2002) Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol* 49: 319-338.
- Cove JL, Knight CD, Lamparter T** (1997) Mosses as model systems. *Trends Plant Sci*. 2: 99–105.
- Croft K, Juttner F, Slusarenko AJ** (1993) Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol*. 101: 13-24.
- Danon A, Rotari VI, Gordon A, Mailhac N, Gallois P** (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *J.Biol.Chem*. 279: 779-787.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon R, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-388.
- Del Pozo O, Lam E** (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr.Biol*. 8: R896.
- Dempsey DA, Klessig DF** (2012) SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci*. 17: 538-545.
- Dong X** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 1: 316-23.
- Eklund DM, Thelander M, Landberg K, Ståldal V, Nilsson A, Johansson M, Valsecchi I, Pederson ER, Kowalczyk M, Ljung K, Ronne H, Sundberg E.** (2010) Homologues of the *Arabidopsis thaliana* SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*. 137: 1275-1284.

- Farrel J, R.E.** (1993) "RNA Methodologies: A guide for isolation and characterization" Academic Press, San Diego, CA.
- Feys BJ, Parker JE** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16: 449-455.
- Flor H** (1971) Current status of the gene for gene concept. *Annu Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Frank W, Ratnadewi D, Reski R** (2005) *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* 220: 384-394.
- Fujita T, Sakaguchi H, Hiwatashi Y, Wagstaff SJI, Ito M, Deguchi H, Sato T, Hasebe M** (2008) Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. *Evol. Dev* 10: 176-186.
- Furt F, Lemoi K, Tuzel E, Vidali L** (2012) Quantitative analysis of organelle distribution and dynamics in *Physcomitrella patens* protonemal cells. *BMC Plant Biol* 12:70.
- Glazebrook J** (1999) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol.* 2: 280-286.
- Goulah CC, Zhu G, Koszelak-Rosenblum M, Malkowski MG** (2013) The crystal structure of α -Dioxygenase provides insight into diversity in the cyclooxygenase-peroxidase superfamily. *Biochemistry.* 52: 1364-1372.
- Hamberg M, Chechetkin IR, Grechkin AN, Ponce de León I, Castresana C, Bannenberg G** (2006) Synthesis of 3-oxalinoic acid and beta-oxidation-resistant 3-oxa-oxylipins. *Lipids.* 41: 499-506.
- Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez MJ, Castresana C** (2005) Alkyl-dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:169-174.
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C** (1999) alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem.* 274: 24503-24513.
- Hamberg M, Sanz A, Rodriguez MJ, Calvo AP, Castresana C** (2003) Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell death. *J Biol Chem.* 278: 51796-51805.
- Hayashi K, Tan X, Zheng N, Hatate T, Kimura Y, Kepinski S, Nozaki H** (2008) Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5632-5637.

- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Kimura M, Sugimoto N, Akita A, Oguri Y, Friedman WE, Hasebe M, Kubo M** (2011) Physcomitrella cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell* 23: 2924–2938.
- Jabs T, Tschope M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 4800-4805.
- Jang G, Dolan L** (2011) Auxin promotes the transition from chloronema to caulonema in moss protonema by positively regulating PpRSL1 and PpRSL2 in *Physcomitrella patens*. *New Phytol* 192: 319-327.
- Johri MM and Desai S** (1973) Auxin regulation of caulonema formation in moss protonema. *Nat. New Biol.* 245: 223-224.
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329.
- Kamisugi Y, Cuming A, Cove D** (2005) Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Res.* 33: e173.
- Kamisugi Y, Schlink K, Rensing S, Schween G, von Stackelberg M, Cuming A, Reski R, Cove D** (2006) The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Res.* 34: 6205-6214.
- Knight CD, Sehgal A, Atwal K, Wallace JC, Cove DJ, Coates D, Quatrano RS, Bahadur S, Stockley PG, Cuming AC** (1995) Molecular Responses to Abscisic Acid and Stress are Conserved between Moss and Cereals. *The Plant Cell*. 7: 499-506.
- Koszelak-Rosenblum M, Krol AC, Simmons DM, Goulah CC, Wroblewski L, Malkowski MG** (2008) His-311 and Arg-559 are key residues involved in fatty acid oxygenation in pathogen-inducible oxygenase. *J Biol Chem.* 283: 24962-24971.
- Lam E, Kato N, Lawton M** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 818-853.
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 251-275.
- Lang D, Zimmer AD, Rensing SA, Reski R** (2008) Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends Plant Sci.* 13: 542-9.
- Lawton M, & Saidasan H** (2009) Pathogenesis in Mosses, in Annual Plant Reviews Volume 36: The Moss (Eds. Knight CD, Perroud PF, David JC).

- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 18: 583-593.
- López MA, Bannenberg G, Castresana C** (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol.* 11: 420-427.
- Machado L** (2010) Complementación de un mutante de la α -DOX en el musgo *Physcomitrella patens*: efectos en el desarrollo y la muerte celular generada por patógenos. Trabajo final de Licenciatura en Bioquímica. UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Makandar R, Nalam V, Lee H, Trick HN, Dong Y, Shah J** (2011) Salicylic acid regulates basal resistance to Fusarium head blight in wheat. *Mol Plant Microbe Interact.* 25: 431-439.
- Manosalva PM, Park SW, Forouhar F, Tong LA, FryWE, Klessig DF** (2010) Methyl esterase 1 (StMES1) is required for systemic acquired resistance in potato. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1151–1163.
- Matsumura H, Nirasawa S, Kiba A, Urasaki N, Saitoh H, Ito M, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Terauchi R** (2003) Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa L*) cells. *Plant J.* 33: 425-434.
- McDowell JM, Dangl JL** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci.* 25: 79-82.
- Menand B, Calder G, Dolan L** (2007) Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Exp. Bot.* 58: 1843–1849.
- Mishina TE, Zeier J** (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J.* 50: 500-513.
- Morel JB, Dangl JL** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4: 671-683
- Nelson MJ, Seitz SP** (1994) The structure and function of lipoxygenase. *Curr Opin Struct Biol.* 4: 878-884.
- Nishiyama T, Miyawaki K, Ohshima M, Thompson K, Nagashima A, Hasebe M, Kurata T** (2012) Digital gene expression profiling by 5'-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*. *PLoS One:* 7(5):e36471. doi: 10.1371/journal.pone.0036471.
- Norman C, Vidal S, Palva ET** (1999) Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading

enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 640-644.

O'Brien IE, Murray BG, Baguley BC, Morris BA, Ferguson IB (1998) Major changes in chromatin condensation suggest the presence of an apoptotic pathway in plant cells. *Exp.Cell.Res.* 25:46-54.

Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Cascón T, Schmelz EA, Castresana C, Ponce de León I (2009) Pythium infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta* 230:569–579.

Olsson T, Thelander M, Ronne H (2003) A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem.* 278:44439-44447.

Paponov IA, Teale W, Lang D, Paponov M, Reski R, Rensing SA, Palme K (2009) The evolution of nuclear auxin signaling. *BMC Evol Biol.* 9:126.

Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methylsalicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113–116.

Park SW, Liu PP, Forouhar F, Vlot AC, Tong L, Tietjen K, Klessig DF (2009) Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *J Biol Chem* 284: 7307–7317.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28: 489-521.

Ponce de León I & Montesano M (2013) Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *Int J Mol Sci.* 14: 3178-3200.

Ponce de León I (2011) The Moss *Physcomitrella patens* as a Model System to Study Interactions between Plants and Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. *J Pathog.* 2011: ID 719873, doi:10.4061/2011/719873.

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

Ponce de León I, Sanz A, Hamberg M, Castresana C (2002) Involvement of the Arabidopsis α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *The Plant Journal* 29:61-72.

Ponce De León I, Schmelz EA, Gaggero C, Castro A, Álvarez A, Montesano M (2012) *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defense signals, such as salicylic acid

and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Molecular plant pathology* 13: 960-974.

Postel S, Kemmerling B (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin Cell Dev Biol.* 20: 1025-1031.

Quatrano R, McDaniel S, Khandelwal A, Perroud P, Cove D (2007) *Physcomitrella patens*: mosses enter the genomic age. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 182-189.

Rantakari A, O Virtaharju, S Vähämiko, S Taira, ET Palva, HT Saarilahti, Romantschuk M (2001) Type III secretion contributes to the pathogenesis of the soft-rot pathogen *Erwinia carotovora* partial characterization of the hrp gene cluster. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 962–968

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science.* 319: 64-69.

Reski R (1998) Development, genetics and molecular biology of mosses. *Botanica Acta* 111, 1-15.

Reski R, Faust M, Wang XH, Wehe M, Abel WO (1994) Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) *B.S.G. Mol Gen Genet.* 244: 352-359.

Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol.* 49: 317-343.

Rojo E, Martin R, Carter C, Zouhar J, Pan S, Plotnikova J, Jin H, Paneque M, Sanchez-Serrano JJ, Baker B, Ausubel FM, Raikhel NV (2004) VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr Biol.* 9: 1897-1906.

- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis, T** (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed.," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanz A, Moreno JI, Castresana C** (1998) PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell*. 10: 1523-1537.
- Schaefer D, Zryd JP, Knight CD, Cove DJ** (1991) Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*. 226: 418-424.
- Schaefer DG** (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol*. 4: 143-150.
- Schaefer DG** (2002) A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol* 53:477-501.
- Schaefer DG, Zrýd JP** (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The plant Journal*. 11: 1195-1206.
- Schaefer DG, Zrýd JP** (2001) The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol*. 127: 1430-1438.
- Schween G, Schulte J, Reski R, Hohe, A** (2005) Effect of ploidy level on growth, differentiation, and morphology in *Physcomitrella patens*. *Bryologist* 108: 27-35.
- Seskar M, Shulaev V, Raskin I** (1998) Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiol* 116: 387–392.
- Smith LG** (2003) Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 63–73.
- Tena G, Boudsocq M, Sheen J** (2011) Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 14: 519–529.
- Thierauch KH, Dinter H, Stock G** (1993) Prostaglandins and their receptors: I. Pharmacologic receptor description, metabolism and drug use. *J Hypertens*. 11:1315-8.
- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF** (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*. 121: 1093-1102.
- Underwood W** (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion *Front Plant Sci*. 3: 85 doi: 10.3389/fpls.2012.00085.
- Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*. 19: 831-846.

- Vicente J, Cascón T, Vicedo B, García-Agustín P, Hamberg M, Castresana C** (2012) Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Mol Plant*. 5: 914-928.
- Vidal S, Eriksson ARB, Montesano M, Denecke J, Palva ET** (1998) Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 23-32.
- Vidal S, Ponce de León I, Denecke J, Palva ET** (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes by antagonistic pathways. *Plant Journal*, 11: 115-123.
- Vidali L, Bezanilla M** (2012) *Physcomitrella patens*: a model for tip cell growth and differentiation. *Curr Opin Plant Biol*. 15: 625-31.
- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Park SW, Yang Y, Kumar D, Zhou FS, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E** (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56: 445–456.
- Xia S, Zhu Z, Hao L, Chen JG, Xiao L, Zhang Y, Li X** (2009) Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor C subunit3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 150: 2009-2017.
- Yang Y, Shah J, Klessig D** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev*. 11: 1621-1639.
- Yao N, Eisfelder B, Marvin J, Greenberg J** (2004) The mitochondrion- an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 40: 596-610.