

TESIS DE DOCTORADO

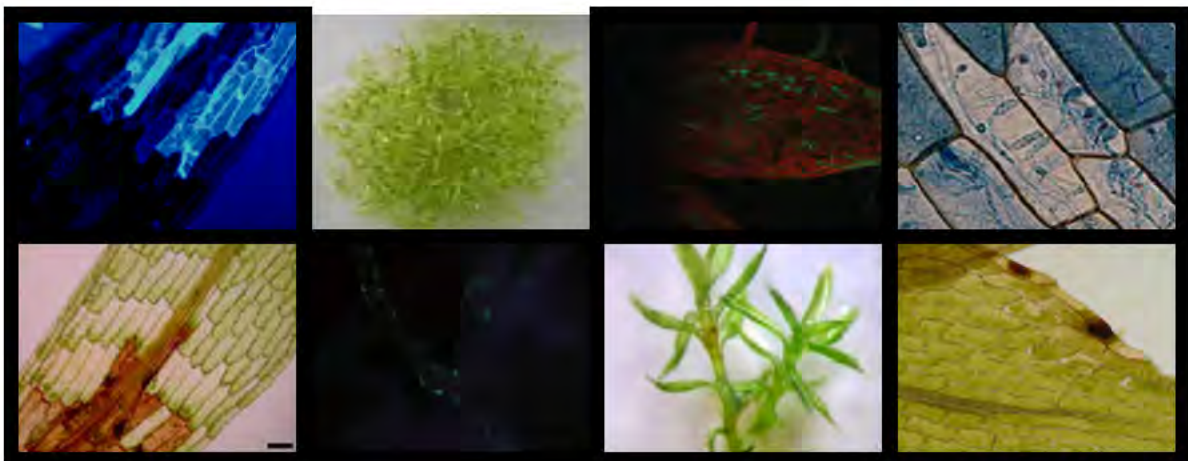


PEDECIBA

Área Biología



Physcomitrella patens: un modelo vegetal para el estudio de interacciones planta-patógeno



Alexandra Castro

Orientadora: Dra. Inés Ponce de León

Co-orientadoras: Dras. Sabina Vidal y Carmen Castresana

Tribunal de Tesis:

Presidente: Dra. Susana Castro

Vocales: Dr. Omar Borsani y Dr. José Sotelo

17 de Junio, 2014

Resumen

El conocimiento de las bases de la interacción planta-patógeno y los mecanismos de defensa de las plantas son fundamentales para el desarrollo de alternativas para el control de patologías vegetales. Mientras que en plantas vasculares hay mucha información sobre los mecanismos que participan en la defensa vegetal, muy pocos estudios existen sobre los procesos implicados en la respuesta de defensa de *Physcomitrella* frente a la infección por patógenos.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos empleado una aproximación de genómica funcional para profundizar en la respuesta de defensa de *Physcomitrella* frente al estrés biótico. Mediante la secuenciación masiva del transcriptoma (RNAseq) de plantas de *Physcomitrella* tratadas con elicitores de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y plantas control, se realizó una categorización funcional de los genes expresados diferencialmente, lo que permitió obtener una representación global de los genes inducidos en *Physcomitrella* en respuesta a elicitores de esta bacteria comparado con plantas control. Los resultados obtenidos muestran que durante el tratamiento con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*, se inducen un conjunto de genes de *Physcomitrella* que codifican para proteínas homólogas a proteínas de plantas vasculares relacionadas con la defensa vegetal como MAP quinasas involucradas en señalización, proteínas de resistencia, enzimas detoxificadoras de ROS como catalasas y peroxidasas, proteínas involucradas en el fortalecimiento de la pared celular como dirigentes, pectin metil esterases, entre otros. El análisis global de los resultados muestra un redireccionamiento del metabolismo general de *Physcomitrella* durante este tratamiento hacia rutas del metabolismo secundario implicadas en la síntesis de compuestos relacionados con respuestas de defensa, en especial compuestos de la familia de los flavonoides y fenilpropanoides. Estos datos indican que *Physcomitrella* activa una respuesta de defensa frente al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum*, y el análisis detallado de los transcriptomas obtenidos en este trabajo permitirá generar información sobre la evolución de las vías de defensa que se activan en las plantas en respuesta a patógenos, algunas de las cuales podrían ser novedosas.

Se seleccionaron dos genes de *Physcomitrella*, inducibles por elicitores de *P.c. carotovorum* para determinar su relevancia funcional mediante la sobre-expresión; el gen *PpPKC* que codifica para una policétido ciclasa y el *PpBI-1* que codifica para la proteína Bax inhibitor. Las policétidos ciclasas (PKC) son enzimas involucradas en la síntesis de policétidos. Existe un creciente interés en determinar la actividad biológica de los metabolitos secundarios que sintetizan las plantas, incluyendo los policétidos debido a que estas funciones pueden ser beneficiosas para la agricultura. Con el fin de contribuir con la comprensión del rol que cumplen este tipo de compuestos en *Physcomitrella* nos centramos en el análisis de la función del gen *PpPKC*. Las PKC vegetales son enzimas muy poco estudiadas y su papel en la tolerancia al estrés no ha sido reportado. La expresión de *PpPKC* se induce por patógenos, estrés salino y estrés osmótico. Los estudios fenotípicos de líneas de *Physcomitrella* que sobre-expresan *PpPKC* revelaron que este gen participa en la resistencia al oomicete *Pythium irregulare*. La sobre-expresión de *PpPKC* en *Arabidopsis* aumenta la resistencia a *P. irregulare* y mejora la tolerancia de las plantas al estrés salino. Estos

resultados sugieren que *PpPKC*, y los metabolitos producidos por esta, contribuyen a la resistencia al estrés en este musgo y *Arabidopsis*, y ofrece nuevas herramientas para incrementar la tolerancia al estrés biótico y abiótico en cultivos.

La muerte celular programada (PCD) en plantas, participa en procesos del desarrollo y en la respuesta de defensa a patógenos. Hasta la fecha, muy pocas proteínas reguladoras de la PCD han sido identificadas en las plantas. Entre ellas, la proteína BI-1, que posee, al igual que su homólogo humano, la capacidad de suprimir la letalidad causada por Bax en levaduras. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la importancia fisiológica de BI-1 en las interacciones planta-patógeno, así como durante el desarrollo. La expresión de *PpBI-1* se induce por patógenos, ácido abscísico y UV-B. Los estudios fenotípicos de líneas de *Physcomitrella* que sobre-expresan *PpBI* mostraron una alteración en el patrón de desarrollo y un aumento de resistencia a la infección por el hongo *Botrytis cinerea*. Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la hipótesis de que *PpBI-1* cumple un rol en el control de la PCD en *Physcomitrella*, probablemente modulando procesos que afectan el desarrollo de este musgo, así como la respuesta de defensa frente a la infección por patógenos.

Gracias....

A Inés, por aceptarme como su estudiante, por su ayuda, y por contribuir a que pudiera finalizar esta etapa de mi formación.

A Carina por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio, por sus enseñanzas y sus consejos. A todos los integrantes y ex integrantes del Departamento de Biología Molecular del IIBCE por todos los gratos momentos. En especial a Lucina por su ayuda y disposición y espero que podamos seguir trabajando juntas...

A Sabina por abrirme la puerta de su laboratorio y permitirme ser parte de sus BMVianos. A mis compañeros de BMV que compartieron el día a día a lo largo de este trabajo. En especial a Ceci, con la cual en en los últimos años generamos una dupla perfecta. Una excelente compañera de trabajo y de viaje...

A László Szabados, por dejarme realizar parte de este trabajo en su Laboratorio, y su gran hospitalidad. A Pierre-Francois Perroud, Universidad de Washington, USA, por cedernos el plásmido pTHUbiGateway. A Celedonio González, por cedernos la cepa de *B.cinerea* que expresa GFP. Al Servicio de Citometría de Flujo del IIBCE, a la gente del servicio de microscopía del Insitut Pasteur, y a todos los Laboratorios que día a día compartieron sus instalaciones.

A PEDECIBA y ANII por el apoyo financiero brindado: Beca de Doctorado BE_POS_2009_726, Beca de Movilidad BE_MOV_2010_2097 y proyectos ANII FCE2007_376 y FCE2009_2343.

A mis amigas bioquímicas: Alejandra, Leticia, Magela y Noelia por estar siempre. Por tantos lindos momentos vividos a largo de todos estos años.

A mis amigos y familia, por su apoyo desde SIEMPRE, en especial a mis hijos Santiago y Matías que tuvieron que soportarme y sobrevivir a estos últimos meses de escritura de tesis.

1. Introducción.....	7
1.1 Interacción planta-patógeno	7
1.1.1 Inmunidad activada por PAMPs (PTI)	10
1.1.2 La supresión de la PTI: los efectores patogénicos.....	11
1.1.3 Inmunidad activada por efectores (ETI).....	12
1.2 Etapas de señalización de las respuestas defensivas en plantas	15
1.2.1 Respuestas Locales	15
1.2.2 Señalización hormonal.....	15
1.2.3 Expresión de genes de defensa	17
1.2.4 Muerte celular programada en plantas.....	18
1.2.5 Respuestas sistémicas	20
1.3 <i>Physcomitrella</i> como organismo modelo	21
1.3.1 El ciclo de vida de <i>Physcomitrella</i>	22
1.3.2 <i>Physcomitrella</i> como sistema modelo para estudios funcionales de genes.....	24
1.3.3 Antecedentes en el estudio de la interacción planta-patógeno en <i>Physcomitrella</i>	25
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo general.....	31
2. 2 Objetivos específicos:.....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	32
3.1.1 <i>Physcomitrella patens</i>	32
3.1.2 Condiciones de cultivo que favorecen el desarrollo del caulonema	32
3.1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.1.4 <i>Nicotiana tabacum</i>	33
3.2 Cepa y cultivo de microorganismos.....	33
3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	33
3.2.2 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	33
3.2.3 <i>Botrytis cinerea</i>	33
3.2.4 <i>Pythium irregulare</i>	34
3.2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
3.3 Tratamientos	34
3.3.1 Tratamientos con microorganismos fitopatógenos.....	34
3.3.2 Tratamientos con inductores de PCD.....	34
3.3.3 Tratamientos con moléculas relacionadas con el estrés abiótico	34
3.4 Modificaciones generales del ADN	35
3.4.1 Digestiones con enzimas de restricción.....	35
3.4.2 Ligaciones.....	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	35
3.5.3 Obtención de ARN a partir de tejidos vegetales	36
3.5.4 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa	36
3.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	36
3.5.6 Análisis por <i>Northern blot</i>	37
3.6 Construcciones para sobre-expresión y determinación de la localización subcelular	37
3.6.1 Construcciones para la sobre-expresión en <i>Physcomitrella</i>	37
3.6.2 Construcciones para la determinación de la localización subcelular en tabaco y sobre-expresión en <i>Arabidopsis</i>	38
3.6.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.7 Transformación de <i>Physcomitrella patens</i>	40
3.8 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.9 Agroinfiltración de tabaco y microscopía.....	41

3.10	Análisis moleculares de las líneas sobre-expresantes.....	41
3.10.1	Análisis de las líneas de <i>Physcomitrella</i> generadas	41
3.10.2	Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo.....	42
3.10.3	Análisis de las líneas de <i>Arabidopsis</i> generadas.....	42
3.11	Evaluación de las líneas de <i>Physcomitrella</i>	42
3.11.1	Medida de muerte celular.....	42
3.11.2	Tinciones para visualizar tejidos vegetales y fitopatógenos.....	42
3.11.3	Tinciones para visualizar acumulación de ROS en los tejidos vegetales	43
3.11.4	Visualización de cambios a nivel de la pared celular	43
3.11.5	Cuantificación de los patógenos.....	43
3.12	Evaluación de las líneas de <i>Arabidopsis</i>	44
3.12.1	Extracción de proteínas vegetales	44
3.12.2	Cuantificación de proteínas.....	45
3.12.3	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	45
3.12.4	<i>Western blot</i>	45
3.13	Análisis de la expresión génica RNA-Seq.....	46
3.14	Análisis de los datos.....	46
3.14.1	Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	46
3.14.2	Análisis de expresión génica	46
3.14.3	Análisis estadísticos	47
4.	RESULTADOS	48
4.1	Identificación de genes de <i>Physcomitrella</i> inducidos en respuesta a elicitores de <i>Pectobacterium carotovorum</i> sp. <i>carotovorum</i>	48
4.1.1	Identificación y clasificación de genes con posible función en la percepción de <i>P.c. carotovorum</i>	51
4.1.2	Identificación y clasificación de MAPK: elementos de señalización en la defensa de <i>Physcomitrella</i> frente a <i>P.c. carotovorum</i>	52
4.1.3	Genes de resistencia implicados en la defensa vegetal	56
4.1.4	Genes implicados en la detoxificación de ROS y reforzamiento de la pared celular	58
4.1.4.1	Detoxificación de ROS.....	58
4.1.4.2	Reforzamiento de la pared celular	62
4.1.5	Genes involucrados en la síntesis y señalización de hormonas implicadas en la defensa vegetal	67
4.1.6	Metabolismo secundario	68
4.2	Análisis funcional de genes de <i>Physcomitrella</i> con un posible rol en la defensa vegetal	76
4.2.1	Análisis funcional del gen <i>PpPKC</i> de <i>Physcomitrella</i> y su capacidad de conferir resistencia.....	76
4.2.1.1	Análisis de expresión génica	78
4.2.1.2	Aislamiento de <i>PpPKC</i>	80
4.2.1.3	Determinación de la localización subcelular de <i>PpPKC</i>	81
4.2.1.4	Generación y caracterización molecular de líneas de <i>Physcomitrella</i> que sobre-expresan <i>PpPKC</i>	82
4.2.1.5	Análisis de los transformantes.....	82
4.2.1.6	Respuesta durante el desarrollo y crecimiento de <i>Physcomitrella</i>	83
4.2.1.7	Respuesta frente al ataque de patógenos.....	84
4.2.1.8	Generación y caracterización molecular de líneas de <i>Arabidopsis</i> que sobre-expresan <i>PpPKC</i>	88
4.2.1.9	Análisis fenotípicos preliminares.....	89
4.2.2	Análisis funcional del gen <i>PpBI-1</i> de <i>Physcomitrella</i> con homología al regulador anti-apoptótico Bax-inhibitor-1 de animales	93
4.2.2.1	Análisis de la expresión génica.....	94
4.2.2.2	Determinación de la localización subcelular de <i>PpBI-1</i>	96
4.2.2.3	Generación y caracterización molecular de líneas de <i>Physcomitrella</i> que sobre-expresan <i>PpBI-1</i>	98
4.2.2.4	Análisis de los transformantes.....	98

4.2.2.5 Respuesta durante el desarrollo y crecimiento de <i>Physcomitrella</i>	99
4.2.2.5.1 Crecimiento de las colonias.....	99
4.2.2.5.2 Desarrollo de los rizoides.....	100
4.2.2.5.3 Regeneración a partir de protoplastos.....	100
4.2.2.5.4 Desarrollo del caulonema y cloronema	101
4.2.2.6 Respuesta frente al ataque de patógenos.....	102
4.2.2.7 La línea sobre-expresante OEBI-6 es más resistente que plantas wt a inductores de PCD.....	104
5. DISCUSIÓN	106
5.1 Caracterización molecular de la respuesta de <i>Physcomitrella</i> al tratamiento con elicitores de <i>P.c. carotovorum</i>	106
5.2 Análisis funcional de genes relacionados con la defensa vegetal.....	111
5.2.1 Rol de <i>PpPKC</i> en la resistencia al estrés biótico y abiótico	112
5.2.2 Rol de <i>PpBI-1</i> en el desarrollo y en la resistencia al estrés biótico.....	115
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	118
7. BIBLIOGRAFÍA.....	120
8. ANEXO.....	138
8.1 Figuras suplementarias	138
8.2 Abreviaturas	140

1. Introducción

Diversos factores medioambientales de naturaleza biótica y abiótica afectan el crecimiento y el desarrollo de las especies vegetales, incidiendo gravemente sobre la actividad agrícola. Las especies vegetales han desarrollado respuestas de defensa que les permite tolerar y adaptarse a condiciones ambientales adversas. Los mecanismos moleculares involucrados en tales respuestas no son totalmente comprendidos, siendo su estudio una de las principales áreas de investigación en la biología vegetal. La información generada a través de este tipo de análisis ha sido fundamental para el diseño de estrategias biotecnológicas orientadas al desarrollo de cultivares tolerantes a factores de estrés.

1.1 Interacción planta-patógeno

Las plantas están en contacto continuo con una gran variedad de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, virus y viroides, algunos de los cuales son agresores potenciales, y pueden colonizar las plantas provocando una enfermedad. Los fitopatógenos poseen diferentes estilos de vida, los cuales han sido agrupados en dos categorías principales. Los patógenos biótrofos son aquellos especializados en alimentarse y crecer en el interior de tejidos vivos, dentro de los que se encuentra *Pseudomonas sp* (Glazebrook 2005). Algunos ejemplos incluyen *Phytophthora infestans* (que ataca a la papa) y el género *Colletotrichum*, que en primer lugar se alimenta del hospedero mediante haustorios y luego emite unos segundos haustorios que directamente matan a la planta (Abad *et al.*, 1995; Münch *et al.*, 2008).

Los patógenos necrótrofos actúan provocando la muerte de la célula hospedadora, normalmente mediante la producción de toxinas y enzimas que degradan la pared celular como poligalacturonasas, celulasas, etc., para poder nutrirse a partir del tejido muerto (Glazebrook 2005). Muchos patógenos necrótrofos tienen un rango de hospedero muy amplio, son oportunistas y aprovechan la debilidad de la planta o heridas para infectarla. También atacan especialmente a plantas jóvenes, viejas o debilitadas en general. Algunos ejemplos incluyen *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) y *Phytium sp*. Sin embargo, muchos otros patógenos se comportan como biótrofos y necrótrofos, dependiendo del momento del ciclo vital o de las condiciones en las que se encuentren. A este tipo de patógenos se les denomina hemibiótrofos. Algunos hongos que son comúnmente considerados necrótrofos, podrían ser en realidad hemibiótrofos, en tanto que en las primeras fases de la infección siguen una estrategia biótrofa. También la bacteria *Pseudomonas*

syringae, considerada generalmente como un biótrofo, ocasionalmente se comporta como un necrótrofo (Butt 1998), por lo que probablemente debería ser tratada como un hemibiótrofo (Thaler *et al.*, 2004). Esta bacteria penetra en la planta a través de heridas o de estomas y se multiplica en los espacios intercelulares. En las primeras fases de las infecciones no produce la muerte celular, pero en las últimas fases de la infección se produce clorosis y necrosis en la planta. Estas diferencias provocan que los biótrofos establezcan una relación mucho más íntima con sus hospederos. De hecho, muchos de ellos han desarrollado la capacidad de vivir en el espacio intercelular del mesófilo, un ambiente muy rico en nutrientes. En el caso de aquellos que son patógenos obligados, esta relación es tan extrema que no pueden ser cultivados en un medio de cultivo artificial. Los necrótrofos, al contrario que los biótrofos, pueden vivir como saprófitos fuera de sus hospedadores, alimentándose de materia orgánica muerta (Agrios 2005; de Wit 2007).

Las plantas han desarrollado un sofisticado sistema inmune para defenderse de una gran variedad de patógenos. Las plantas difieren de los animales en dos aspectos principales que determinan las estrategias a seguir para defenderse de los patógenos. En primer lugar, las plantas no poseen células especializadas móviles para defenderse, y como consecuencia, cada célula individual debe tener la capacidad de responder al ataque del patógeno. En segundo lugar, las plantas pueden perder porciones considerables de su estructura sin que ello traiga consigo problemas de supervivencia, pudiendo inducir la muerte de órganos invadidos por el patógeno para evitar la propagación de éste al resto de la planta (Heath 2000).

La interacción planta-patógeno es el resultado de un proceso de coevolución de mecanismos a nivel molecular y celular. La mayoría de las plantas son resistentes a la infección por patógenos, debido a que poseen barreras preformadas, presentes en la planta. Estas barreras pueden ser físicas que incluyen la cutícula y la pared celular o químicas que implican la acumulación de compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las células (terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, etc.). Este tipo de defensas confieren resistencia inespecífica, puesto que son efectivas frente a un gran número de patógenos (Heath 2000). Si los patógenos son capaces de superar estas barreras constitutivas, la planta podrá activar una serie de mecanismos inducibles que actúan tanto en los tejidos locales donde infectó el patógeno, como en los tejidos sistémicos alejados del sitio de infección (Shah *et al.*, 1999). Dentro de esta respuesta inmune inducida, es posible diferenciar dos niveles. La primera respuesta activa de la planta se produce gracias a un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, de *Pattern Recognition Receptors*) situados en la superficie extracelular (Figura 1). Las plantas poseen este tipo de receptores que les permiten detectar la presencia de patrones o huellas moleculares (como la quitina de los hongos o los peptidoglucanos de las bacterias) que identifican una amplia variedad de patógenos (PAMPs, de *Pathogen Associated Molecular Pattern*).

Se considera actualmente que estos receptores PRR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Chisholm *et al.*, 2006), estando englobados estos últimos en un concepto más

amplio denominado patrones moleculares asociados a microbios MAMPs (de *Microbe-Associated Molecular Patterns*) (Boller y He 2009), propuesto tras el descubrimiento de que las plantas también son capaces de reconocer de este modo otros microorganismos no patogénicos. El reconocimiento de MAMPs es indispensable para la activación de un tipo de inmunidad denominada PTI (de *PAMP Triggered Immunity*) o Inmunidad activada por PAMPs (Boller y Felix 2009; Jones y Dangl 2006). Como medida de control, para que se produzca tal activación es necesario superar un umbral en el nivel presente de MAMPs (Bent y Mackey 2007). El concepto de PTI equivaldría de manera amplia a la conocida anteriormente como resistencia basal u horizontal. Existe otro grupo de moléculas capaces de ser reconocidas por los PRRs y disparar la PTI. Durante el proceso infeccioso, el patógeno genera una serie de heridas en los tejidos de la planta que liberan al apoplasto un conjunto de moléculas como por ejemplo, los fragmentos de pared celular liberados por la acción de enzimas hidrolíticas de los patógenos. Estas moléculas reciben el nombre de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, de *Damage Associated Molecular Pattern*) y pueden ser percibidas como señales de peligro por los PRRs. En el pasado, estos compuestos han sido denominados elicitores endógenos (Lotze *et al.*, 2007). 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.

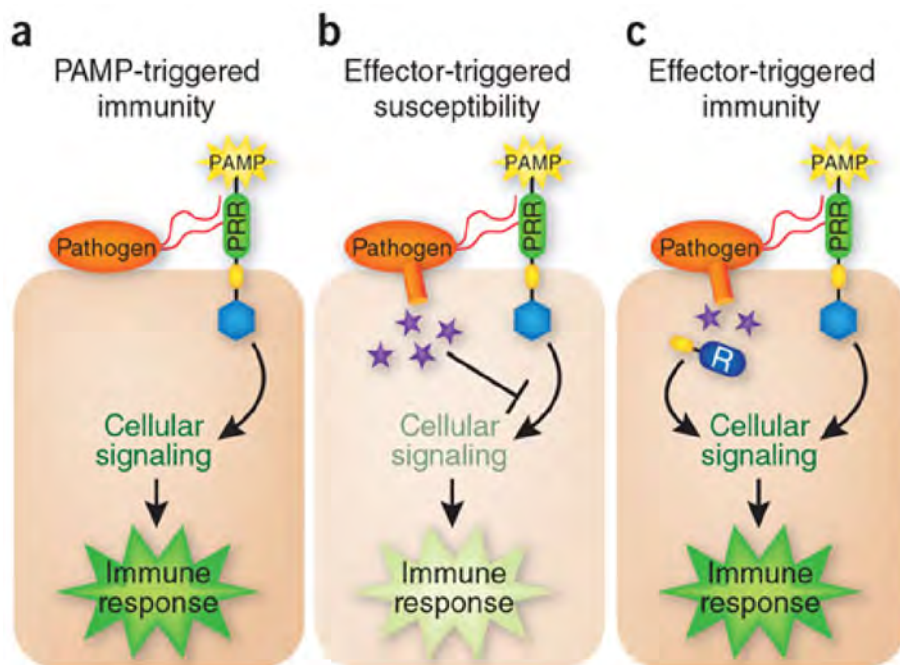


Figura 1. Vías de señalización mediadas por moléculas pequeñas en la inmunidad vegetal. La percepción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por parte de la planta, conduce a la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), lo que resulta en una cascada de señalización corriente abajo que conduce a la inmunidad activada por PAMPs (PTI). (b) los patógenos virulentos han adquirido efectores (estrellas púrpuras) que suprimen la PTI, lo que resulta en la susceptibilidad activada por efectores (ETS). (c) A su vez, las plantas han adquirido proteínas de resistencia (R) que reconocen estos efectores específicos, lo que resulta en una respuesta inmune secundaria llamada inmunidad activada por efectores (ETI). Tomado de Pieterse *et al.*, 2009.

Durante el proceso coevolutivo, los microorganismos han desarrollado estrategias para superar esta respuesta defensiva, tanto mediante interferencias en el reconocimiento de los PAMPs como, sobre todo, a través de la secreción de proteínas efectoras en el interior del citoplasma de la célula vegetal. Esta respuesta de los patógenos da lugar a la susceptibilidad activada por efectores (ETS, de *Effector Triggered Susceptibility*) (Jones y Dangl 2006).

Cuando el patógeno es capaz de superar este tipo de inmunidad, debe enfrentarse a un segundo mecanismo de detección mucho más especializado denominado inmunidad activada por efectores (ETI, de *Effector Triggered Immunity*) (Jones y Dangl 2006; Chisholm *et al.*, 2006). Los efectores son moléculas que los patógenos producen para intentar suprimir la inmunidad PTI y son específicos de la especie (Bent y Mackey 2007). Por este mecanismo, las plantas son capaces de reconocer de forma directa o indirecta muchos de estos efectores a través de proteínas codificadas por genes R (de *Resistance*). Existen diferentes tipos de proteínas R. Las más comunes presentan un dominio de unión a nucleótidos NB (de *Nucleotide Binding*) y un dominio de repetido rico en leucina LRR (de *Leucine Rich Repeat*), (Jones y Dangl 2006; Boller y He 2009). Cabe destacar que esta respuesta mediada por las proteínas de tipo NB-LRR es efectiva frente a patógenos biótrofos o hemibiótrofos, pero no frente a necrótrofos (Glazebrook 2005). Si el patógeno es capaz de superar esta segunda barrera logrará nutrirse y dispersarse dando lugar a la ETS (Jones y Dangl 2006). Se ha postulado que la PTI basada en MAMPs sería una inmunidad más estable y antigua, mientras que la ETI podría ser el resultado de la coevolución entre planta y patógeno para mantener la inmunidad PTI a pesar de los efectores del patógeno (Jones y Dangl 2006).

Si bien las plantas han desarrollado respuestas defensivas muy efectivas, la selección natural impulsa a los patógenos hacia nuevas vías que les permitan suprimir la ETI, ya sea modificando o eliminando los efectores desencadenantes, o generando nuevos efectores (de Wit 2007). El modelo de zig-zag propuesto por Jones y Dangl en 2006 (Figura 2) resume las diferentes etapas existentes en la interacción planta-patógeno.

1.1.1 Inmunidad activada por PAMPs (PTI)

La mayoría de los patógenos acceden al interior de la planta a través de heridas o de aberturas naturales, como estomas o lenticelas. El siguiente paso consiste en penetrar la pared celular vegetal. Es en este punto cuando el patógeno queda expuesto al reconocimiento por parte de los receptores PRRs (Chisholm *et al.*, 2006). Este tipo de receptores está presente tanto en plantas como en animales y tiene la capacidad de reconocer MAMPs que identifican a una gran variedad de patógenos y que no están presentes en el propio hospedador. Esta forma de reconocimiento les permite a las plantas identificar la presencia de un agente externo (Boller y Felix 2009).

Los MAMPs más comunes en los hongos son la quitina y el ergosterol, componentes principales de su pared celular. En las bacterias, se destacan los lipopolisacáridos, en las Gram negativas, o los peptidoglucanos en las Gram-positivas. Pero no todos los MAMPs forman parte de estructuras

extracelulares. El factor de elongación Tu (EF-Tu, *Elongation Factor Tu*) es un claro ejemplo de elementos intracelulares que actúan como MAMPs (He *et al.*, 2007; Schwessinger y Zipfel 2008).

Los pocos receptores PRR identificados en plantas son proteínas transmembrana que pueden clasificarse en dos familias según presenten o no un dominio serina/treonina (Ser-Thr) quinasa en su región citoplasmática. En las proteínas de la familia RLK (de *Receptor Like Kinase*) este dominio está presente mientras que en las de la familia RLP (de *Receptor Like Protein*) está ausente. Estas proteínas también presentan un dominio extracelular que es el responsable del reconocimiento y unión del MAMP o DAMP. Este dominio puede contener una región rica en leucina (LRR, de *Leucine Rich Region*), hecho que sucede en la mayoría de los PRRs descritos, o bien motivos ricos en lisina (LysM, de *Lysine Motifs*). Los PRRs presentan una gran afinidad y especificidad por un MAMP concreto pudiendo llegar a detectarlo a concentraciones por debajo de nanomolar (Chisholm *et al.*, 2006; Boller y He 2009; Segonzac y Zipfel 2011).

El ejemplo de PTI mejor estudiado en plantas es el que tiene lugar tras la percepción de la flagelina bacteriana por parte del receptor FLS2 (de *Flagellin Sensitive 2*) de *Arabidopsis*. Esta proteína es uno de los componentes principales del flagelo bacteriano y es la responsable de su motilidad, característica fundamental para su patogenicidad en plantas. Se ha comprobado que el péptido flg22, correspondiente a una región de 22 aminoácidos muy conservada de su dominio N-terminal, es el causante del reconocimiento por FLS2 y de la consiguiente activación de defensas (Felix *et al.*, 1999; Zipfel 2008). Se han descrito homólogos funcionales a FLS2 en *Solanum lycopersicum* (tomate), *Oryza sativa* (arroz) y *Nicotiana benthamiana* (tabaco). Esto indica que el reconocimiento de esta proteína bacteriana por FLS2 se ha conservado a lo largo del proceso evolutivo de las plantas vasculares (Zipfel 2009).

Como resultado del reconocimiento de flg22, o de otros MAMPs, se inician rápidamente múltiples eventos de fosforilación y se activan varias cascadas de señalización mediadas por MAPKs (de *Mitogen Activated Protein Kinases*). Como consecuencia, se limita el crecimiento del patógeno mediante la inducción de la expresión de genes de defensa, en muchos casos a través de la activación previa de los factores de transcripción (TFs, de *Transcription Factors*) tipo WRKY (Asai *et al.*, 2002; Segonzac y Zipfel 2011).

Las plantas que son defectivas en alguno de los PRR identificados presentan un aumento en la susceptibilidad a bacterias, resaltando la importancia de la PTI en plantas. Por ejemplo, el mutante fls2 de *Arabidopsis*, presenta una mayor susceptibilidad a la bacteria biótrofa *Pseudomonas syringae* patovar *tomato* DC3000 (Zipfel *et al.*, 2004).

1.1.2 La supresión de la PTI: los efectores patogénicos

Los verdaderos patógenos de plantas son aquellos capaces de suprimir o evadir su resistencia basal o PTI. Para ello, este tipo de patógenos han desarrollado un elevado número de factores de virulencia que les permiten manipular las funciones celulares del hospedador en su propio beneficio. Dentro de este conjunto de mecanismos de virulencia se destaca la secreción de moléculas

denominadas efectores. En muchos casos, estos efectores poseen actividades enzimáticas que les permiten modificar determinadas proteínas del hospedero con el objetivo de aumentar la virulencia del patógeno y evadir su detección, promoviendo así la ETS (Jones y Dangl 2006; Speth *et al.*, 2007).

Las bacterias patógenas de plantas y de animales presentan al menos cuatro sistemas diferentes de secreción de efectores, siendo el denominado sistema de secreción tipo III (TTSS, de *Type III Secretion System*) el más relevante para la virulencia. El TTSS permite a las bacterias inyectar efectores en el interior de la célula hospedadora los cuales contribuyen a la virulencia del patógeno, ya sea mimetizando o inhibiendo funciones celulares concretas. La importancia del TTSS puede observarse en cepas patogénicas de *P. syringae* mutadas en dicho sistema de secreción, las cuales no pueden suprimir la PTI y pasan a ser no patogénicas (Jones y Dangl 2006; de Wit 2007).

En la literatura han sido reportados varios efectores bacterianos que actúan directamente sobre los complejos PRRs inhibiendo la PTI. Un ejemplo son los efectores AvrPto y AvrPtoB de *P. syringae*, que son capaces de interactuar físicamente con el dominio quinasa de FLS2 evitando que se autofosfore y afectando las respuestas de defensa corriente abajo mediadas por PAMPs tales como el estallido oxidativo (Xiang *et al.*, 2008), deposición de calosa (Hauck *et al.*, 2003; Xiang *et al.*, 2008), activación de MAPK (He *et al.*, 2006) y la expresión de genes inducidos por flg22 (Xiang *et al.*, 2008). Otra estrategia utilizada por las bacterias para evadir la PTI es alterar estructuralmente los MAMPs que son detectados por las defensas de la planta. Es el caso de la flagelina de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que no puede ser reconocida por la FLS2 de *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 2006). Respecto a los efectores producidos por patógenos eucariotas de plantas, como los hongos, sus funciones y mecanismos han sido menos estudiados. Estos efectores pueden actuar tanto en la matriz extracelular como en el interior de la célula hospedante. La quitina, componente principal de la pared celular de los hongos, es reconocida por las defensas de la planta para disparar la PTI. Además, las plantas han desarrollado quitinasas que liberan pequeños polímeros activos de la pared celular de los hongos que actúan como amplificadores de la señal de peligro. Es el caso del efector Avr4 de *Cladosporium fulvum* que presenta un dominio de unión a quitina que actúa protegiendo su pared celular de las quitinasas, disminuyendo así parte de la inducción de defensas de la planta (Chisholm *et al.*, 2006).

1.1.3 Inmunidad activada por efectores (ETI)

Los procesos defensivos que se desencadenan en la planta con la ETI son muy similares a los activados por la PTI. Por ello, hay autores que consideran que esta diferenciación no es necesaria. Esto se debe al hecho de que los mecanismos descritos como propios de cada tipo de defensa han coexistido desde el principio de la evolución de las plantas con semillas. Además, existe un elevado grado de solapamiento entre los datos de expresión de genes obtenidos en plantas independientemente del tipo de inmunidad activada. Las plantas tampoco parecen discriminar entre el tipo de patógeno causante de la activación. Así se plantea un modelo por el que la planta ejecuta el mismo tipo de programa defensivo cuando percibe cualquiera de las posibles señales de

peligro (MAMPs, DAMPs o efectores), si bien existen diferencias cinéticas y cuantitativas en dicha inducción. A grandes rasgos, la ETI suele ser más rápida, eficaz y prolongada que la PTI (Boller y Felix 2009). Según la teoría propuesta por Flor en 1961, las plantas poseen un conjunto de genes R cuyas proteínas resultantes actúan como receptores capaces de detectar una serie de proteínas Avr del patógeno (o factores de avirulencia) (Avr), actualmente llamados efectores. De acuerdo con esta hipótesis, si existía una interacción entre la proteína R de la planta y la proteína Avr del patógeno, la planta desencadenaría una respuesta inmune que la haría resistente al patógeno (interacción incompatible). Si no existiese tal interacción, la planta sería susceptible (interacción compatible). Resultados experimentales posteriores condujeron a una modificación de este modelo. En la hipótesis del gen guardián, se plantea que no es necesaria una interacción física entre la proteína R y el efector del patógeno. Esta hipótesis propone que en la mayoría de los casos se produce un reconocimiento indirecto de los efectores a través del monitoreo del estado de diferentes componentes de la célula vegetal (van der Biezen y Jones 1998; Jones y Takemoto 2004).

La ETI también suele conducir a la aparición de una respuesta hipersensible (HR, de *Hypersensitive Response*). La HR es una respuesta asociada principalmente a la resistencia mediada por genes R, que incluye una muerte programada de células de la planta en el lugar de la infección (Heath 2000). También se han descrito MAMPs capaces de inducir la HR (Naito *et al.*, 2008). La flagelina completa de *P. syringae* pv *tabaci* 6605 induce la HR en *Arabidopsis*, en contraposición con la flg22 clásica de *Pseudomonas aeruginosa*, esto es debido a la presencia de un aspartato en la región central del epítipo de flg22, el cual es importante para la virulencia (Naito *et al.*, 2008). La identificación de los mutantes hrp (de *hypersensitive response and pathogenicity*) en bacterias fitopatógenas corrobora la estrecha relación entre la virulencia o avirulencia de un patógeno y la actividad de sus efectores. Esto se debe a que las bacterias hrp pierden la habilidad tanto de inducir la HR en hospederos resistentes como de infectar hospederos normalmente susceptibles (Lindgren *et al.*, 1986; Bent y Mackey 2007).

La mayoría de los genes R codifica proteínas receptoras del tipo NB-LRR. Presentan dos dominios característicos (un sitio conservado de unión a nucleótido en la zona central y una región rica en repeticiones de leucina en el extremo C-terminal, respectivamente) (Dangl y Jones 2001). Las proteínas NB-LRR son citoplasmáticas y también pueden presentar dominios funcionales en su extremo N-terminal. De hecho, se pueden subdividir en dos categorías en función de estos dominios: las TIR-NB-LRR (de *Toll Interleukin 1 Receptor*) y las CC-NB-LRR (de *Coiled Coil*). El dominio LRR estaría implicado en el reconocimiento de efectores o de las perturbaciones que estos generan (en muchos casos junto con los dominios en N-terminal). En cambio, el NB ejercería como dominio de activación mediante la sustitución de un nucleótido difosfato (ADP) por otro trifosfato (ATP) (Chisholm *et al.*, 2006; Takken *et al.*, 2006; Collier y Moffett 2009).

Hay alrededor de 200 genes de *Arabidopsis* que codifican las proteínas que contienen dominios característica de las proteínas de resistencia de plantas (Meyers *et al.*, 2003). Mientras que el dominio CC es un dominio estructural común que se encuentra en muchas proteínas, el dominio

TIR tiene homología con el receptor de la inmunidad innata TOLL en *Drosophila* y con el interleucina 1 de la inmunidad innata de humanos (Shirasu 2009). El dominio central NB es parte de un dominio más grande, llamado NB-ARC (van der Biezen y Jones 1998). El dominio LRR también se encuentra en los receptores de inmunidad de mamíferos con similitudes sorprendentes con las proteínas R de vegetales (Shirasu 2009). Algunos de las 200 proteínas R de *Arabidopsis* carecen de uno de estos tres dominios básicos, y algunos tienen dominios adicionales en sus extremos N o C-terminales (Meyers *et al.*, 2003). Mucho trabajo se ha llevado a cabo para poder descifrar los requisitos genéticos de las proteínas. Se ha encontrado que la función de la mayoría de las proteínas R tipo CC-NB-LRR depende de la proteína NDR1 (de *non-race specific disease resistance 1*) (Knepper *et al.*, 2011a). Hay sin embargo, excepciones a esta regla; varias proteínas CC-NB-LRR de *Arabidopsis* confieren resistencia al patógeno oomiceto *Hyaloperonospora* de forma independiente de NDR1 (Knepper *et al.*, 2011b). Las proteínas TIR-NB-LRR requieren de dos proteínas tipo lipasa: la EDS1 (de *enhanced disease susceptibility 1*) y la PAD4 (de *phytoalexin deficiente 4*) y SAG101 (de *senescence associated gene 101*) (Feys *et al.*, 2005).

Una diferencia sustancial entre los MAMPs y los efectores radica en que los primeros han sido estables evolutivamente, puesto que forman parte de elementos imprescindibles para la viabilidad del patógeno. En cambio, los efectores pueden variar considerablemente, o incluso desaparecer en determinadas cepas del patógeno, porque no son necesarios para el crecimiento y desarrollo del microorganismo fuera del hospedero. La posible modificación de estos efectores está influenciada por cómo son percibidos por las proteínas R (Bent y Mackey 2007).

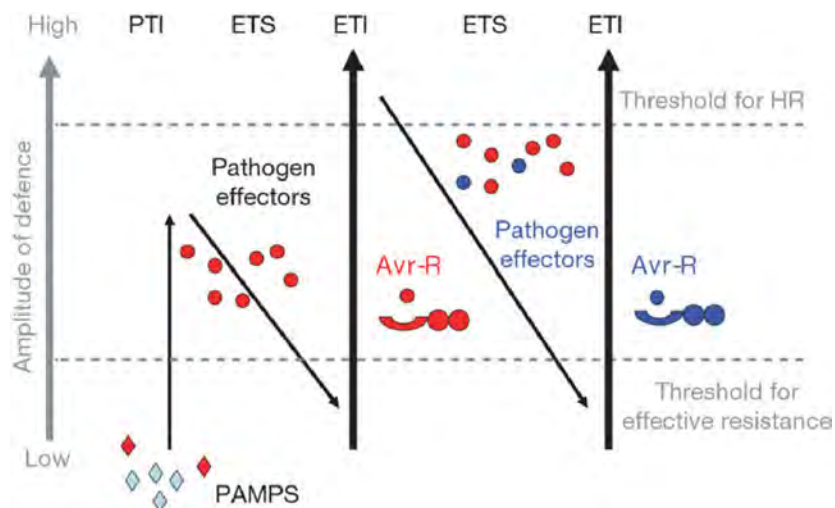


Figura 2. Modelo de zig-zag Esquema que representa las diferentes etapas que tienen lugar en la interacción planta-patógeno. Etapa 1: Las plantas detectan el ataque de los patógenos a través de los receptores PRRs que reconocen a un conjunto de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y se desencadena la inmunidad activada por PAMPs (PTI). Etapa 2: Los patógenos evaden la PTI mediante la secreción de efectores, generando la susceptibilidad activada por efectores (ETS). Etapa 3: Las proteínas R de las plantas son capaces de reconocer determinados efectores de los patógenos (en rojo) y activar la inmunidad activada por efectores (ETI). La ETI es más rápida y contundente que la PTI, llegando a superar el umbral de inducción de la muerte celular programada (HR). Etapa 4: Los patógenos pierden o modifican algunos de los efectores previamente reconocidos (en rojo) o bien generan otros nuevos (en azul). Como consecuencia, logran suprimir la ETI y provocar enfermedad. En etapas sucesivas, la selección favorecerá la aparición de nuevas proteínas R que permitan a la planta reconocer estos nuevos efectores. Tomado de Jones y Dangl 2006.

1.2 Etapas de señalización de las respuestas defensivas en plantas

1.2.1 Respuestas Locales

La detección de la presencia del patógeno, independientemente de que esta se haya producido vía PRRs o vía genes R, dispara las respuestas defensivas de las plantas que, dada su similitud, pueden ser analizadas en conjunto (Lopez *et al.*, 2008). Uno de los efectos más inmediatos es la alteración del flujo de iones a través de la membrana plasmática. El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero, tanto promoviendo la apertura de otros canales iónicos en la membrana, como activando a las quinasas dependientes del calcio (CDPKs, de *Calcium Dependent Protein Kinase*). También se produce una alcalinización del espacio extracelular debido a la salida de iones K^+ (Boller y Felix 2009; Segonzac y Zipfel 2011).

Otro efecto casi inmediato es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, de *Reactive Oxygen Species*), tales como el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lamb y Dixon, 1997). En *Arabidopsis*, la producción de ROS requiere de la activación de una oxidasa (RbohD, de *Respiratory burst oxidase homologue D*) que es parcialmente dependiente de la concentración de Ca^{2+} citoplasmática (Ogasawara *et al.*, 2008). Las ROS juegan un rol importante en la respuesta de defensa, pudiendo presentar un efecto antimicrobiano directo, inducir el reforzamiento de la pared celular, la expresión de genes de defensa y de genes detoxificadores. No obstante, si la infección persiste se producirá una mayor producción de ROS relacionada con la HR. En este proceso, conocido como estallido oxidativo, también es relevante la producción de óxido nítrico (Boller y Felix 2009).

Además de la defensa local, la resistencia de las plantas puede extenderse hacia regiones totalmente intactas de la misma, alejadas del sitio de infección, que no han sido lesionadas por el patógeno. Esta defensa generalizada ha sido denominada respuesta sistémica adquirida o SAR (de *Systemic Acquired Resistance*). La SAR tiene una duración de semanas y es una resistencia de amplio espectro, ya que actúa de forma semejante para una amplia variedad de patógenos (Ross, 1961; Ryals *et al.*, 1996).

1.2.2 Señalización hormonal

La señal del patógeno es percibida y amplificada a través de la acumulación de moléculas señales de la planta, como las hormonas ácido salicílico (SA, de *salicylic acid*), etileno (ET, de *ethylene*) y jasmonatos (JA, de *jasmonic acid*) (Yang *et al.*, 1997). La inducción de estas vías conduce en cada caso a la activación transcripcional de un grupo específico de genes de defensa, los cuales contribuyen a la protección de la planta frente a distintos tipos de patógenos, aunque existe una intrincada interconexión de señales regulatorias entre las tres vías (Feys y Parker 2000; McDowell y Dangl 2000). De forma general, la resistencia mediada por genes R está asociada a la activación de la vía del SA y a la aparición de la HR. Este tipo de muerte celular programada beneficia a la planta evitando la dispersión de patógenos biotróficos tales como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasitica* y *Erysiphae orontii* (Bowling *et al.*, 1994; Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998). De forma contraria, los patógenos necrótrofos tales como *Alternaria brassicicola* y *Botrytis*

cinerea, se benefician de la muerte celular, y son limitados por mecanismos alternativos dependientes de JA y ET (Glazebrook 2005).

La respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno o endógeno nunca es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Distintos estímulos provocan una activación asimétrica de esas redes señalizadoras complejas y el balance final de interacciones entre las mismas es el que determina las respuestas específicas al estímulo inicial. A pesar de que las rutas de transducción que responden al SA y al JA, actúan de forma independiente, se encuentran ejemplos tanto de antagonismo como de cooperación (Turner *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, la percepción del patógeno provoca la activación de varias cascadas de señalización mediadas por MAPKs cuyo resultado final es inducir la expresión de los genes de defensa. En *Arabidopsis* se ha planteado que las CDPKs actúan sinérgica e independientemente de las MAPKs para inducir esta activación. Para conseguirlo, estas cascadas de señalización conducen a la fosforilación de varios factores de transcripción, siendo estos los que regulan finalmente la expresión de dichos genes. Destacan por su relevancia los factores de transcripción de tipo WRKYs (de Wit 2007; Boudsocq *et al.*, 2010). Además, existe una inhibición cruzada entre estas dos vías de señalización. De esta forma, una elevada resistencia a biotrofos está correlacionada con un incremento de la susceptibilidad a necrotrofos. Asimismo, una elevada resistencia a necrotrofos condiciona una mayor susceptibilidad a biotrofos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Este antagonismo ha sido aprovechado por algunos patógenos para superar las defensas de la planta. Algunas cepas de *P. syringae* producen el efector coronatina (COR, de *Coronatine*), cuya estructura química es muy similar a la hormona JA. Su secreción consigue simular varias de las respuestas activadas por esta hormona. De hecho, se ha demostrado que la coronatina de Pto contribuye a su virulencia en *Arabidopsis* mediante la supresión indirecta de los mecanismos defensivos mediados por SA, más relevantes para combatir a este patógeno (Brooks *et al.*, 2005, Van der Does *et al.*, 2013).

Otra hormona vegetal involucrada en respuestas de defensa es el ácido abscísico (ABA), la cual varía su rol dependiendo del tipo de interacción planta-patógeno. El ABA mejora la resistencia de la planta frente a organismos necrotrofos y aumenta la susceptibilidad contra biotrofos y hemibiotrofos. Su forma de operar en la defensa de la planta involucra, en parte, el cierre de estomas y formación de calosa en los sitios de infección, lo cual interfiere con el ingreso de los patógenos (Maksimov 2009).

En los últimos años, existe un número creciente de trabajos que implican a otras hormonas, además de las tres ya mencionadas, en las respuestas de la planta frente al ataque del patógeno; ya sea favoreciendo la resistencia o la susceptibilidad al mismo. Es el caso de las citoquininas (CK, de *Cytokinins*; Choi *et al.*, 2010), las giberelinas (GAs, de *Gibberellins*; Navarro *et al.*, 2008), las auxinas (Wang *et al.*, 2007) y los brasinosteroides (BR, de *Brassinosteroids*; Nakashita *et al.*, 2003).

El ataque del patógeno provoca una modificación de la abundancia relativa de todas estas hormonas (Lopez *et al.*, 2008). Esta nueva homeostasis hormonal conduce a la expresión de los genes defensivos adecuados que permitan a la planta presentar una respuesta defensiva eficiente. Las funciones biológicas de estos genes incluyen, entre otras, la producción de agentes antimicrobianos o de proteínas capaces de catalizar dicha producción, el reforzamiento de la pared celular mediante la deposición de calosa en los puntos de infección y una mayor lignificación o la aparición de la HR en el lugar de inicio de la infección limitando su avance.

No obstante, los patógenos provocan una alteración de esta homeostasis como parte de su estrategia de virulencia, llegando incluso a producir fitohormonas o compuestos que las mimetizan. De hecho, ha quedado probada la producción de SA, CK, ABA, auxinas, JA y ET en diferentes especies de bacterias y hongos (Forchetti *et al.*, 2010; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Tuomi *et al.*, 2013). Además también ha sido reportado que los patógenos pueden inducir la producción de hormonas en el hospedero (Lopez *et al.*, 2008; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

1.2.3 Expresión de genes de defensa

Un componente clave para una defensa eficaz por parte de la planta, es la capacidad de inducir y regular de forma específica los patrones de expresión temporal y espacial de genes de defensa. La reprogramación de la expresión génica durante las reacciones de PTI, ETS y ETI ha sido bastante estudiada en diferentes patosistemas a través de la aplicación de microarreglos o ADNc-AFLP (de *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Estudios por *microarrays* en *Arabidopsis*, revelaron que más de 1000 genes se regulan en los primeros 30 minutos después del tratamiento con flg22 (Zipfel *et al.*, 2004; 2006). Mientras que algunos genes están involucrados en las cascadas de transducción de señales, otros activan defensinas o enzimas que están implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas o enzimas protectoras (Bell *et al.*, 1986; Ron y Avni 2004; Fritz-Laylin *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2006). De forma similar, un gran número de genes aumentan su expresión rápidamente después del tratamiento con el peptidoglicano elf26, y el tratamiento con quitina (Ramonell *et al.*, 2002; Libault *et al.*, 2007), lo que sugiere que las respuestas PTI desencadenadas por diferentes PAMPs implican mecanismos comunes de señalización corriente abajo de su reconocimiento por parte de la célula vegetal.

Como ya se ha mencionado, para que el patógeno logre colonizar un hospedero tiene que atravesar una serie de barreras estructurales que presentan las plantas (Gohre y Robatzek 2008). Una de las principales barreras la constituye la pared celular, y se sabe que durante la infección las plantas generan modificaciones en la pared con el fin de reforzar esta barrera estructural (Chisholm *et al.*, 2006; Gohre y Robatzek 2008). Una de estas modificaciones consiste en la deposición de calosa en aposiciones de la pared celular denominadas papilas (Gohre y Robatzek 2008). Estudios de expresión diferencial mediante microarreglos en el patosistema *Arabidopsis-Pseudomonas* han mostrado que ciertos efectores previenen la síntesis de proteínas que se

relacionan con el refuerzo de estas barreras estructurales, tales como la deposición de calosa para la formación de papilas (Hauck *et al.*, 2003). Igualmente, estudios de microscopía de epifluorescencia con azul de anilina han demostrado que el efector XopN de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* suprime la deposición de calosa tanto en tomate como en *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2009).

En cuanto al uso de ADNc-AFLP para análisis de transcriptomas vegetales en patosistemas, esta ha sido aplicada fundamentalmente para la búsqueda de perfiles polimórficos, relacionados con la expresión de genes frente al ataque por patógenos (Birch y Kamoun 2000; Durrant *et al.*, 2000). También a través de ADNc-AFLP se han estudiado perfiles de expresión relacionados con la HR en tabaco y tomate (Vandenabeele *et al.*, 2003; Gabriëls *et al.*, 2006), así como en la SAR en *Arabidopsis* (Maleck *et al.*, 2000); sin embargo, como se mencionó antes, estas técnicas o bien requieren de pasos de hibridación como los microarreglos, o poseen una baja cobertura de transcriptos. Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, se han revolucionado campos como los de la genómica y la transcriptómica. La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación de la secuenciación de ADNc, o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como RNA-seq (Wang *et al.*, 2009; Garber *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2012). Esta herramienta transcriptómica cambia la manera de cómo se analizan y comprenden los transcriptomas (Wang *et al.*, 2009). Además, el RNA-seq da una cobertura completa de transcriptos, genera información no solo de la secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos de *splicing* alternativo (Lister *et al.*, 2009; Gullledge *et al.*, 2012). A la fecha se han reportado estudios de transcriptómica frente a patógenos en *Arabidopsis*, arroz, algodón y soja, entre otros (Zhu *et al.*, 2013; Bagnaresi *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011).

1.2.4 Muerte celular programada en plantas

La muerte celular programada (PCD, de *programmed cell death*) es un proceso de suicidio celular controlado genéticamente, que cumple un rol esencial en la biología de las plantas. La regulación de este programa es fundamental para asegurar que la PCD se active solamente en determinadas células y en el momento apropiado (Ellis *et al.*, 1991). En plantas, una de las formas más estudiadas de PCD es la HR (Morel y Dangl, 1997). La PCD que se desencadena durante la HR permite aislar al patógeno y restringir su acceso a nutrientes y factores celulares necesarios para su crecimiento y dispersión. Dentro de los procesos moleculares que desencadenan la HR, se encuentra la producción de ROS, la acumulación de NO y el SA (Lam *et al.*, 2001). El análisis de mutantes de *Arabidopsis* afectados en el desencadenamiento de la HR, así como en la dispersión de la respuesta, ha generado evidencias de la importancia de la PCD en la respuesta de resistencia a patógenos inductores de HR (Lorrain *et al.*, 2003). La activación de PCD en plantas induce una

serie de cambios celulares tales como condensación de la cromatina, de fragmentación del ADN, cambios ultraestructurales en membranas y organelos, y la activación de proteasas (del Pozo y Lam, 1998; Rojo *et al.*, 2004).

Las ROS y el NO se proponen como moléculas claves para el desarrollo de la HR (Delledonne *et al.*, 1998, 2001). Estudios farmacológicos y moleculares proporcionan evidencia de que la regulación de la PCD de células animales actúan de manera similar en las células vegetales (Lam *et al.*, 2001). En las células animales, las mitocondrias desempeñan un papel en la PCD. Al percibir señales de muerte celular, una proteína pro-apoptótica llamada Bax forma canales en la membrana externa de las mitocondrias y desencadena la liberación de citocromo c, que es normalmente secuestrado en el interior de las mitocondrias (Bultynck *et al.*, 2012). La liberación de citocromo c activa una serie de proteasas de cisteína denominadas caspasas que conducen a la proteólisis de las proteínas esenciales para el mantenimiento de la integridad celular (Bultynck *et al.*, 2012).

El estrés oxidativo causado por ROS y la peroxidación lipídica (Figura 3) cumplen un rol importante en la regulación de la PCD (Slater *et al.*, 1995). Las células están constantemente generando ROS, incluyendo peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilos durante el metabolismo aeróbico. Los sustratos moleculares más frecuentes de las ROS incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Beckman y Ames 1998). Frente a estas especies oxidantes, los organismos vivos han desarrollado una serie de mecanismos de protección que sirven para eliminar las ROS antes de que puedan dañar partes sensibles de la maquinaria celular. Esencialmente, estos mecanismos se dividen en dos grandes grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos: 1) los enzimáticos que protegen a las células frente a los ROS producidos durante el metabolismo, dentro de los que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) y 2) antioxidantes-no enzimáticos tales como tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico (AsA, de *ascórbico acid*) y glutatión (GSH) (Scandalios 2005).

Cuando las defensas antioxidantes se ven sobrepasadas por las fuerzas oxidantes se genera el denominado estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la óxidoreducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se debe a una excesiva producción de ROS y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo al daño celular.

La PCD es efectiva para evitar el desarrollo de hongos biótrofos, como *Peronospora* sp. o *Erysiphe* sp., los cuales necesitan de las células del hospedador para desarrollarse. Sin embargo, en el caso de hongos necrótrofos, como *Botrytis* sp., *Alternaria* sp. o *Penicillium* sp., la HR no es efectiva, ya que estos patógenos obtienen del tejido muerto los nutrientes que necesitan para su desarrollo (Glazebrook, 2005). La modificación mediante transgénesis de las vías que regulan la PCD es una estrategia potencial para desarrollar tolerancia a dichos patógenos (Mitsuhashi *et al.*, 1999; Qiao *et al.*, 2002). Se sabe muy poco sobre el mecanismo molecular subyacente de la PCD en plantas (Dangl *et al.*, 2000). Sin embargo, hay evidencias de que los mecanismos de regulación básicos

para la activación de la PCD en animales y plantas están parcialmente conservados (Kawai *et al.*, 1999; Lacomme y Cruz, 1999; Mitsuhashi *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2001; Elbaz *et al.*, 2002). En particular, evidencia morfológica y bioquímica ha sugerido la similitud entre la HR de plantas y la muerte celular inducida por Bax en animales (Lacomme y Cruz, 1999; Abramovitch *et al.*, 2003). Aunque hasta la fecha, ningún homólogo de Bax fue identificado en los genomas de plantas, la sobreexpresión de Bax de mamíferos en tabaco (Lacomme y Santa Cruz 1999) y *Arabidopsis* (Kawai-Yamada *et al.*, 2001) induce la muerte celular, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación de muerte celular similares en plantas y animales. En 1998 Xu y Reed identificaron una proteína humana capaz de suprimir la muerte celular mediada por Bax en levadura, que denominaron (BI-1; de *Bax Inhibidor-1*). Posteriormente, se aislaron homólogos a BI-1 en *Arabidopsis* (AtBI-1) y arroz (OsBI-1) y su sobreexpresión en levaduras suprimió la muerte celular mediada por Bax (Kawai *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, el gen AtBI-1 se induce por heridas y en respuesta a patógenos (Sánchez *et al.*, 2000). Esta inducción se observa tanto en interacciones compatibles como en incompatibles entre la planta hospedera y el patógeno (*Pseudomonas syringae*), así como después de la inoculación con un microorganismo no patogénico como es *Escherichia coli* (Huckelhoven 2004).

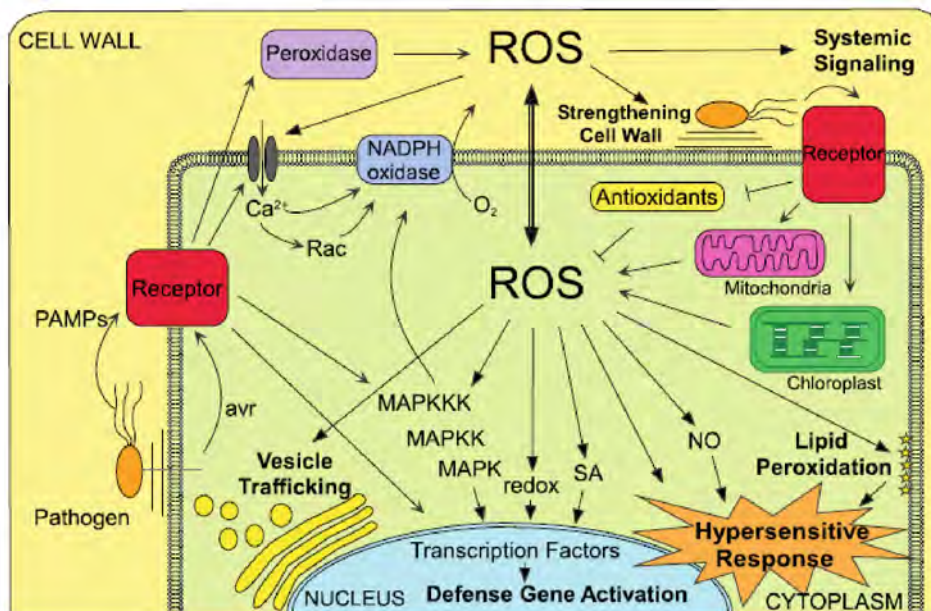


Figura 3. Señalización mediada por ROS. El reconocimiento del patógeno por parte de la plantas conduce a la producción de ROS y a la activación de los mecanismos de defensas de la planta. Tomado de Torres 2010.

1.2.5 Respuestas sistémicas

En 1961 se constató que las plantas son capaces de transmitir información a hojas distales del sitio de infección (Ross 1961). Esta comunicación a distancia en el interior de la planta requiere tanto de la existencia de una señal sistémica móvil como de un buen sistema de transporte que permita una eficiente translocación de la misma (Shah 2009). El tejido vascular de la planta representa una perfecta vía de transporte y distribución de estas señales sistémicas. También se ha comprobado

que determinados compuestos volátiles pueden contribuir a esta señalización sistémica sin necesidad de utilizar el tejido vascular. Dichos compuestos volátiles pueden ser translocados por vía aérea y actuar sobre la propia planta o sobre plantas vecinas. También pueden ser emitidos por plantas atacadas por ciertos herbívoros, induciendo una defensa indirecta mediante la atracción de los insectos predadores de estos herbívoros (Frost *et al.*, 2008; Heil y Ton 2008).

Para que un determinado metabolito sea considerado como una señal sistémica de las defensas de la planta, ha de poder translocarse desde el tejido atacado hasta las zonas distales antes de que se induzcan en ellas las respuestas defensivas, pudiendo así ser responsable de influir en la activación de las mismas. En este contexto cabe destacar el concepto de resistencia sistémica adquirida (SAR), como un buen ejemplo de un mecanismo defensivo inducible que es activado en los tejidos distales de la planta en respuesta a una infección local por un patógeno. Como se mencionó anteriormente, la SAR proporciona a la planta un aumento en la resistencia basal frente al posible ataque posterior por parte de una amplia gama de patógenos (Vlot *et al.*, 2008; Shah 2009). La resistencia sistémica inducida (ISR, de *Induced Systemic Resistance*) es otro tipo de señalización sistémica defensiva que tiene lugar en la planta tras su colonización por parte de microorganismos beneficiosos. Un ejemplo típico de ISR es la colonización de las raíces de la planta por parte de rizobacterias no patogénicas, hecho que proporciona a dicha planta una mayor resistencia frente a infecciones posteriores por parte de diversos patógenos (van Loon, 2007). Durante los últimos años se han hecho bastantes esfuerzos para identificar posibles metabolitos que funcionen como señales sistémicas defensivas, especialmente con aquellos involucrados en la SAR (Shah 2009). El SA durante muchos años fue considerado la señal sistémica responsable de la inducción de SAR, aunque varios estudios más recientes mostraron que el SA no es la molécula translocada responsable de la inducción de resistencia en los tejidos sistémicos (Vernooij *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2007). En este sentido se ha demostrado que el ácido metilsalicílico actúa como una señal volátil que induce la SAR, y que es transmitida a partes distantes de la planta e incluso a plantas vecinas (Park *et al.*, 2007). Sin embargo, en los últimos años se ha observado que el metilsalicilato no es la única señal y podrían actuar otras moléculas como DIR1 (de *Defective in Induced Resistance 1*), AzA (de *dicarboxylic acid azelaic acid*), GP3 (de glycerol-3-phosphate) (Shah y Zeier 2013).

1.3 *Physcomitrella* como organismo modelo

Los musgos o briofitas dominaron regiones terrestres hace 400 millones de años, y se encuentran hoy en día ampliamente distribuidas en el planeta, desde los trópicos hasta la Antártida (Proctor y Tuba 2002; Robinson *et al.*, 2003). Se originaron como una rama divergente de las plantas vasculares, aunque probablemente compartan un ancestro común. *Physcomitrella patens* pertenece a las briofitas y habita predominantemente en zonas templadas. *Physcomitrella* es la primera planta terrestre sin flor, cuyo genoma fue secuenciado, por lo que resulta un modelo ideal para responder preguntas fundamentalmente acerca de la evolución de plantas a nivel molecular.

La primera versión del genoma de *Physcomitrella* v1.1 (la utilizada en este trabajo para hacer los estudios transcriptómicos) reflejaba que el genoma contenía 480 MB distribuidas en 27 cromosomas y contenía más de 32.000 genes predichos, a diferencia 25.000 en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (125Mb) y más de 50.000 en *Oryza sativa* (466Mb) (Yu *et al.*, 2002; Rensing *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2013). Esta versión solo contiene un 41% de los loci anotados. A mediados del 2013 Zimmer *et al.*, presentaron la versión v1.6 del genoma de *Physcomitrella*, la cual presenta la anotación estructural de 32.275 genes que codifican proteínas, resultando en 8387 loci adicionales que incluyen 1.456 loci con dominios de proteínas conocidas u homólogos en el reino *Plantae*. Esta es la primera versión que incluye información sobre las isoformas de transcripción, lo que sugiere eventos de *splicing* alternativo por lo menos en 10.8% de los loci. Además, esta nueva versión también proporciona información sobre loci no codificantes de proteínas. Se mejoraron las anotaciones funcionales en cuanto a calidad y cobertura, lo que resultó en 58% de los loci anotados (anteriormente: 41%), que comprenden también 7.200 loci anotados adicionales. El acceso a la anotación del genoma funcional y estructural se proporciona a través de la base de datos www.cosmoss.org.

Una herramienta poderosa para estudiar la función de genes específicos es la genética reversa, a través de la alteración dirigida de genes y la producción de plantas mutantes *knockout*. *Physcomitrella* es el primer musgo en ser transformado eficientemente (Schaefer *et al.*, 1991), y más interesante es el primer eucariota multicelular en el cual la integración de ADN en el genoma ocurre mediante recombinación homóloga con una eficiencia similar a la observada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Schaefer y Zryd 1997; Schaefer 2001). La habilidad de *Physcomitrella* para dirigir ADN exógeno a un locus en particular, provee una herramienta para la disrupción dirigida y el análisis funcional de genes en estudio.

1.3.1 El ciclo de vida de *Physcomitrella*

El ciclo de vida *Physcomitrella* consiste en un gametofito haploide dimórfico dominante y un esporofito reducido. A diferencia de las angiospermas, *Physcomitrella* utiliza esperma flagelado capaz de nadar libremente para la fertilización, un proceso totalmente dependiente del agua (Prigge y Bezanilla 2010). A lo largo de la evolución de las plantas, el cambio de la alternancia de generaciones dió lugar a un esporofito diploide dominante y un gametofito haploide reducido (Gerrienne y Gonez 2011).

El ciclo de vida de *Physcomitrella* comienza ya sea con la germinación de esporas o artificialmente, con la regeneración de protoplastos. Ambos procesos implican crecimiento polar y la producción de redes filamentosas de protonemas (Figura 4). El protonema se compone de dos tipos de filamentos; cloronema y caulonema. El caulonema crece más rápido que el cloronema. Los primeros tipos de filamentos que emergen son el cloronema y estos son ricos en cloroplastos, entre 50-100 cloroplastos por célula. Los tabiques divisorios que se forman entre las células del cloronema son siempre perpendiculares al eje del filamento (Menand *et al.*, 2007). El caulonema

surge de la división de las células apicales del cloronema de una manera dependiente de auxinas. Las células del caulonema crecen más rápido y por lo general poseen un menor número de cloroplastos que las células del cloronema. Las divisiones entre células del caulonema son siempre oblicuas al eje longitudinal de la célula (Prigge y Bezanilla 2010).

Las ramas laterales del caulonema se diferencian en las yemas, de las cuales se desarrollan los gametóforos. La división celular en diagonal produce una célula apical que da lugar a un gametóforo y células basales que dan lugar a rizoides. Las briofitas no tienen lo que se define como "hojas verdaderas". Las hojas del gametofito son diferentes a las de las plantas vasculares porque no tienen estomas, tejido vascular, cutícula y solo tienen una capa de células. Las hojas juveniles no tienen tejido vascular y en el caso de las hojas adultas estas desarrollan una nervadura centra que probablemente funcione como un tejido conductor (Sakakibara *et al.*, 2003). Los gametóforos llegan a la fase adulta y continúan diferenciándose, produciendo finalmente los órganos reproductivos masculinos (anteridios) y los femeninos (arquegonios).

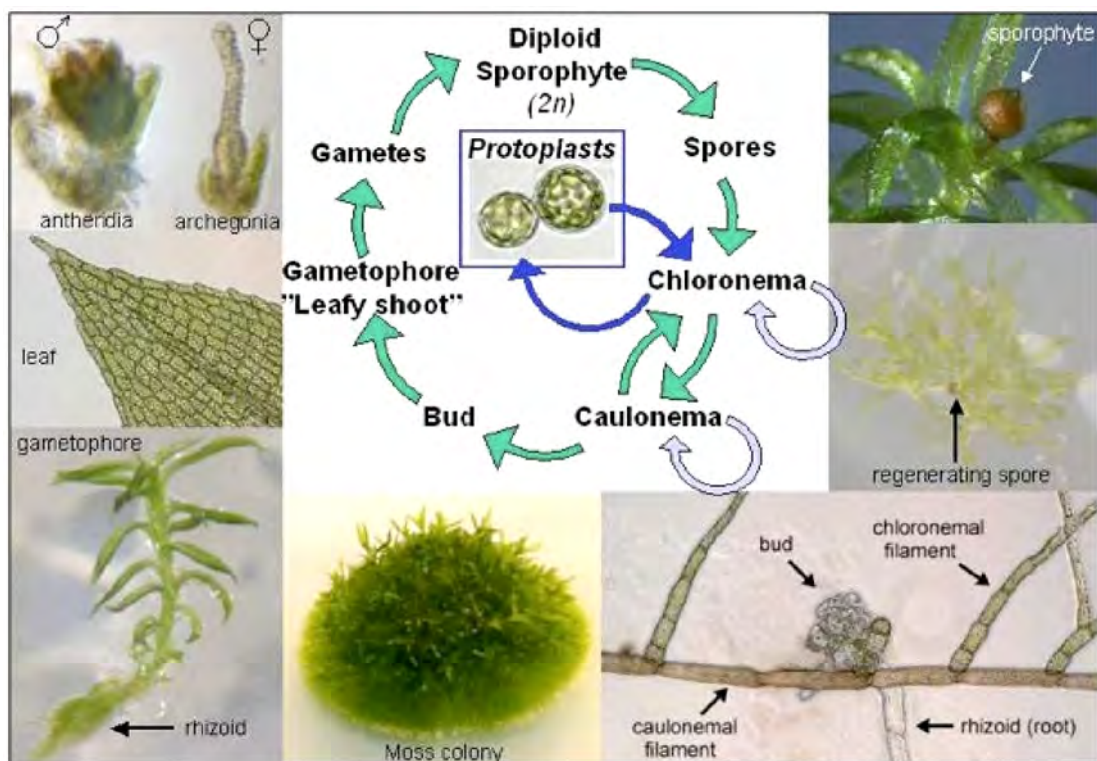


Figura 4. Ciclo de vida de *Physcomitrella*. En la fase haploide, el gametofito produce los órganos sexuales masculinos (anteridios) y femeninos (arquegonios). Las células sexuales masculinas (anterozoides) y las células sexuales femeninas (oosfera) se producen por mitosis. Luego de la fecundación se 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 (Tomada de www.cfg.uu.se/models_Physcomitrella.html).

Dado que *Physcomitrella* es una planta monoica, ambos gametos, masculinos y femeninos, se producen en la misma planta. En presencia de agua, los anteridios forman anterozoides, que nadan hacia los arquegonios, que contienen las células huevo. Después de la fecundación, se forma un cigoto, que luego crece y se desarrolla en un esporofito diploide maduro, compuesto por

una seta corta cubierta con una cápsula de esporas. Después de la meiosis, varios miles de esporas son producidos dentro de la cápsula de esporas y son dispersados en el ambiente circundante. Tras la germinación de estas esporas se reanuda el ciclo de vida, que tiene una duración aproximada de tres meses (Schaefer y Zrýd 2001; Prigge y Bezanilla 2010). Los tejidos vegetativos de *Physcomitrella* se pueden propagar continuamente *in vitro*, lo cual requiere muy poco espacio en el cuarto de cultivo. Las células vegetales son totipotentes, y en consecuencia pueden regenerarse a partir de protoplastos o después de la rotura mecánica de los tejidos (Sugimoto *et al.*, 2011, Ishikawa *et al.*, 2011). La transformación de *Physcomitrella* es llevado a cabo por bombardeo de partículas de protonemas o por transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG), que pueden dar lugar a transformantes estables luego de 4-6 semanas (Schaefer *et al.*, 1991; Prigge y Bezanilla 2010).

1.3.2 *Physcomitrella* como sistema modelo para estudios funcionales de genes

El potencial de los musgos como sistemas modelo para el estudio de procesos biológicos fue por primera vez reconocido en los años 40. Dentro de las características principales que hacen al musgo *Physcomitrella* un excelente modelo, se encuentran su patrón de desarrollo relativamente sencillo, sus respuestas a factores de crecimiento vegetales similares a plantas vasculares, y la facilidad para aproximaciones genéticas resultantes de su dominancia gametofítica de su ciclo de vida (Cove *et al.*, 1997). La principal ventaja de que *Physcomitrella* posea un gametofito haploide dominante es que no se requieren retrocruzamientos con el fin de generar mutantes homocigotos, lo cual ahorra muchísimo tiempo y trabajo (Reski y Frank 2005). Sin embargo, una de las desventajas más importantes es que los "mutantes knockout" de algunos genes pueden causar letalidad embrionaria por lo que no serían viables. Esto ha sido resuelto mediante el uso de la técnica de ARN de interferencia ARNi (Prigge y Bezanilla 2010). Construcciones de ARNi pueden ser diseñadas para reducir los niveles transcripcionales de genes de interés, lo que resulta en una disminución en lugar de una anulación de los niveles transcripcionales de genes específicos o incluso familias génicas enteras de genes simultáneamente (Bezanilla *et al.*, 2003; Khraiwesh *et al.*, 2008).

El análisis del transcriptoma de esta planta en relación a los genes de *Arabidopsis*, demostró que 66% de los genes de *Arabidopsis* tienen homólogos en *Physcomitrella* y que además existe un número de al menos 850 genes que son específicos de *Physcomitrella* y están ausentes en plantas vasculares (Nishiyama *et al.*, 2003). Los musgos en general son más tolerantes a cambios ambientales bruscos en comparación con plantas vasculares, incluyendo una mayor tolerancia a sequía, radiación y temperaturas extremas (Frank *et al.*, 2005, Rensing *et al.*, 2008) y también hay evidencias de una mayor resistencia a patógenos (Lawton y Sidasan 2009). Por estos motivos en conjunto, *Physcomitrella* representa una fuente de genes que podrán ser utilizados para conferir mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés en plantas de interés agronómico.

1.3.3 Antecedentes en el estudio de la interacción planta-patógeno en *Physcomitrella*

En los últimos años nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el análisis de los mecanismos de defensa que se activan en *Physcomitrella* frente a la infección con microorganismos patógenos. Demostramos que tres patógenos de plantas vasculares de amplio rango de hospedero, incluyendo la bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*P.c. carotovorum*), el hongo *B. cinerea*, y los oomicetes *Pythium debaryanum* (*P. debaryanum*) y *Pythium irregulare* (*P. irregulare*) infectan *Physcomitrella* causando síntomas de enfermedad, incluyendo la maceración del tejido vegetal (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Ponce de León 2011) (Figura 5 parte i y ii). Dado que *Physcomitrella* tiene una sola capa de células en la mayor parte de sus tejidos, lo cual facilita enormemente las observaciones *in-vivo* mediante microscopía, hemos podido observar el amarronamiento de las paredes de las células infectadas, que en el caso de la infección con *P. debaryanum* y *P. irregulare* se acompaña de un cambio en la distribución de los cloroplastos (Castro *et al.*, 2009).

La bacteria *P.c. carotovorum* produce enzimas que degradan la pared celular (PCWDE, de *Plant Cell Wall Degrading Enzymes*), incluyendo celulasas, proteasas y pectinasas (Perombelon y Kelman, 1980; Palva *et al.*, 1993). Tratamientos de plantas vasculares con el filtrado de cultivo (CF) de *P.c. carotovorum*, el cual es libre de células y contiene CWDEs, que liberan oligogalacturónidos de la pared de las células vegetales que actúan como DAMPS, son capaces de activar la respuesta de defensa vegetal evidenciada por la acumulación de fitoalexinas y la activación de genes relacionados con la defensa (Norman *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 1997 y 1998). Dado que el CF induce síntomas y la expresión de genes de defensa de manera muy similar a lo que sucede con la bacteria *P.c. carotovorum* (Vidal *et al.*, 1997), los CFs son utilizados frecuentemente en el estudio de las respuestas de defensa inducidas por esta bacteria. Los estudios en *Physcomitrella* demostraron que tanto el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*, que tiene el gen *hrpN* que codifica para la proteína *harpin*, inductora de la HR, como el CF de la cepa SCC3193 HrpN-negativa de *Pectobacterium wasabiae* (ex *P.c. carotovorum* cepa SCC3193) (Mattinen *et al.*, 2004, Nykyri *et al.*, 2012) son capaces de causar maceración en los tejidos de *Physcomitrella* (Ponce de León *et al.*, 2007, 2012) (Figura 5 parte i).

Además, tanto *B. cinerea*, como las dos especies de *Pythium*, y el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y SCC3193 de *P. wasabiae*, pueden inducir una respuesta de defensa en *Physcomitrella* (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012).

Las ROS pueden además contribuir al fortalecimiento de la pared celular al catalizar uniones cruzadas entre los polímeros de la pared celular, y sirven como una señal a las células vecinas indicando que un ataque está en marcha. En respuesta a la infección con *Pythium* y *B. cinerea* se acumulan ROS y se refuerza la pared celular mediante la acumulación de compuestos fenólicos (Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012).

Tejidos de *Physcomitrella* tratados con el CF de *P.c. carotovorum* también presentaron modificaciones de la pared celular, incluyendo la incorporación de compuestos fenólicos evidenciado por tinciones con safranina-O (color rosa-rojo de las células y las paredes celulares) (datos del grupo no publicados, manuscrito en preparación) (Figura 6).

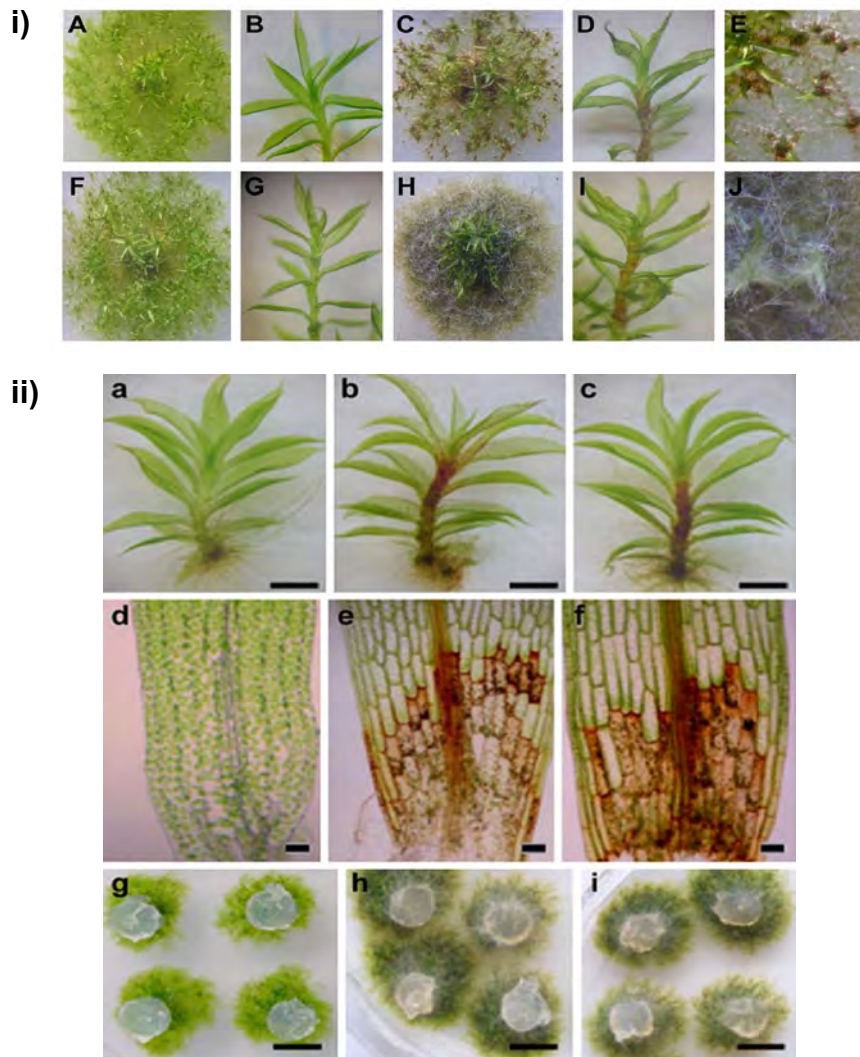


Figura 5 Síntomas de enfermedad de tejidos de *Physcomitrella* en respuesta a elicitores y patógenos. Parte i) Desarrollo de síntomas en respuesta al CF de *P.c. carotovorum* y k y esporas de *B. cinerea*. Colonias y gametóforos tratados con LB (A, B), CF (SCC1) (C, D), CF (SCC3193) (F, G) o con esporas de *B. cinerea* spores (H, I). Se presentan acercamientos de colonias tratadas con el CF(SCC1) (E), o inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Las fotos fueron tomadas de colonias inoculadas durante 48 horas. Tomado de Ponce de León *et al.*, 2007. Parte ii) Síntomas de enfermedad en los tejidos infectados de *Physcomitrella* con *Pythium*. A) gametóforo tratado con PDA, b) gametóforo inoculado tratado con *P. debaryanum*, c) gametóforo inoculado con *P. irregulare*, d) hoja tratada con PDA, e) hoja inoculada con *P. debaryanum*, f) hoja inoculada con *P. irregulare* g) colonias tratadas con PDA, h) colonias inoculadas con *P. debaryanum*, i) colonias inoculadas con *P. irregulare*. Las fotos se tomaron a 1 día post tratamiento. Tomado de Castro *et al.*, 2009.

Las células vegetales también responden al ataque microbiano al sintetizar rápidamente y depositar calosa entre la pared celular y la membrana de la célula adyacente al patógeno invasor. La calosa es un polímero β -1,3-glucano y su deposición permite que la pared celular sea menos vulnerable a la infección y la degradación por parte del patógeno mediante CWDEs (Jacobs *et al.*,

2003; Ton *et al.*, 2004). Al analizar tejidos de *Physcomitrella* tratados con elicitores de *P.c. carotovorum* se observó que los filamentos de protonema acumulan calosa (Figura 6f) (datos no publicados; manuscrito en preparación). Estos resultados indican que los elicitores de la cepa *P.c. carotovorum* SCC1 inducen la fortificación de la pared celular en los tejidos de *Physcomitrella*, evidenciadas por la incorporación de compuestos fenólicos y deposición de calosa. Esto es consistente con el refuerzo de la pared celular observado en plantas vasculares tratadas con elicitores (Hückelhoven *et al.*, 2007, Hématy *et al.*, 2009).

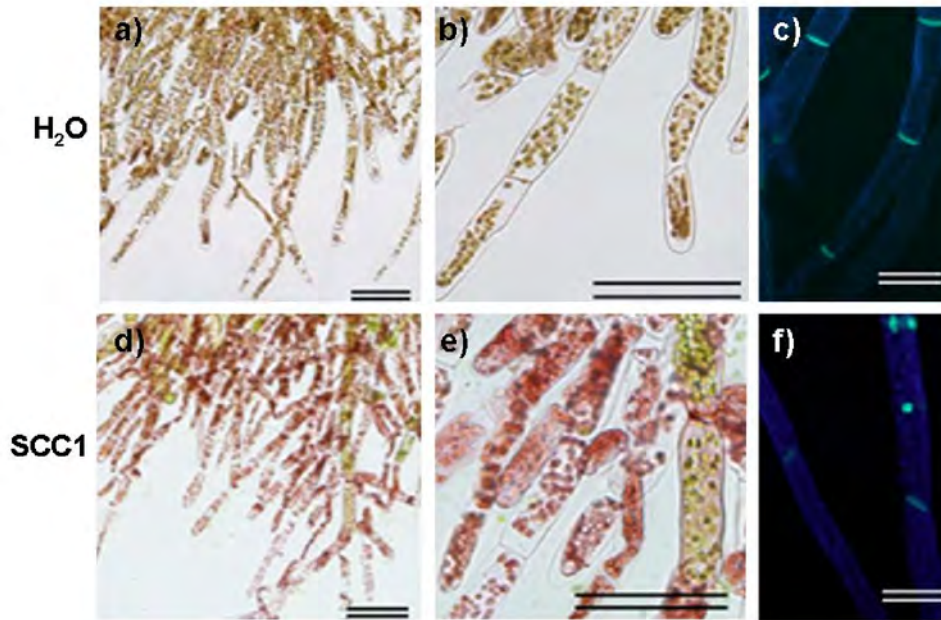


Figura 6. Cambios a nivel de la pared celular (a, b, d, e) La incorporación de compuestos fenólicos en las paredes de células de *Physcomitrella* tratadas con elicitores. Tejido de protonema tratado y teñido con safranina-O. (a, b) tratadas con agua, (d, e) tratadas con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* ((c, f) Deposición de calosa en tejidos de *Physcomitrella* tratadas con elicitores. c) protonema de *Physcomitrella* tratadas con agua y f) tratadas con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*. Las fotografías de muestras representativas fueron tomadas 24 horas después del tratamiento. Los depósitos callose aparecen como manchas fluorescentes brillantes. La barra de escala representa el 20 μm .

Como se mencionó anteriormente, la PCD es un mecanismo importante en la respuesta de defensa frente a patógenos (O'Brien *et al.*, 1998; del Pozo y Lam 1998; Rojo *et al.*, 2004). *B. cinerea* y elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* la cual tiene el gen *hrpN* que codifica para la proteína harpin, inductora de la HR, generan muerte celular de los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD, incluyendo el colapso del citoplasma, acumulación de compuestos fenólicos y amarronamiento de los cloroplastos (Ponce de León *et al.*, 2007). Recientemente confirmamos mediante la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) que *B. cinerea* induce PCD, particularmente en células colonizadas por hifas del hongo, indicando la fragmentación del ADN (Ponce de León *et al.*, 2012). Si bien estos resultados muestran que se induce este tipo de muerte celular en *Physcomitrella*, sería importante poder determinar si la PCD participa y contribuye a la defensa de este musgo frente a patógenos.

Hemos puesto a punto la cuantificación de la muerte celular en plantas enteras (colonias de *Physcomitrella*) mediante tinciones con azul de Evans. Este colorante solo entra en las células que están muertas o que están muriendo, y nos ha permitido cuantificar la muerte celular producida en *Physcomitrella* después del tratamiento con diferentes patógenos (Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012) y compuestos inductores de PCD, incluyendo el SA, paraquat, NO, shock térmico, sulfato de cobre, etc.

Mediante la colaboración establecida con el Dr. Schmeltz (Center for Medical, Agricultural, and Veterinary Entomology de Florida, USA), hemos medido en *Physcomitrella* varias hormonas implicadas en la defensa vegetal, incluyendo SA, ABA, JA y auxinas, en muestras infectadas con los diferentes patógenos (*P.c. carotovorum*, *B. cinerea*, y las dos especies de *Pythium*). Uno de los resultados más sorprendentes obtenidos de estos análisis es la ausencia de JA en plantas de *Physcomitrella* inoculadas con patógenos (Ponce de León *et al.*, 2012). La ausencia de JA también había sido reportada para plantas de *Physcomitrella* control y sometidas a heridas (Stumpe *et al.*, 2010; Browse 2009). Estos resultados indican que en *Physcomitrella* esta hormona no se produce, probablemente debido a la ausencia de la OPDA reductasa 3, enzima encargada de la conversión a JA. Sin embargo, *Physcomitrella* es capaz de responder a jasmonatos, evidenciado por la inducción de genes de defensa y por el acortamiento de los rizoides, de manera similar al acortamiento de raíces que ocurre en plantas vasculares (Ponce de León *et al.*, 2012). También detectamos un aumento en los niveles de SA en respuesta a la infección con *B. cinerea* (Ponce de León *et al.*, 2012). A su vez el pretratamiento con SA aumenta notoriamente la resistencia de *Physcomitrella* frente a *P. irregulare* (datos de nuestro grupo no publicados). De manera similar, el pretratamiento con SA induce un aumento en la resistencia a *P.c. carotovorum* (Andersson *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que la resistencia mediada por SA podría involucrar la activación de mecanismos de defensa similares en musgos y angiospermas. En plantas vasculares, el SA desempeña un papel clave en la activación de mecanismos de defensa asociados con la HR y participa amplificando la señal, tanto corriente arriba como corriente debajo de la muerte celular (Alvarez *et al.*, 1998). La generación de plantas transgénicas NahG, deficientes en la acumulación del SA, podría contribuir a aclarar la participación del SA en la respuesta de defensa de *Physcomitrella*, incluyendo respuestas como la HR.

Con el objetivo de identificar genes de *Physcomitrella* inducibles por patógenos, analizamos la expresión de un conjunto de 150 genes, cuyos ADNc fueron pedidos al *PhycoBase* (<http://moss.nibb.ac.jp>) utilizando la técnica de *Northern* inverso. Para algunos de los genes que mostraron un aumento de expresión en plantas tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*, y la cepa SCC3193 de *P.c. wasabiae* y/o inoculadas con esporas de *B. cinerea* comparados con plantas control, se analizó el patrón de expresión mediante *Northern blot*. Como resultado de estos análisis identificamos varios genes inducibles por patógenos incluyendo aquellos que codifican para proteínas con homología a la proteína relacionada con la patogenicidad PR-1,

chalcona sintasa (CHS), fenil-amonioliasa (PAL) y lipoxigenasa (LOX) de plantas vasculares (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009). La LOX es una enzima clave en la síntesis de compuestos relacionados con la defensa, incluyendo JA (Feussner *et al.*, 2002). La PAL media la biosíntesis de fenilpropanoides y SA (Dixon *et al.*, 1995; Hahlbrock *et al.*, 1989), la CHS es la primera enzima en la síntesis de flavonoides (Dixon *et al.*, 1995) y PR-1 es considerado como un marcador de la vía del SA en plantas vasculares (Durrant y Dong, 2004).

Los resultados obtenidos demuestran que *Physcomitrella* activa mecanismos de defensa en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*, *B. cinerea* y *Pythium*. Probablemente, *Physcomitrella* perciba la presencia del patógeno a través de la detección de PAMPs, o DAMPs como fragmentos de pared celular liberados por la acción de CWDEs, lo que conduciría a la activación de defensas relacionadas a la producción de ROS, el fortalecimiento de la pared celular, la acumulación de hormonas de defensa y finalmente la activación de genes involucrados en la defensa vegetal. Más de 450 millones de años separan a las briofitas de las plantas vasculares, sin embargo algunas reportes sugieren que los musgos podrían utilizar mecanismos para el reconocimiento de patógenos similares a los de las plantas vasculares. Un ejemplo es el reconocimiento de la quitina (Lawton y Saidasan 2009). Además, PRRs típicos, incluidos los homólogos de los receptores de quitosano (Lawton y Saidasan 2009), y genes con homología a los genes R están presentes en el genoma de *Physcomitrella* (Shiu *et al.*, 2004; Vij *et al.*, 2008). Por lo tanto, *Physcomitrella* es un buen modelo para el estudio de la percepción, señalización y activación de la defensa vegetal mediada por PAMPs y DAMPs, y el conocimiento generado puede ser comparado con el de plantas vasculares.

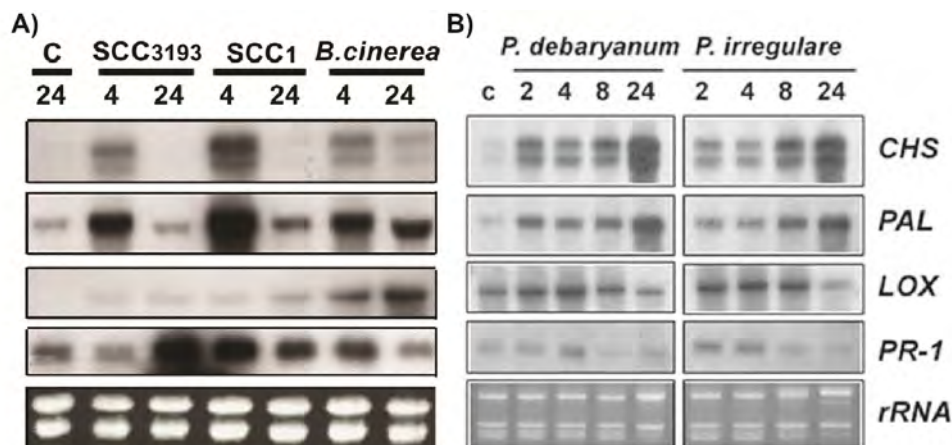


Figura 7. Elictores de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae* y los hongos *B. cinerea*, *P. debaryanum* y *P. irregulare* inducen genes relacionados con la defensa vegetal en *Physcomitrella*. Perfiles de expresión de genes de *Physcomitrella* homólogos a PR-1, PAL, CHS y LOX. Análisis por Northern blot utilizando muestras de ARN de colonias de *Physcomitrella*: A) en condiciones control (C) o tratadas con el CF de las cepas SCC1 y SCC3193 de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*; y tratadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea* y B) en condiciones control (C) o tratadas con plug de PDA conteniendo micelio de *P. debaryanum* y *P. irregulare*.

Dada la poca información que hay sobre los mecanismos de defensa que se activan en *Physcomitrella*, es importante generar conocimiento sobre las vías de defensa y genes de respuesta que se activan frente a la infección. La identificación y caracterización de genes que se inducen o se reprimen en respuesta a patógenos, junto con el análisis funcional de alguno de estos genes, permitirá abordar el estudio de los mecanismos moleculares que tienen lugar en las respuestas de defensa que se disparan en *Physcomitrella*. Esto permitirá identificar mecanismos de defensa que son compartidos entre *Physcomitrella* y plantas vasculares, así como estrategias de defensa novedosas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Esta tesis esta centrada en la identificación y caracterización de genes que permitan comprender los mecanismos de respuesta a patógenos en *Physcomitrella patens*.

2. 2 Objetivos específicos:

1. Identificar genes de *Physcomitrella* inducidos en respuesta a elicitores de *Pectobacterium carotovorum* sp. *carotovorum*.
2. Análisis funcional de genes de *Physcomitrella* con un posible rol en la defensa vegetal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

3.1.1 *Physcomitrella patens*

El musgo *Physcomitrella* tipo salvaje (Schaefer *et al.*, 1991) fue utilizado en todos los estudios de este trabajo. Los cultivos de *Physcomitrella* 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 y Cove 1977) y en algunos casos cubiertos con discos de celofán estéril. *Physcomitrella* fue crecido a 22-24°C con un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad. La micropropagación del material vegetal se realizó con material estéril en una cámara de flujo laminar.

Para la inducción del gametofito se cultivaron protonemas frescos de *Physcomitrella* wt y líneas sobre-expresantes en discos Jiffy7, cubiertos por agua por debajo de 1 cm, a 22°-24°C en condiciones de día largo (16 h de luz/día). Después de 6 semanas de crecimiento, cuando los gametofitos tenían entre 8 a 10 hojas se transfirieron a cámara de crecimiento a 15°C en condiciones de día corto (8 h de luz / día) para la inducción del esporofito.

3.1.2 Condiciones de cultivo que favorecen el desarrollo del caulonema

Para analizar el desarrollo del caulonema, las colonias de *Physcomitrella* fueron crecidas 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 *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de líneas sobre-expresantes y para la comparación fenotípica bajo condiciones de estrés y control, se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en cámara de crecimiento con 100 µmol fotones m⁻²seg⁻¹ de intensidad lumínica y fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad a 24°C. Para las plantas de *Arabidopsis* crecidas *in vitro* se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog 1962) con la mitad de concentración (½ MS) pH 5.7, 0.7% agar. Se esterilizó la superficie de las semillas sumergiéndolas primero en 70% EtOH por un máximo de 5 min y luego en una solución 7% de hipoclorito de sodio y 0.05% Tween durante 15 minutos con

agitación. Se realizaron cuatro lavados de 5 min con agua destilada estéril y se procedió a sembrarlas en el medio mencionado anteriormente. Las semillas se estratificaron durante 2 días en heladera a 4°C y se transfirieron a cámara de crecimiento. Para las plantas de *Arabidopsis* crecidas *ex vitro* se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento con turba rubia como sustrato. Como solución de riego se utilizó agua destilada.

3.1.4 *Nicotiana tabacum*

Para realizar los análisis de localización subcelular mediante agroinfiltración se usó *Nicotiana tabacum* cv. *samsun*. Las semillas de *Nicotiana* fueron esterilizadas como se describe en 3.1.3. Transcurrida una semana, las plántulas fueron pasadas a macetas con turba y regadas regularmente. Las condiciones de cultivo fueron de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad), 22°C y 50% de humedad relativa. Como solución de riego se utilizó agua destilada.

3.2 Cepa y cultivo de microorganismos

3.2.1 *Escherichia coli*

Para las transformaciones se utilizaron células competentes de la cepa DH5 α 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).

3.2.2 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Se utilizó la cepa SCC1 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) (antiguamente denominada *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Rantakari, *et al.*, 2001). Las bacterias fueron cultivadas en medio LB por 16 h a 28°C. Para obtener el filtrado de cultivo (CF) se inoculó un cultivo líquido de LB que se incubó con agitación a 28°C hasta alcanzar una densidad de 1x10⁸ ufc/mL (densidad óptica a 600 nm de 1.8-2.0). El cultivo bacteriano fue centrifugado a 3000g por 10 minutos, y el sobrenadante fue esterilizado por filtración (0,22 μ m) y conservado en alícuotas a -20°C.

3.2.3 *Botrytis cinerea*

El hongo *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) fue crecido en medio PDA (de *Potato Dextrose Agar*) (PDB comercial (Applichem); 1.5% agar). Las esporas se recogieron a partir de cultivos de aproximadamente 3 semanas crecidas a 22°C, resuspendidas en H₂O mQ (bidestilada) y se contaron en una cámara Improved-Neubauer. Para inocular se utilizaron dos concentraciones, 5x10⁵ esporas/mL y 1x10⁵ esporas/mL.

Para los estudios de microscopía se utilizó una cepa modificada de *B. cinerea* que expresa constitutivamente GFP (de *Green fluorescent protein*) y permite visualizar el avance de la enfermedad en los tejidos infectados.

3.2.4 *Pythium irregulare*

Pythium irregulare (*P. irregulare*) fue cultivado en PDA (Appllichem) a 22°C. Plugs de agar de 0.5 cm de diámetro conteniendo micelio de *P. irregulare* fueron colocados sobre las colonias de *Physcomitrella*. El desarrollo de *Pythium* dentro de los tejidos vegetales fue monitoreado tiñendo los tejidos con 0.1% de Solophenyl Flavine 7GFE 500 en agua durante 10 min, lavado con agua y visualizado por microscopía de epifluorescencia (Hoch *et al.*, 2005).

3.2.4 *Agrobacterium tumefaciens*

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* fue crecida en medio YEP conteniendo triptona 1 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), glucosa 0,1 %, agarosa 1 % (solo en caso de cultivo en placa) y NaCl 0.5 % (p/v); todo ello ajustado a pH 7.0 con NaOH y esterilizado en autoclave. La temperatura óptima de crecimiento es de 25-28°C.

3.3 Tratamientos

3.3.1 Tratamientos con microorganismos fitopatógenos

Se trataron colonias de *Physcomitrella* salvajes, y líneas que sobre-expresan los genes *PpPKC* (*OEPKC*) y *PpBI-1* (*OEBI*) con el filtrado de cultivo (CF, de *culture filtrate*) de la cepa SCC1 y SC3193 de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae* respectivamente, y como control se utilizaron colonias sin tratar. La inoculación con *B. cinerea* se realizó con suspensiones de esporas con concentraciones de 1×10^5 y 5×10^5 esporas/mL. Como control se utilizaron colonias sin tratar o tratadas con agua. 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. La inoculación con *P. irregulare* se realizó colocando plugs conteniendo el micelio del hongo sobre las colonias. Como control del tratamiento se utilizaron plugs de PDA.

3.3.2 Tratamientos con inductores de PCD

Se trataron protoplastos de *Physcomitrella* salvaje y líneas que sobre-expresan *PpBI-1* con quitosano a una concentración final de 50 y 150 μ g/mL durante 4 horas y posteriormente se evaluó la muerte celular como se describe en 3.8.1.

3.3.3 Tratamientos con moléculas relacionadas con el estrés abiótico

Se realizaron tratamientos con ácido abscísico (ABA, 100 μ M), manitol 0,9M, cloruro de sodio (NaCl, 0,5 M), 2 horas con luz UVB y shock térmico (37°C). Los tratamientos se hicieron incorporando los compuestos en el medio de cultivo.

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 toda la noche a 16°C.

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 3-5 mL en medio LB y el antibiótico correspondiente. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 13000 rpm y el *pellet* bacteriano fue resuspendido en 300 μ L de buffer 1 (tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNAsa 100 μ g/mL). Se agregaron 300 μ L de buffer 2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregó 300 μ L de buffer 3 (acetato de potasio 3.0 M 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 fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos, se lavó el *pellet* con etanol (EtOH) 70% y se resuspendió en 50 μ L de 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 se realizaron utilizando protocolos caseros o con el kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las extracciones de ADN genómico de *Physcomitrella* se realizaron a partir de tejidos de *Physcomitrella* correspondientes a 3-4 placas crecidas en estadio de protonema de 15-20 días.

Con el método casero se maceraron los tejidos vegetales en N₂ líquido y se resuspendieron en 15 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM, pH 8.0; NaCl 500 mM; β -mercaptoetanol 10 mM) y 1 mL de SDS 20% con agitación suave. Las muestras fueron incubadas 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 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. Los ADNs se corrieron en geles de agarosa 1% teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) para visualizar la calidad de los mismos; 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 *Physcomitrella* fueron realizadas siguiendo el método de aislamiento de ARN vegetal (Farrell 1993). 3-4 placas de colonias de *Physcomitrella* de aproximadamente 3 semanas fueron maceradas en N₂ líquido y resuspendidas en 2.5 mL de fenol y 5 mL de buffer NTES (NaCl 0.1M, Tris-HCl 0.01M pH 7.5, EDTA 1mM, SDS 1%). Las muestras se vortexearon durante 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 fueron precipitados con 0.1 volumen de NaAc 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH 96% a -20°C ON. 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 ON. 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 ON. 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) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las corridas electroforéticas 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 (bromofenol blue 0.05%, xylene cyanol FF0.05%, glicerol 0.05%) 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 *Pst*I.

3.5.6 Análisis por *Northern blot*

10 µg de ARN total fueron separados en geles de agarosa desnaturizante y transferidos a membranas de nylon (*Amersham Hybond-N⁺*, GE Health Care, Buckinghamshire NA) mediante capilaridad en solución SSC 20X (3 M NaCl, 0.3 M Citrato de sodio) (Sambrook *et al.*, 1989). A continuación el ARN fue fijado a la membrana mediante horneado a 120°C durante 45 minutos.

Las membranas fueron prehibridadas 4 h e hibridadas (toda la noche) a 65°C con solución conteniendo formamida 50% (v/v) 5X SSC, 0.2% SDS, 0.125 g de leche descremada en polvo, y 20 µg/mL de esperma de salmón desnaturizado. Se agregaron 50 ng de sondas de ADN desnaturizadas, marcadas con [α -32P] dCTP y se dejó proceder la hibridación toda la noche. Las membranas fueron lavadas a 65°C 2 veces durante 40 min con 5X SSC, 0.5 % SDS y 2 veces con 1X SSC, 0.5 % SDS a 65°C. El revelado se realizó por medio de películas de autoradiografía KODAK a -80°C, así como con el equipo Fuji Imager FLA-3000. Los fragmentos de ADN utilizados como sonda se obtuvieron a partir de la digestión con

Los insertos se purificaron a partir de los geles utilizando el Qiagen Gel extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se marcaron 50 ng de ADN con [α -32P]dCTP 50 µCi, 3000 Ci/mmol (MP Biomedicals, USA) usando el kit *Amersham Rediprime II DNA Labeling System* (GE Health Care, Buckinghamshire NA). Las sondas se purificaron con columnas de exclusión cromatográfica Illustra MicroSpin G-25 Columns (GE Health Care, Buckinghamshire NA).

3.6 Construcciones para sobre-expresión y determinación de la localización subcelular

3.6.1 Construcciones para la sobre-expresión en *Physcomitrella*

Se amplificó la región codificante del gen *PpPKC* a partir del ADNc de plantas de *Physcomitrella* tratadas con el CF de la cepa SCC1 de Pcc a 4 y 24 horas. La síntesis del mismo se llevó a cabo a partir de 5 µg de ARN total utilizando el kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, San Diego, CA) y 0.5 µL del cebador (dT) (100 µM) en un volumen final de 20 µL. Los cebadores se diseñaron generando sitios de restricción para el subclonado orientado en el vector de entrada pENTR2B.

El ADNc de *PpBI-1* fue amplificado por PCR, utilizando cebadores específicos a partir del clon pdp02459 obtenido del *Physcobase* (<http://moss.nibb.ac.jp>). Los cebadores utilizados así como el programa de amplificación se detallan en la Tabla 1.

Gen	Cebadores y programa de amplificación
PpPKC	5'- TCGCCGTGTGGGGATCCGTTGAG-3' / 5'- TCCATACATGCGGCCGCGTCACCATG-3' 94°C 3 min y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 1 min.; 68°C 7 min.
PpBI-1	5'- TCGCCGTGTGGGGATCCGTTGAG-3' / 5'- TCCATACATGCGGCCGCGTCACCATG -3' 94°C 3 min y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 90 s; 68°C 7 min.

Tabla 1. Lista de cebadores para la amplificación y aislamiento de los ADNc de *PpPKC* y *PpBI-1*.

Todas las amplificaciones se realizaron con un termociclador Perking Elmer 2400 utilizando la polimerasa *Dream Taq* (Thermo Scientific). Los productos de PCR fueron purificados y sometidos a una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Posteriormente, los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector de entrada pENTR2B (Invitrogen, San Diego, CA) previamente digerido con las mismas enzimas, defosforilado y purificado. Una vez donados en este vector, los CDS (de *Coding Sequence*) quedarán flanqueados por las secuencia attL1 y attL2, las cuales podrán ser recombinadas con las secuencias attR1 y attR2 que se encuentran en el vector de destino pTHubi utilizado para la posterior sobreexpresión, utilizando la enzima clonasa LR (Invitrogen, San Diego, CA). El plásmido pTHubi fue cedido por Pierre-Francois Perroud, Universidad de Washington, USA. Posee un *casette* de selección que confiere resistencia a hygromicina (Hyg) y contiene una región 5' y una 3' homologas al locus 108 de *Physcomitrella*, el cual es una región no codificante presente en copia única en el genoma (Schaefer y Zrýd, 1997). Tanto los vectores de destino como los de entrada contienen el gen *ccdB*, el cual es letal en la mayoría de las cepas de *E. coli*. Estos vectores vacíos son por lo tanto seleccionados luego de su transformación en las células *E. coli*. Esta selección negativa combinada con la selección positiva debido a la resistencia de un antibiótico, asegura que las colonias resultantes contengan el plásmido que hayan incorporado exitosamente el gen en estudio.

Luego de clonar los CDS en el vector de entrada, los vectores resultantes se utilizaron para transformar células DH5 α quimiocompetentes y los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con Kanamicina 50 μ g/mL. Se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina y se seleccionaron colonias que fueron analizadas mediante ensayos de restricción y secuenciación.

Se recombinaron 150 ng del vector pTHubi con 100 ng del vector pENTR2B (conteniendo el CDS de los genes seleccionados) utilizando 2 μ L de buffer de reacción Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Invitrogen, San Diego, CA). Se incubó a 24°C toda la noche, se agregó 1 μ L de proteinasa K y se incubó 10 min a 37°C. Se transformaron células DH5 α quimiocompetentes con la mitad de la reacción y los transformantes se seleccionaron en medio LB con espectinomycin 50 μ g/mL. Se seleccionaron algunas colonias que fueron analizadas mediante PCR (para determinar la presencia del CDS) y entre las que dieron positivas se seleccionó una de ellas para ser secuenciada y transformar protoplastos de *Physcomitrella*.

3.6.2 Construcciones para la determinación de la localización subcelular en tabaco y sobre-expresión en Arabidopsis

Se amplificaron las CDS sin el codón STOP de los genes *PpPKC* y *PpBI-1* en las mismas condiciones que en 3.12.1. Los programas y cebadores específicos se detallan en la Tabla 2.

Gen	Cebadores y programa de amplificación
<i>PpPKC</i>	5'- CTTGGATCCATGGCCACACTCTCTCCC-3' / 5'- CGAGTGC GGCCGCGCGGCGGCAGCAGCCTC -3' 94°C 3 min y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 1 min.; 68°C 7 min.
<i>PpBI-1</i>	5'- TCGCCGTGTGGGGATCCGTTGAG -3' / 5'- CGAGTGC GGCCGCTCGCGGCGCCTCCGGCGTTC -3' 94°C 3 min; 30 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 90 s; 68°C 7 min.

Tabla 2. Lista de cebadores para la amplificación y aislamiento de los CDS (sin codón STOP) de *PpPKC* y *PpBI-1*, para su utilización en construcciones conteniendo el gen reportero GFP fusionado al extremo carboxilo terminal del producto proteico codificado por los genes seleccionados.

Para determinar la localización subcelular de los productos proteicos codificados por los genes estudiados se utilizó el vector binario pK7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) que permite fusionar la proteína fluorescente GFP (de *Green Fluorescent Protein*) al extremo carboxilo terminal de la secuencia clonada en el vector por medio de la tecnología Gateway. Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pENTR2B (Invitrogen, San Diego, CA) en los sitios *Bam*HI/*Not*I. La ligación se llevó a cabo con 1 U de ligasa T4 a 16°C toda la noche. Se transformaron 4 µL de ligación en células DH5α quimiocompetentes y los transformantes fueron seleccionados en medio LB con Kanamicina 50 µg/mL. Se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina y se seleccionaron colonias que fueron analizadas mediante ensayos de restricción y secuenciación. Se recombinaron 150 ng del vector pK7FWG2 con 100 ng del vector pENTR2B (conteniendo la región codificante de los genes seleccionados) utilizando 2 µL de buffer de reacción Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen, San Diego, CA). Se incubó a 24°C toda la noche y al día siguiente se agregó 1 µL de proteinasa K e incubó 10 min a 37°C. Se transformaron células DH5α quimiocompetentes con 10 µL de reacción y los transformantes se seleccionaron en medio LB con espectinomicina 50 µg/mL. Se seleccionaron colonias que fueron analizadas mediante ensayos de restricción y entre las que dieron positivas se seleccionó una de ellas para ser secuenciada y transformar *A. tumefaciens*.

3.6.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para introducir los plásmidos en *Agrobacterium* se utilizó en todos los la conjugación triparental. EL método triparental consiste en cultivar tres bacterias juntas en una misma placa de LB sin selección:

- una cepa de *E.coli* (Helper) que contiene el plásmido de movilización (PRK2013), que lleva los genes de transferencia
- una cepa de *E.coli* que contiene el plásmido recombinante.
- una cepa de *Agrobacterium* receptora (GV3101)

El plásmido PRK2013 provee las proteínas de transferencia RK2 y ColE1 mob que permite al plásmido recombinante ser movilizado dentro de *Agrobacterium*. Para la purificación de las cepas

recombinantes se debe sembrar en placas usando medio LB con 100 µg/mL de rifamicina, 25 µg/mL gentamicina y 100 µg/mL espectinomicina.

3.7 Transformación de *Physcomitrella patens*

Se transformaron protoplastos de *Physcomitrella* con las construcciones correspondientes digeridos con la enzima *Swa*I (Fermentas). Luego de la digestión con *Swa*I el ADN se precipitó con 2 volúmenes de EtOH absoluto y 1/10 volumen de NaAc 3 M, pH 5.2 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 1 a 3 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 fue incubado en una solución de D-manitol 8% con Driselasa (SIGMA) 0.2% a temperatura ambiente durante toda la noche. La digestión fue filtrada 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 3 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 1.6x10⁶ por mL. Luego se resuspendieron en solución 3M (D-manitol 0.49 M, MgCl₂ 15 mM, MES 0.1% pH 5.6). En la transformación se utilizaron 300 µL de la suspensión de protoplastos a los que se le agregaron 10-30 µg de ADN. A continuación se agregaron 300 µL de la solución PEG (PEG 8000 40%, D-manitol 40%, Ca(NO₃)₂ 1 M, Tris-HCl 1 M pH 7.8), y se realizó el shock térmico a 45°C 5 min. Luego se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se realizó un lavado con la solución CaPW. Finalmente los protoplastos fueron resuspendidos en 300 µL de PRML (medio BCDAT conteniendo CaCl₂ 10 mM y D-Manitol 8%) y 2.5 mL de PRMT (medio BCDAT conteniendo CaCl₂ 10 mM, D-Manitol 8% y agar 0.5%), dispersados en placas de PRMB (medio BCDAT conteniendo D-Manitol 8% y agar 1%) 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 higromicina (Hyg) (SIGMA) 25 µg/mL.

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

3.8 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para cada construcción se sembraron al menos cuatro macetas con seis plantas de *Arabidopsis* en cada una. Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se llegó al estado en que las plantas presentaron una mayoría de botones florales, se procedió a la transformación por inmersión floral (Clough y Bent 1998). Para ello se inocularon 500 mL de medio YEP con 100 µg/mL de rifamicina,

carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos de *A. tumefaciens* conteniendo las diferentes construcciones. Se incubó durante toda la noche a 28°C con agitación a 200 rpm, o hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO600) aproximadamente 2.0. Se centrifugó el cultivo durante 20 min a 5.500 x g y se resuspendió en buffer de infiltración (MS 0.5 X, sacarosa 1%, Silwett L-77 0.05 %) obteniendo una DO600 mayor a 2.0. Las plantas se sumergieron en esta mezcla durante aproximadamente 20 segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para que no se evapore el inóculo. Se dejó una noche dentro de las bolsas y posteriormente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Se realizó un seguimiento de las plantas, realizándose inoculaciones en los botones florales que fueron surgiendo (cada 5 días a partir de la primera inoculación por inmersión). Para estas inoculaciones se pipeteó la suspensión bacteriana detallada anteriormente en cada botón floral en lugar de sumergir la planta (Martinez *et al.*, 2004). Se cosecharon las semillas y se sembraron en medio ½ MS pH 5.7, 0.7 % agar con kanamicina 100 µg/mL. Las plantas que sobrevivieron a las dos semanas fueron transferidas a maceta y se cosecharon semillas para la siguiente ronda de selección. El proceso anterior se repitió hasta obtener plantas T2 y T3 (se considera T0 a las plantas originadas por las semillas obtenidas luego de la inoculación).

3.9 Agroinfiltración de tabaco y microscopía

Para cada construcción se inocularon 5 mL de medio YEP con 100 µg/mL de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos (1 ó 2 días) de *A. tumefaciens*. El crecimiento se realizó en agitación a 200 rpm durante toda la noche a 28°C. Antes de infiltrar se pulverizaron las plantas con agua destilada y se las colocó bajo luces para que los estomas se abran. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 2200 xg 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet en 1 mL de buffer de infiltración (50 mM MES pH 5.6, 2 mM Na₃PO₄, 0.5 % glucosa y 100 µM acetosiringona), se centrifugó y resuspendió nuevamente en 1 mL de buffer de infiltración. Se diluyó la suspensión bacteriana con buffer de infiltración hasta llegar a una DO600 de 0.1. Las infiltraciones se realizaron con jeringas de 1 mL sin aguja, presionando sobre el envés de las hojas. Se realizaron 3 ó 4 infiltraciones por construcción. Transcurridos 2 días, se cortaron los trozos de hoja infiltrados y se montaron para ser visualizados en microscopio confocal espectral (Leica TCS SP5 montado sobre un microscopio invertido Leica DM6000, software de imagen, LASAF v2.6.0).

3.10 Análisis moleculares de las líneas *sobre-expresantes*

3.10.1 Análisis de las líneas de *Physcomitrella* generadas

Los niveles de transcritos de *PpPKC* y *PpBI-1* de los posibles transformantes fueron analizados mediante Northern blot, como se describe en la sección 3.5.6 y comparados con los de plantas salvajes. Las extracciones de ARN de plantas salvajes tratadas y las sobre-expresantes sin tratar se realizaron tal como se describe en la sección 3.5.3.

3.10.2 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo

El método de transgénesis utilizado en *Physcomitrella* involucra la generación de protoplastos, los cuales al regenerarse pueden llegar a fusionarse generándose variaciones en la ploidía de los mismos (Schween 2005). Para determinar el nivel de ploidía de las líneas que sobre-expresan *PpBI-1* y *PpPKC* respecto a plantas salvajes de *Physcomitrella* se realizó citometría de flujo. Para esto se tomó una colonia de cada línea vegetal crecida 3 semanas en condiciones normales y se picó con 1 mL de Woody Plant Lysis Buffer (WPB) [Tris-HCl 0.2M, pH 7.5; MgCl₂·6H₂O 4 mM; EDTA Na₂·2H₂O 2 mM; NaCl 86 mM; Tritón 1 %; K₂O₅S₂ 10 mM; PVP10 1%]. La suspensión obtenida se incubó 15 minutos a 0°C y luego se pasó a través de un filtro de 0.45 µm. Posteriormente se agregó 50 µL de RNasa (concentración final: 1 mg/mL) y 50 µL de ioduro de propidio (concentración final: 1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Esta suspensión se analizó mediante un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson, USA) del Servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. La adquisición de los datos y su posterior análisis fue efectuado con el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Se analizaron 5000 núcleos por muestra.

3.10.3 Análisis de las líneas de *Arabidopsis* generadas

Se realizó la extracción de ADN genómico de las plantas T2 obtenidas para cada construcción, como se describe en la sección 3.5.2. Posteriormente se realizaron análisis mediante PCR para confirmar la presencia del transgen en el genoma de las mismas, utilizando los cebadores y condiciones detalladas en XXX.

3.11 Evaluación de las líneas de *Physcomitrella*

3.11.1 Medida de muerte celular

Para la detección de las células muertas, se incubaron entre 12-16 colonias de *Physcomitrella* durante 2 horas con 10 mL de una solución 0.05% (m/v) del colorante vital Azul Evans (Applichem), agitándose suavemente cada 20 minutos. Luego se lavaron cuatro veces con agua destilada para remover el exceso de colorante no unido. Las colonias se trasvasaron de a pares a tubos nuevos y el colorante unido a las células muertas fue solubilizado en tres ml de solución 50% de metanol y 1% de SDS durante 30 min a 60°C . A continuación se cuantificó por absorbancia a 600 nm y finalmente 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 (Castro *et al.*, 2009).

3.11.2 Tinciones para visualizar tejidos vegetales y fitopatógenos

Con el fin de visualizar las células de los distintos tejidos de *Physcomitrella* 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.

3.11.3 Tinciones para visualizar acumulación de ROS en los tejidos vegetales

La detección histoquímica de la acumulación de $O_2^{\cdot-}$ se realizó utilizando NBT (de *Nitroblue Tetrazolium*) (Sigma-Aldrich) de acuerdo a la metodología propuesta por (Trujillo *et al.*, 2004). 24 horas después de la pulverización con los CF de las cepas SCC1 y SCC3193 las colonias se incubaron durante 2 h en 1 mg/ml NBT en 10 nM NaN_3 y buffer fosfato de potasio 10 mM pH 7.8. Las colonias se enjuagaron dos veces en H_2O y la clorofila fue eliminada mediante la incubación durante la noche en 95% (v/v) de etanol.

La detección de la producción de H_2O_2 se realizó utilizando DAB (de *Diaminobenzidine*) (Sigma-Aldrich) según Thordal-Christensen *et al.* (1997). 24 horas después de la pulverización con los CF de las cepas SCC1 y SCC3193 las colonias se incubaron durante 2 h en 1 mg/ml DAB, HCl (pH 3,8). Las colonias se enjuagaron dos veces en H_2O y la clorofila fue eliminada mediante la incubación durante la noche en 95% (v/v) de etanol.

3.11.4 Visualización de cambios a nivel de la pared celular

Para detectar modificaciones de la pared celular la tinción de safranina-O se realizó de acuerdo a Lucena *et al.*, 2003. Los tejidos se incubaron con safranina-O 0,01% en etanol al 50% durante 5 min. Para la detección de calosa, los tejidos se fijaron en etanol, se enjuagaron en agua y se tñieron con un 0,01% de azul de metilo en buffer fosfato pH 7,0 durante 30 min y se observaron con epifluorescencia. Las microscopías de campo claro y epifluorescencia se realizaron con el Microscopio Olympus BX61 y las imágenes capturadas con el software Microsuite.

3.11.5 Cuantificación de los patógenos

Para evaluar el crecimiento de *B. cinerea* y *P. irregulare* en los distintos genotipos se aisló ADN total y se utilizaron cebadores específicos para *B. cinerea*, *P. irregulare* y *Physcomitrella* para cuantificar la biomasa por PCR en tiempo real según Gachon y Saindrenan (2004). El ADN total se aisló a partir de colonias de musgo inoculados con *B. cinerea* o *P. irregulare* utilizando el kit DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la inoculación (tiempo cero en el caso de *B. cinerea*) y (2h en el caso de *P. irregulare*) y después de 24 horas. Se aisló el ADN a partir de experimentos independientes por triplicado. Cada muestra correspondió a 16 colonias de *Physcomitrella* de tres semanas de edad tratadas con una suspensión de esporas de 5×10^5 esporas/ml en el caso de *B. cinerea* o tratadas con plugs conteniendo el micelio de *P. irregulare*. Los cebadores que se utilizaron para amplificar una región de copia única del gen Factor de Elongación de *Physcomitrella*.

La PCR cuantitativa se realizó utilizando el kit Quanti Tect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y el Rotor -Gene 6000 termociclador (Corbett Ciencias de la Vida, Sydney, Australia). La

temperatura de hibridación fue 55 °C. La cantidad relativa de ADN de *B. cinerea* y *P. irregulare* se normalizaron respecto al ADN de la planta y se expresaron en relación a las muestras calibratoras tomadas como tiempo cero. La cuantificación relativa se realizó de acuerdo a Pfaffl (2001), un modelo matemático que incluye las eficiencias de los genes diana y los genes de referencia internos y no requiere de curvas de calibración con ADN genómico puro (Gachon y Saindrenan, 2004).

Target gene		Sequence (5'-3')	Tm primer	Amplicon length (pb)
ElongF	Forward	TTGGGATTGAAATGTCGTG	53°C	180
	Reverse	TGAGCATGAGAAATTGGGTCT	57°C	
ITS	Forward	CTGTTGAGCGTCATTTCAA	56°C	184
	Reverse	CCTACCTGATCCGAGGTCAA	60°C	
ITSII	Forward	ATCTGTGTTTTGCATACTTGTGT	58°C	263
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56°C	

Tabla 3. Lista de cebadores para la amplificación y tamaño de los productos generados.

3.12 Evaluación de las líneas de *Arabidopsis*

Las semillas se sembraron en placas de Petri con medio MS diluido al medio pH 5.7, agar 0.7 % y se estratificaron durante 2 días en heladera a 4°C. A los 5-7 días, dependiendo del vigor, las plántulas que presentaban los dos cotiledones expandidos, se transfirieron a los orrespondientes medios de estrés y control. Las plántulas se colocaron de manera vertical, recostadas en el medio de cultivo para evaluar el crecimiento de la raíz. Para estudiar el efecto de la sobre-expresión sobre el crecimiento en condiciones control y de estrés. Para evaluar la tolerancia a estrés salino, se utilizaron tratamientos de, NaCl 150 mM *in vitro* y 300 mM de NaCl en tierra. Se tomaron fotografías en tiempo inicial y final de los tratamientos. Transcurridos 6-9 días de establecidos los tratamientos de estrés y controles, se realizaron las mediciones de tamaño utilizando el software ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004).

Para evaluar la resistencia a patógenos las plantas de dos semanas crecidas *in vitro* se inocularon con plugs de agar conteniendo el micelio de *P. irregulare* a nivel de la raíz o con 5 ml de una suspensión de esporas de *B. cinerea* 5×10^5 esporas/mL sobre las hojas. Se tomaron fotos representativas de los síntomas desarrollados para cada genotipo.

3.12.1 Extracción de proteínas vegetales

Se extrajeron proteínas solubles de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook *et al.*, 1989), el cual consistió en moler el material vegetal en un mortero previamente enfriado, trabajando a 4 °C con buffer de extracción (Tris 50mM pH 7.2, sacarosa 250mM, EDTA 5mM, MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 1mM, β-mercaptoetanol 10mM y PMSF 1mM). Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C.

Se aisló el sobrenadante y se realizó una centrifugación adicional con las mismas características que la anterior.

3.12.2 Cuantificación de proteínas

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

3.12.3 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

El análisis de proteínas se realizó mediante electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida 12%, siguiendo el método de Laemmli (1970). A las muestras se les agregó buffer de carga 5X (con glicerol 20%, SDS 10%, 0,32% de 2-mercaptoetanol en Tris 0.5 M pH 6.8) y se hirieron durante 5 minutos. Se corrió a voltaje constante y las muestras se visualizaron sumergiendo el gel en una solución 0,1% de *Commasie Brilliant Blue* y desteñido con solución de metanol 40% y 10% acético. Se utilizó el marcador de peso molecular “SeeBlue Pre-Stained” de Invitrogen.

3.12.4 Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Amersham), en una cuba de transferencia Hoefer TE Series-Tank Transphor unit (GE Healthcare, Amersham) en buffer de transferencia (Tris 6,05 g/L, ácido bórico 3,09 g/L; pH 8,3), durante toda la noche a 50 mA. Las proteínas transferidas se tiñeron con el colorante reversible Rojo de Ponceau (0,5% de Ponceau S en ácido acético 5%) para determinar la eficiencia de la transferencia. A continuación, las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en buffer PBS-T (PBS 1X/Tween 20 0,05%, pH 7.4) durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con PBS-T e incubadas con el anticuerpo primario (anti-GFP 1/5000) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas tres veces, 5 minutos cada vez, con buffer PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo secundario de conejo anti-GFP conjugado con HRP (horseradish peroxidase) disuelto en la misma solución (1/10000) (solución madre 0,5 mg/mL en 50% glicerol, Sigma). Luego se hicieron tres lavados de 5 minutos con PBS-T y se reveló con luminol utilizando el kit de la casa comercial Biorad y se detectó con un G:BOX de Syngene.

3.13 Análisis de la expresión génica RNA-Seq

El ARN total se aisló como se describe en la sección 3.5.3. La calidad del ARN fue verificada por Agilent 2100 Bioanalyzer. La construcción de la biblioteca a partir de ARN total y secuenciación de alto rendimiento del transcriptoma de ARN se realizaron por Seqomics.hu (Szeged, Hungría) utilizando la plataforma de secuenciación SOLID 5500 XL (Life Technologies). Basado en el genoma de referencia anotado en el 2011 y los datos de secuenciación, se calcularon los niveles de expresión de genes mediante el programa CLC Genómica Workbench, Szeged Hungría. El enfoque adoptado por el CLC Genómica Workbench se basa en Mortazavi *et al.*, (2008). EL análisis bioinformático también fue realizado por Seqomics.hu y comprendió varios pasos. En primer lugar, todos los genes se extrajeron del genoma de referencia (utilizando anotaciones de tipo gen). También se consideraron otras anotaciones de secuencias génicas (por ejemplo, CDS información sobre secuencias de codificación, etc). A continuación, se extrajeron todos los transcritos anotados (con anotaciones de tipo ARNm). Si existían varias variantes de splicing anotados, todos ellas eran incluidas. Por mayor información

http://www.clcbio.com/index.php?id=1330&manual=RNA_Seq_analysis.html. Para cada gen (asignado por un valor de Phypa) se calculó la diferencia de expresión entre el tratamiento y la condición control (valor de Fold Change). Para los análisis de expresión diferencial se tuvieron en cuenta aquellos genes que tuvieron elevado número de "reads" y RPKM (de, *reads* per kilobase transcript per million mapped *reads*)

3.14 Análisis de los datos

3.14.1 Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

La secuenciación de los distintos vectores generados fue realizada en el Servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos Phytozome (<http://phytozome.net>) y con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El programa MEGA versión 5.05 (Kumar *et al.*, 2001) fue utilizado para editar las secuencias y para hacer los análisis filogenéticos por el método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987), usando la corrección de Poisson en el caso de las secuencias aminoacídicas. Los valores de Bootstrap se calcularon para 1.000 réplicas.

3.14.2 Análisis de expresión génica

La información sobre el patrón de expresión de los genes de *Physcomitrella* se obtuvo de la base de datos Genevestigator (Zimmerman *et al.*, 2004) que engloba un total de 74 experimentos de expresión génica por microarreglos de ADN en distintas situaciones. Esta base de datos permite, luego de ingresar el número de acceso del gen de estudio, hacer una compilación de todos los experimentos en los que aparece dicho gen y los clasifica según tejidos donde se exprese, o

tratamientos de estrés. Esta base de datos posee herramientas para crear ese resultado en forma gráfica y resumida.

3.14.3 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 Identificación de genes de *Physcomitrella* inducidos en respuesta a elicitores de *Pectobacterium carotovorum* sp. *carotovorum*

Dada la importancia agronómica en los últimos años por obtener cultivares resistentes a enfermedades, se ha avanzado mucho en la elucidación de las vías de señalización y la participación de diferentes genes en la respuesta de defensa en plantas vasculares modelo así como en cultivos de interés agronómico. Por el contrario, se sabe muy poco acerca de cómo las primeras plantas terrestres evolucionaron y desarrollaron sus respuestas inmunológicas. Con el objetivo de identificar genes de *Physcomitrella* inducibles por patógenos, hace unos años, nuestro grupo analizó la expresión de un conjunto de 150 genes, cuyos ADNc fueron obtenidos a partir del banco de genes y base de datos Physcobase (<http://moss.nibb.ac.jp>). A su vez, se construyó una biblioteca de cDNA enriquecida en secuencias correspondientes a genes inducidos en respuesta al tratamiento con CF de la cepa SCC1 de *P.c.carotovorum*, utilizando la técnica *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, datos no publicados). A partir de estos resultados, algunos de los genes que mostraron un aumento de expresión en plantas tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y/o inoculadas con esporas de *B. cinerea* con respecto a los controles, fueron analizados individualmente mediante *Northern blot* para determinar su perfil de expresión. Como resultado de estos estudios identificamos varios genes inducibles por estos patógenos incluyendo *LOX*, *CHS*, *PAL* y *PR-1* y varios relacionados con la detoxificación de ROS y reforzamiento de la pared celular (Ponce de León *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012). Si bien este tipo de aproximación nos permitió obtener información novedosa sobre las respuestas que se inducen en *Physcomitrella* en respuesta a los patógenos, la reducción en los costos de los proyectos transcriptómicos, nos alentó en secuenciar el transcriptoma de *Physcomitrella* en respuesta al tratamiento con elicitores de la cepa SCC1 de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. El conocimiento del transcriptoma y su regulación es fundamental para la interpretación articulada de los diversos constituyentes moleculares que integran la red de respuesta génica ante un determinado evento inductor, como los que se presentan en interacciones planta-patógeno. Se seleccionó el CF de *P.c. carotovorum* por ser un tratamiento libre de patógeno y por lo tanto no interfiere con los resultados de transcriptómica. Además, se cuenta con la cepa SCC3193, *harpin* negativa con la cual se pueden hacer estudios comparativos de los perfiles de expresión de genes de interés.

Se secuenció el transcriptoma de plantas tratadas durante 1 día con el CF utilizando RNA-seq y se comparó con el transcriptoma de plantas control sin tratar. Estos estudios se realizaron en colaboración con István Nagy, del *Research Group of Innate Immunity Institute for Plant Genomics, Human Biotechnology and Bioenergy Bay Zoltan Foundation for Applied Research*, Hungría.

Sample	Total no. of sequenced reads	Total no. of mapped reads	Total no. of uniquely mapped reads	Total no. of non specific reads
Control	15 224 096	1 515 612	1 362 771	150 841
SCC1 treatment	16 353 470	1 662 427	1519 032	146 389

Tabla 4. Resumen de los datos transcriptómicos obtenidos con la plataforma SOLID.

El tiempo 1 día de tratamiento fue elegido en base a estudios previos de nuestro grupo donde se evidencian síntomas de enfermedad (amarronamiento y maceración de los tejidos vegetales) a partir de 1 día (Ponce de León *et al.*, 2007). Aproximadamente 15,2 hasta 16,4 millones de lecturas se generaron en cada muestra individual. Una parte importante de las lecturas generadas estaba fragmentada y/o podía ser alineada en varias ubicaciones en el genoma. Este tipo de secuencias fueron excluidas y, en consecuencia, aproximadamente 1,3 a 1.520.000 de lecturas alineadas de forma única fueron retenidas y utilizadas para los posteriores análisis (Tabla 4). Dados los costos en el momento de realizar este estudio (2011), sólo se secuenció una muestra de cada tratamiento. Actualmente los costos han bajado mucho y generalmente la secuenciación se hace con tres muestras independientes para cada tratamiento. El grupo del Dr. Nagy, en base al genoma de referencia disponible en ese momento (v1.1), hizo los análisis preliminares en los cuales asignó a cada gen (representado por un valor de Phypa) un Fold Change (FC) determinado de acuerdo a la cantidad de transcriptos para cada gen que había en las muestras de plantas de *Physcomitrella* tratadas con SCC1 respecto a muestras de plantas control. Valores de FC negativo reflejan que el gen se induce en respuesta al CF de la cepa SCC1 y un valor de FC positivo indica que se acumulan menos transcriptos que en la situación control (represión).

La comunidad científica abocada a la anotación genómica en *Physcomitrella* es muy reducida. En la versión 1.1, la cual fue utilizada para hacer los análisis del transcriptoma, solamente el 40% de los genes tenía alguna anotación del tipo funcional. Con la revisión y reanotación en la versión 1.6 se asignaron funciones a alrededor de 7000 nuevos genes. Esta nueva anotación fue revisada y utilizada para asignar funciones biológicas a los transcriptos que presentaron expresión diferencial entre los dos tratamientos utilizados en este trabajo. Luego de eliminar los genes que presentaban valores absolutos en los perfiles de expresión diferencial menores a 2, se obtuvieron 2430 genes inducidos y 950 reprimidos en respuesta al tratamiento con elicitores de la cepa SCC1. Los genes fueron clasificados en 22 grupos diferentes según su probable categoría funcional. Los resultados de estos análisis se muestran en las Figuras 8 y 9.

Con respecto a los genes reprimidos, un 58% no tiene una función biológica asignada. El 4% de los genes reprimidos codificaría para proteínas involucradas en modificaciones postraduccionales, chaperonas y recambio proteico y el 4% de los genes codificaría para proteínas de señalización.

4.1.1 Identificación y clasificación de genes con posible función en la percepción de *P.c. carotovorum*

La mayoría de las investigaciones centradas en identificar componentes moleculares responsables de la resistencia a patógenos en plantas, se han llevado a cabo en la planta modelo *Arabidopsis* o en otras plantas vasculares como tabaco, arroz y tomate. Como fue descrito anteriormente, en estas plantas, varios MAMPs y sus receptores PRR correspondientes han sido identificados. Las PRRs pertenecen a la gran familia RLK con más de 600 miembros en *Arabidopsis*, más de 1100 en arroz y 157 en *Physcomitrella* (Shiu *et al.*, 2004; Vij *et al.*, 2008). El gran número de genes y la expansión de las familias de este tipo de genes a lo largo de la evolución, indican que es difícil establecer una clara conexión de ortólogos entre especies. Por ejemplo, en *Physcomitrella* no hay claros homólogos de los receptores para FLS2 (péptido de 22 aminoácidos de la flagelina bacteriana) y ERF2 (péptido de 18 aminoácidos del segmento N-terminal del factor de elongación Tu, EF-TU), pero habría un homólogo al receptor CERK1 (de *chitin elicitor receptor kinase 1*) (Lawton y Saidasan, 2009), aunque hasta ahora no se han descrito PRRs funcionales en *Physcomitrella*. Debido a la limitada información sobre genes ortólogos de PRRs en *Physcomitrella*, se procedió a realizar búsquedas en las bases de datos de *Physcomitrella* www.cosmoss.org a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína CERK1 de *Arabidopsis* At3g21630.

A partir de los análisis bioinformáticos, se identificaron tres genes que codifican para proteínas con un dominio proteína quinasa similar a CERK1 de plantas vasculares y además todos se inducen en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* en comparación con muestras control (Tabla 5). Los cambios en los patrones de expresión génica entre las plantas tratadas con SCC1 y plantas control se presentan como FC (*Fold Change*), los cuales pueden presentar valores iguales, mayores o menores a ± 1 . Valores de FC cercanos a ± 1 indican que esos transcritos no modifican su patrón de expresión en respuesta al tratamiento. Valores de FC negativos indican que los genes se inducen en respuesta al tratamiento y valores de FC positivos reflejan que los genes son reprimidos en respuesta al tratamiento.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS +UTRs (nt)	FC
Pp1s54_159V6.1	Phypa_434612	Phypa_125385	54:998721-1003340	2178	-2,4
Pp1s97_212V6.1	Phypa_441038	Phypa_132645	97:1080792-1083891	2277	-2,1
Pp1s41_280V6.1	Phypa_432218	Phypa_122802	41:1924473-1928534	1947	-1,9

Tabla 5 Nombre del transcripto y número de Phypa de CERK putativas a partir del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6 de I. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5'y 3'UTR (de *Unstralated Region*). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

4.1.2 Identificación y clasificación de MAPK: elementos de señalización en la defensa de *Physcomitrella* frente a *P.c. carotovorum*

En eucariotas, la percepción de los PAMPs, tales como la quitina fúngica o la flagelina bacteriana, provocan la inmunidad activada por PAMPs a través de cascadas de MAP quinasas. En este trabajo nos centramos en el análisis de la expresión de las MAP quinasas en *Physcomitrella* en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum*.

El genoma de *Arabidopsis* codifica 10 MAP4K, 80 MAP3K, 10 MAP2Ks y 23 MAPKs (Taj *et al.*, 2010). El número elevado de genes diferentes estaría indicando la existencia de redundancia funcional entre las proteínas codificadas. Recientemente fue publicado un trabajo donde se muestra la relación filogenética de MPKs de diez genomas de plantas, incluyendo *Physcomitrella* (Dóczy *et al.*, 2012). En dicho trabajo indican que el genoma de *Physcomitrella* presenta al menos siete MAP2Ks y ocho MAPKs. Sin embargo, hasta el momento no hay información disponible sobre el número de MAP4K y MAP3Ks que hay en genoma de *Physcomitrella*, y tampoco existe información sobre la funcionalidad de las MAPK putativas.

Debido a la inexistencia de información sobre ortólogos a MAP4K en *Physcomitrella*, se procedió a identificar transcritos en el transcriptoma de *Physcomitrella* que hubieran sido asignados como MAP4K. A su vez, a partir de la secuencia aminoacídica de MAP4K-1 de *Arabidopsis* (At1g53165) se realizaron búsquedas en bases de datos de proteínas de *Physcomitrella* www.cosmoss.org, con la longitud completa y con el dominio conservado de MAP4K de *Arabidopsis*. A partir de los análisis bioinformáticos, se identificaron tres genes que codifican para proteínas similares a MP4Ks de plantas vasculares. En la Tabla 6 se presentan los cambios en los perfiles de expresión de los genes que codifican para las MAP4K putativas en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* en comparación con muestras control.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS +UTRs (nt)	FC
Pp1s98_82V6.1	Phypa_441200	Phypa_132764	98: 441764	2740	-5,1
Pp1s98_82V6.2		Phypa_186825		3034	-1,8
Pp1s59_173V6.2	Phypa_435392	Phypa_182701	59: 899133	2367	-1,2
Pp1s59_173V6.1	Phypa_435393			1824	

Tabla 6. Nombre del transcripto y número de Phypa de MAP4K putativas a partir del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6 de I. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5' y 3'UTR (de *Unstralated Region*). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

El gen ubicado en el "scaffold" 98 da lugar a dos transcritos Phypa_132764 y Phypa_186825, que se inducen en respuesta al tratamiento cinco y casi dos veces, respectivamente. Analizando en más detalle la secuencia nucleotídica de ambos transcritos, se pudo constatar que ambos transcritos son idénticos en los primeros 2740 nucleótidos, y el transcripto Phypa_186825 posee una región 3'UTR con 286 nucleótidos adicionales. Ambos transcritos presentan un sitio blanco para el microARN 477 (Arazi 2012) en la región 5'UTR. El transcripto Phypa_186825, el cual se

acumula menos en respuesta al tratamiento, presenta además un sitio de unión denominado UNR (Chang *et al.*, 2004). Este tipo de sitios regulan la vida media de los transcriptos en el citoplasma.

En la vía de señalización de MAP quinasas las siguientes proteínas involucradas en la transducción de la señal son las MAP3Ks. Hasta el momento no se dispone de información bibliográfica sobre ortólogos a MAP3K en *Physcomitrella*, por lo que se procedió a identificar genes de *Physcomitrella* con homología a los MAP3Ks de plantas vasculares. A partir de la secuencia aminoacídica de MAP3K-1 de Arabidopsis (At4g08500) se realizaron búsquedas en bases de datos de proteínas de *Physcomitrella* www.cosmoss.org, con la longitud completa y con el dominio conservado de MAP3K de Arabidopsis. A partir de los análisis, se identificaron 23 proteínas con motivos MP3Ks de plantas. En la Tabla 7 se presentan los cambios en los perfiles de expresión de los genes que codifican para las 23 MP3K putativas en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* en comparación con muestras control.

Cuatro de los 23 genes analizados, se inducen dos o más veces en respuesta al CF de la cepa SCC1 en comparación con muestras control y 3 genes se inducen 1,8 veces. También aparecen dos transcriptos (Phypa_138872 y Phypa_138889) codificados por dos genes idénticos ubicados en el "scaffold" 151 que se reprimen casi tres veces en respuesta al tratamiento. Analizando más en detalle la secuencia nucleotídica de ambos transcriptos se pudo constatar que en el extremo 3', desde los nucleótidos 2014 a los 2036, poseen una secuencia blanco del microRNA miR899 (Fattash *et al.*, 2007). En plantas vasculares, los ARNs pequeños (microARNs; miARNs) y pequeños ARNs de interferencia (siRNAs) regulan diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Mallory y Vaucheret, 2006), tolerancia al estrés abiótico (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar y Zhu, 2004; Fujii *et al.*, 2005), y respuestas frente a patógenos (Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2002).

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS + UTRs (nt)	FC
Pp1s351_40V6.1	Phypa_458386	Phypa_151978	351:305907- 313865	3657	-5,5
Pp1s188_1V6.1	Phypa_449670			2086	
Pp1s188_1V6.2	Phypa_449669	Phypa_168752	188:40269-44657	2022	-3,5
Pp1s44_113V6.1	Phypa_432829	Phypa_15135	44:713955-719284	3282	-3
Pp1s31_252V6.1	Phypa_429991	Phypa_24585	31:1,375859- 1378153	2295	-3
Pp1s197_93V6.2	Phypa_450375			1724	
Pp1s197_93V6.1	Phypa_450376		197:369237- 373793	1707	
Pp1s197_93V6.3	Phypa_450377	Phypa_4287		1727	-1,8
Pp1s35_323V6.1	Phypa_430970	Phypa_121101	35:1798135- 1801924	2102	-1,8
Pp1s286_14V6.1	Phypa_430970	Phypa_4890	286:170416- 173965	1984	-1,8
Pp1s66_286V6.1	Phypa_436513	Phypa_127611	66:1614907-	4468	-1,3

			1626427		
Pp1s99_12V6.1	Phypa_441350	Phypa_132892		4284	-1,3
Pp1s136_5V6.3	Phypa_445237	Phypa_15847	136:65714-67993	2280	-1,2
Pp1s216_64V6.1	Phypa_451799	Phypa_194424		2391	-1,1
Pp1s131_142V6.1	Phypa_444663	Phypa_85178	131:698259-709469	4577	-1
Pp1s20_383V6.1	Phypa_427351	Phypa_117325	20:2564351-2566517	2167	-1
Pp1s281_44V6.1	Phypa_455555	Phypa_4892	281:189056-191017	1962	0,1
Pp1s100_149V6.1	Phypa_441485	Phypa_132984	100:710362-712481	2120	1
Pp1s414_18V6.1	Phypa_460152		414:217248-222026	2487	
Pp1s414_18V6.2	Phypa_460153	Phypa_1873		2490	1
Pp1s43_178V6.1	Phypa_432670	Phypa_16331	43:1516996-1519062	2067	1
Pp1s10_200V6.2	Phypa_424932		10:1483031-1490556	2954	
Pp1s10_200V6.1	Phypa_424933	Phypa_114546		3070	1,1
Pp1s8_299V6.2	Phypa_424193		8:3097894-3105323	3400	
Pp1s8_299V6.1	Phypa_424194	Phypa_23912		3417	1,2
Pp1s17_36V6.1	Phypa_426821	Phypa_176382	17:133213-134774	1512	1,6
Pp1s151_4V6.1	Phypa_446601	Phypa_138872	151:59066-61527	2040	2,6
Pp1s151_3V6.1	Phypa_446624	Phypa_138889	151:53493-55954	2040	2,9

Tabla 7. Nombre del transcripto y número de Phypa de *PpMAP3K* putativos a partir del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6 de I. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5' y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Las proteínas que se encuentran a continuación corriente debajo de la vía de señalización de MAP quinasas son las MAP2K. El genoma de *Arabidopsis* codifica para 10 MAP2K. A partir de las anotaciones funcionales y estudios bioinformáticas se identificaron siete genes con homología a los *MAP2K* de plantas vasculares y se analizó su perfil de expresión en respuesta al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* (Tabla 8).

Los datos revelan que la expresión de la mayoría de los genes no se ve alterada en respuesta al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum* a excepción del gen Phypa_132044 que se induce 2,5 veces más respecto a su expresión en condiciones control.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS +UTRs (nt)	FC
Pp1s92_27V6.1	Phypa_440456		92:293057-298328	1560	
Pp1s92_27V6.2	Phypa_440457	Phypa_132044		1422	-2,5
Pp1s32_219V6.1	Phypa_430122	Phypa_206232	32:1521060-1524977	1686	-1,3
Pp1s16_334V6.1	Phypa_426577	Phypa_203817	16:2472973-2474496	1524	-1,1
Pp1s50_83V6.1	Phypa_433829		50:837009-840796	2025	
Pp1s50_83V6.2	Phypa_433830	Phypa_181532		2152	-1,1
Pp1s106_83V6.1	Phypa_442149	Phypa_230484	106:495895-	1029	1,2

			498624		
Pp1s151_2V6.1	Phypa_446598	Phypa_59189	151:38932-45647	2147	1,2
Pp1s114_89V6.1	Phypa_442972		114:487526-	1610	
Pp1s114_88V6.1	Phypa_442862	Phypa_106933	492579	1425	1,3

Tabla 8. Nombre del transcripto y número de Phypa de *PpMAP2K* putativos a partir del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6 de l. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5' y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Las MAPK de plantas se denominan comúnmente PERK (de *Plant Extracellular-Regulated kinase*) por su similitud a las MAMPs de la subfamilia ERK de mamíferos. Las PERKs se clasifican en dos subtipos: las que contienen un dominio TEY en el sitio de fosforilación, y las que contienen un dominio TDY. En las MAPKs de plantas no se han identificado homólogos del motivo TGY, ni del motivo TPY que se encuentra en las estructuras primarias de algunas MAPKs de levaduras y mamíferos, (Ichimura *et al.*, 2002). En la actualidad no existe una nomenclatura definida para la clasificación de MAPKs vegetales; sin embargo, una propuesta ampliamente aceptada es la existencia de cuatro subgrupos denominados A, B, C y D (Ichimura *et al.*, 2002). Las MAPKs de los grupos A, B y C contienen una secuencia TEY en el sitio catalítico, mientras que el D comprende la secuencia TDY (Ichimura *et al.*, 2002). Según dicho trabajo el genoma de *Physcomitrella* contiene ocho MPKs putativas, dos pertenecientes al grupo TDY y seis al TEY (Dóczy *et al.*, 2012). A partir de los datos trascríptómicos, se analizó el perfil de expresión de estos genes en respuesta a elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* (Tabla 9). Los resultados indican que dos de las ocho MAPK predichas se inducen dos veces en respuesta al CF de *P.c. carotovorum* comparado con plantas control. En particular, la MAPK perteneciente al grupo D a partir de los análisis filogenéticos realizados por Dóczy *et al.*, 2012, codificada por el gen Phypa_130039, presenta la mayor inducción respecto a la muestra control con un valor de *Fold Change* igual a dos. El gen Phypa_130039 codifica para una proteína deducida de 60.8 kDa que contiene un dominio quinasa conservado y un extremo C-terminal variable. Comparte un nivel de identidad del 82% con la MAPK16 (At1g07640) de *Arabidopsis* (Figura 10).

	Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS+UTRs (nt)	FC
TDY	Pp1s80_71V6.2	Phypa_438802		80: 438428 –	2661	-
	Pp1s80_71V6.1	Phypa_438803	Phypa_130039	443542	2610	2,1
	Pp1s87_157V6.2	Phypa_439697		87: 1153001 –	2422	-
	Pp1s87_157V6.1	Phypa_439698	Phypa_131187	1157659	2393	1,6
TEY	Pp1s59_325V6.1	Phypa_435424	Phypa_126277	59: 1663035 – 1666288	1801	2,0
	Pp1s207_63V6.1	Phypa_451080	Phypa_193902	207: 450742 – 452799	1912	1,7
	Pp1s138_117V6.1	Phypa_167171	Phypa_167171	138: 652015 – 653435	1294	1,3
				149: 142484 –		

Pp1s149_39V6.3	Phypa_446408		146381	2163	
Pp1s29_285V6.1	Phypa_429397	Phypa_105202	29: 2013329 – 2017763	2696	1,1
Pp1s99_26V6.1	Phypa_441310	Phypa_132891	99: 218432 – 222835	2545	1,4

Tabla 9. Nombre del transcripto y número de Phypa de MAPK putativas a partir del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6 de l. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5' y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Phypa_130039	-----MADAEFFTEYGEANRYRIIEVIGKGSYGVVCSAVDTITGKVAIKKINDIFEHVS DATRILREIKLRLRLR	71
AT5G19010	MQPDHRKSSVEVDFEYEGESRYRIIEVIGKGSYGVVCSAVDTITGKVAIKKINDIFEHVS DATRILREIKLRLRLR	80
Phypa_130039	HPDIVEVKHIMLPPSRRFKDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHYQFFLYQLLRALKYIHTANVFHRDLKPKNVLAN	151
AT5G19010	HPDIVEIKHIMLPPSRRFKDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHYQFFLYQLLRALKYIHTANVFHRDLKPKNVLAN	160
Phypa_130039	ADCKLKICDFGLARVAEVDPTAIFWTDYVATRWYRAPELCSFFSKYTPAIDIWSIGCIFAEVLTGKPLFPGKNVVHQI	231
AT5G19010	ADCKLKICDFGLARVAEVDPTAIFWTDYVATRWYRAPELCSFFSKYTPAIDIWSIGCIFAEVLTGKPLFPGKNVVHQI	240
Phypa_130039	DLMTDMLGSPSEITVQRVRNEKARRYLSIMRKKPEMPEVOKFPNADPLAIRLLEEMIAEDPRDRPTAEELADVYFKGLA	311
AT5G19010	DLMTDMLGSPSAPAI GRVRNEKARRYLSIMRKKPEIPRSHKPEHTDPLAIRLLEEMISPEKDRPTAEELADVYFKGLA	320
Phypa_130039	KVDREPSAQEITKMEFEFERRRINKEDVRELIYREILEYHEMLKEYLNGSDNATELYPSAVDQFKRQFALEEHYKNG	390
AT5G19010	KVEREPSAQEVTKMEFEFERRRITKEDVRELIYRESLEYHEMLKEYLDGSEPTNFMYPSAVEHFKRQFALEEHYKNG	400
Phypa_130039	GNNPFLERQHASLPRERVLEFREEASKYQREDSKLHDKHASSGQRNVYSONSSKSDGQSVGRAGN-----FA	457
AT5G19010	SHNPFERQHASLPRACVLYSDNNHVAQSSAEVTDGLSKCSIRDERPRGADRNAQMPMSRIPINVPQTIQGAAVAREG	480
Phypa_130039	AYVG-AKEVTDPRRVSKTASMTTN----SYSGSINPYGRHSSNKITDDEIRELNAVQSKTESMGLGGS---PKVFAAQ	529
AT5G19010	KVVGSVLRINNCGAATGVEALEQQRRMVRNPAASQPKRTPQPKSNRGEEDCATAAEGPSRLKPNTOYIIPKVSAAQD	560
Phypa_130039	VGQ---- 532	
AT5G19010	TAMSRWY 567	

Figura 10. Alineamiento de secuencias aminoacídicas completas del gen Phypa_130039 de *Physcomitrella* identificado con alta homología a una MAPK de *Arabidopsis*. Se utilizó el software Mega versión 5.0 Los guiones indican ausencia de aminoácido en esa posición. El sombreado oscuro indica identidad de secuencia $\geq 95\%$ y el más claro, elevada similitud.

4.1.3 Genes de resistencia implicados en la defensa vegetal

En el momento que se llevó a cabo este estudio sólo existía un trabajo sobre la presencia de genes R en *Physcomitrella* (Akita y Valkonen 2002). Ese estudio fue realizado antes que el genoma fuera secuenciado y por lo tanto probablemente no fue exhaustivo. En base a las anotaciones hasta el momento existentes y búsquedas en la base de datos cosmoss quisimos establecer cuántos genes-R del tipo CC-NB-LRR y cuántos del tipo TIR-NB-LRR existen en *Physcomitrella*. Esto se hizo mediante la ejecución de búsquedas en las bases BLASTp con secuencia de aminoácidos de los aproximadamente 83 TIR-NB-LRR genes y 51 genes en CC-NB-LRR de *Arabidopsis* (Meyers *et al.*, 2003) contra las bases de datos de secuencias de proteínas de *Physcomitrella* en www.cosmoss.org. Muchas de las secuencias identificadas contenían sólo una parte intacta del gen R, por ejemplo genes que codificaban para proteínas con CC-NB y ningún dominio LRR o simplemente los dominios NB-LRR. En este trabajo estamos interesados en identificar genes homólogos a genes R que pudieran funcionar en la inmunidad innata de *Physcomitrella* como lo hacen en las plantas vasculares. Se realizaron búsquedas en las bases de datos y se identificaron seis genes R que codifican para proteínas con dominios CC-NB-LRR y tres que codifican proteínas

con dominios TIR- NB-LRR. Además de las clásicas proteínas con dominios CC y TIR, Xue *et al.*, (2012) identificaron en el genoma de *Physcomitrella* genes que codifican para proteínas que presentan un dominio quinasa (PK) en el extremo N-terminal (PK-NB-LRR). Los autores no reportaron los nombres completos de los genes por lo que la búsqueda se realizó en base a dominios conservados y análisis de las anotaciones funcionales realizadas hasta el momento. Se pudieron identificar siete genes que codifican para proteínas con un dominio PK en el extremo N terminal además de los dominios NB y LRR característicos de las proteínas R.

Se analizó el perfil de expresión de cada uno de los genes identificados en este trabajo en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* (Tabla 10). El análisis de los datos obtenidos revela que no todos los genes tienen un patrón de expresión diferencial en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum*. Entre los genes con homología a los genes R clásicos de plantas vasculares, existen dos cuyos transcritos Phypa_37087 y Phypa_48412 presentan una inducción de 3 veces y 2,7 veces, respectivamente. Para los genes que codifican para proteínas R putativas con dominio PK, se identificó el gen Phypa_116752 que se induce 2,2 veces respecto a las condiciones control.

Domain	Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	FC
CC-NB-LRR	Pp1s1_238V6.1	Phypa_422217	Phypa_37087	3367	-3,0
	Pp1s327_16V6.1	Phypa_457568	Phypa_151076	3033	-2,2
	Pp1s1_324V6.1	Phypa_422070	Phypa_111259	3057	-1,1
	Pp1s1_336V6.1	Phypa_421825	Phypa_110794	3455	1,1
	Pp1s1_321V6.1	Phypa_421942	Phypa_111146	3018	-1,1
	Pp1s1_327V6.1	Phypa_421845	Phypa_110967	3024	1,1
TIR-NB-LRR	Pp1s231_60V6.1	Phypa_452798	Phypa_48412	3840	-2,7
	Pp1s210_15V6.1	Phypa_451377	Phypa_169462	3571	-1,6
	Pp1s162_170V6.1	Phypa_447601	Phypa_140033	4064	1,1
PK-NB-LRR	Pp1s17_234V6.1	Phypa_426777	Phypa_116752	5376	-2,2
	Pp1s783_2V6.1	Phypa_461656	Phypa_157249	4476	-1,9
	Pp1s95_7V6.1	Phypa_440689	Phypa_132267	3927	-1,7
	Pp1s113_185V6.1	Phypa_442823	Phypa_134549, Phypa_215265	6827	-1,2
	Pp1s180_101V6.1	Phypa_449101	Phypa_192469	4845	-1,2
	Pp1s96_245V6.1	Phypa_440888	Phypa_132491	4375	1,0
	Pp1s107_130V6.1	Phypa_442232	Phypa_187567	5109	1,2

Tabla 10. Nombre del transcritto y número de Phypa de proteínas R putativas a partir del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5' y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

A continuación se procedió a comparar los datos obtenidos por RNA-seq para este grupo de genes con los obtenidos por microarreglos de ADN en respuesta al tratamiento con una suspensión de esporas de *B. cinerea* y que está disponible en la base de datos Genevestigator. Los datos de

expresión obtenidos mediante microarreglos no revelaron diferencias significativas entre las muestras tratadas y los controles (datos no presentados). Esto se puede deber a una menor sensibilidad que presenta esta técnica respecto a RNA-seq o que estos genes no estén involucrados en la respuesta de defensa que se desencadena frente al ataque de *B. cinerea*.

4.1.4 Genes implicados en la detoxificación de ROS y reforzamiento de la pared celular

4.1.4.1 Detoxificación de ROS

La producción de ROS puede contribuir a la defensa vegetal ya sea directamente como agentes con actividad antimicrobiana o indirectamente mediante la promoción del entrecruzamiento de la pared celular (Apel y Hirt, 2004). Las ROS también pueden actuar como segundos mensajeros, ya sea directamente en forma de H_2O_2 , o indirectamente oxidando ácidos grasos poliinsaturados que pueden actuar como mensajeros secundarios para disparar las respuestas de defensa (Forman *et al.*, 2010; Vellosillo *et al.*, 2010.).

La producción de ROS en *Physcomitrella* en respuesta a elicitores bacterianos se visualizó por tinción con diaminobenzidina (DAB) para detectar H_2O_2 y azul de nitro-tetrazolio (NBT) para detectar la producción de anión superóxido, a las 24 horas post tratamiento como se describe en la sección 3.11.3 de Materiales y Métodos (Figura 11). Para este estudio se utilizaron los CF de las cepas SCC1 y SCC3193 de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*, respectivamente. Las colonias tratadas con SCC1 se tiñeron más con DAB y NBT, lo que indica una mayor acumulación de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ en respuesta al CF de la cepa SCC1 respecto a la cepa SCC3193 y el tratamiento control (H_2O).

Las plantas cuentan con enzimas detoxificantes que catalizan la degradación rápida de las ROS. Estas enzimas involucran superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y un gran número de peroxidasas reductoras del H_2O_2 . También presentan antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, el ascorbato, los carotenoides, los flavonoides, el tocoferol, los ácidos ureico y lipoico, varios aminoácidos, poliaminas, y una variedad de compuestos fenólicos que también cumplen un rol importante en la red de antioxidantes que protegen a las células del estrés (Shannon *et al.*, 1966; Larson, 1988; Navrot *et al.*, 2006). A partir de los datos transcriptómicos, se analizaron los patrones de expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes o proteínas involucradas en la síntesis de compuestos con capacidad antioxidante y a continuación se describen las familias génicas que presentaron mayor relevancia.

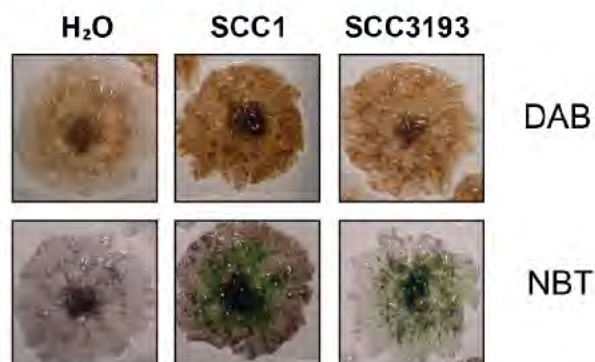


Figure 11. Acumulación de ROS en tejidos de *Physcomitrella*. Tinción con DAB y NBT de colonias de *Physcomitrella* tratadas durante 24 horas con LB (Ctl) y los CF de las cepas SCC1 y SCC3193 de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*, respectivamente.

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la dismutación de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Hay distintos tipos de SOD clasificados en base al cofactor metálico: las isoformas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. Tiene un papel central en la defensa contra el estrés oxidativo, tanto es así que distintos estudios han demostrado que la modificación en la expresión de SOD en plantas transgénicas puede mejorar la tolerancia a dicho estrés (Gupta *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2007).

En 2013, Higashi *et al.*, identificaron mediante análisis bioinformáticas ocho isozimas SOD en el genoma de *Physcomitrella*, cuatro CuZn-SOD, tres Fe-SOD y una Mn-SOD. Tomando como base ese estudio y teniendo los valores de Phypa para cada uno de estos genes, en este trabajo se analizaron las diferencias en los perfiles de expresión en respuesta al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* respecto a muestras control (Tabla 11). Los resultados muestran que solamente dos de los genes, Phypa_85183 y Phypa_141133, muestran una inducción cercana a dos veces en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* con respecto a plantas control.

Type	Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+ UTRs (nt)	Loc	FC
CuZn-SOD	Pp1s131_71V6.3	Phypa_444717	Phypa_63006	1029	chl	-1,5
	Pp1s131_153V6.1	Phypa_444705	Phypa_85183	1342	chl	-1,9
	Pp1s44_277V6.1	Phypa_432763	Phypa_162557	474	cyt	-1,6
	Pp1s18_84V6.1	Phypa_426973	Phypa_176592	839	cyt	-1,3
Fe-SOD	Pp1s2_451V6.1	Phypa_422433	Phypa_26510	1320	apo	1,1
	Pp1s22_320V6.1	Phypa_427906	Phypa_105032	1441	chl	-1,7
	Pp1s98_114V6.1	Phypa_441145	Phypa_165889	840	Ψ	-1,4
Mn-SOD	Pp1s174_60V6.1	Phypa_448633	Phypa_141133	999	Mit	-1,9

Tabla 11. Nombre del transcripto y número de Phypa de las SOD putativas identificadas por Higashi *et al.*, 2013, en la versión v1.1 y v1.6 del genoma de *Physcomitrella*. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regions reguladoras 5' y 3'UTR (de Unstralated Region). Loc: localización subcelular predicha con los programas TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) y ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) Chl: cloroplasto, Cyt:citosol Apo: apoplasto, Ψ:pseudogen, Mit: mitocondrial FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Otro grupo de enzimas importantes en la detoxificación de ROS son las catalasas, enzimas capaces de detoxificar el H₂O₂. Al momento de realizar este trabajo se desconocía cuantos genes de catalasas existen en el genoma de *Physcomitrella*. Se hicieron búsquedas en la base de datos cosmos.org utilizando las secuencias de los genes ortólogos que codifican para catalasas en *Arabidopsis*, identificándose seis genes con similitud de secuencia con catalasas (Tabla 12). El análisis de la abundancia relativa de los transcritos de estos genes indicó que estos difieren entre sí en cuanto a su respuesta frente al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum*. El gen Phypa_223469 presenta los niveles de inducción más altos en respuesta al tratamiento, con valores nueve veces mayores respecto a plantas sin tratar.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	Loc	FC
Pp1s259_126V6.1	Phypa_454438	Phypa_223469	1865	prx	-9,4
Pp1s422_8V6.3	Phypa_460254	Phypa_227480	1878	prx	-1,6
Pp1s422_8V6.1	Phypa_460253		2017		
Pp1s422_8V6.2	Phypa_460252		1888		
Pp1s3_353V6.2	Phypa_422906	Phypa_64727	1872	cit	-1,7
Pp1s3_353V6.1	Phypa_422905		1993		
Pp1s292_18V6.1	Phypa_456110	Phypa_197372	2270	per	-0,5
Pp1s223_74V6.1	Phypa_92315	Phypa_92315	1542	Nuc	-0,4
Pp1s3_465V6.1	Phypa_423018	Phypa_112228	1872	Nuc	4,4

Tabla 12. Nombre del transcripto y número de Phypa de las catalasas putativas identificadas en la versión v1.1 y v1.6 del genoma de *Physcomitrella*. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regions reguladoras 5'y 3'UTR (de Unstralated Region). Loc: localización subcelular predicha con los programas TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) y ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) prx:peroxisoma, xti: citosol; nuc: nuclear. FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de estos genes, se realizaron ensayos de *Northern blot* utilizando muestras de ARN extraído a distintos tiempos, como se describe en la secciones 3.5.6 y 3.5.3 de Materiales y Métodos. En esta primera instancia se analizó la expresión del gen Phypa_64727 (*PpCAT*), del cual ya contábamos con el clon que contiene la secuencia, y se muestra en la Figura 12.

Los resultados indican que el gen *PpCAT* presenta un nivel de expresión basal, el cual aumenta con el tratamiento con los CFs y que además el patrón de acumulación del ARNm difiere, dependiendo del CF utilizado. La inducción del gen Phypa_64727 en colonias tratadas con el CF de la cepa SCC1 tiene un pico de acumulación a las 2 horas del tratamiento, seguido de un descenso progresivo en el tiempo para volver a aumentar hasta llegar a los niveles basales a las 24 horas post tratamiento. Probablemente por ese perfil de expresión no se vieron grandes cambios en el transcriptoma que fue secuenciado a un día post tratamiento. El tratamiento con el CF de la cepa SCC3193 también induce la expresión del gen *PpCAT*, aunque los niveles de acumulación de los transcritos alcanzados son menores que los observados con la cepa SCC1.

En plantas vasculares, el incremento en los niveles de H_2O_2 contribuye a reforzar la estructura de la pared celular mediada por la acción de peroxidadas (PRX). Las peroxidadas están relacionadas con la defensa vegetal, actuando en el fortalecimiento de la pared celular (Agrios, 2005; De Ascensão y Dubery, 2003), y algunos estudios han demostrado su interferencia con el crecimiento y desarrollo del patógeno (Nicholson y Hammerschmidt 1992; Dellanoy *et al.*, 2004). Además, las peroxidadas pueden prevenir ataques químicos y biológicos levantando barreras físicas o contraatacando al patógeno con una alta producción de radicales libres (Passardi *et al.*, 2005). Por ejemplo en variedades resistentes de vid, no sólo existe una actividad basal más alta de estas enzimas, sino también un aumento rápido de su actividad después de la inoculación del patógeno (Kortekamp y Zyprian, 2003). Lethonen *et al.* (2009 y 2012) encontraron que la peroxidada de clase III PpPRX34 (Phypa_144797) es esencial para disparar el estallido oxidativo en *Physcomitrella*. El mutante "knockout" *Ppprx34* es más susceptible a hongos saprofitos y necrótrofos en comparación con las plantas salvajes (Lethonen *et al.*, 2012). Resultados similares se obtuvieron con líneas knockout por inserción por T-DNA en dos genes para peroxidadas apoplásticas de *Arabidopsis* *Atrpx33* and *Atrpx34*. Estos genotipos presentaron niveles bajos de acumulación de ROS así como poca deposición de calosa en respuesta a los PAMPs flg22 y elf26 (Daudi *et al.*, 2012).

En este trabajo se procedió a identificar genes en el genoma de *Physcomitrella* que codificarían para peroxidadas y luego se evaluó el patrón de expresión de dichos genes en respuesta a elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*. En la Tabla 13 se presenta información sobre cuatro genes que codifican para peroxidadas putativas, de los cuales tres se indujeron de 1,9 a 2,4 veces en respuesta a elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* comparado con plantas control. El gen Phypa_125385 es el que presenta los mayores niveles de inducción en respuesta al CF de SCC1. El gen Phypa_144797 descrito por Lethonen *et al.*, 2012 presentó una leve inducción en respuesta al tratamiento con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*.

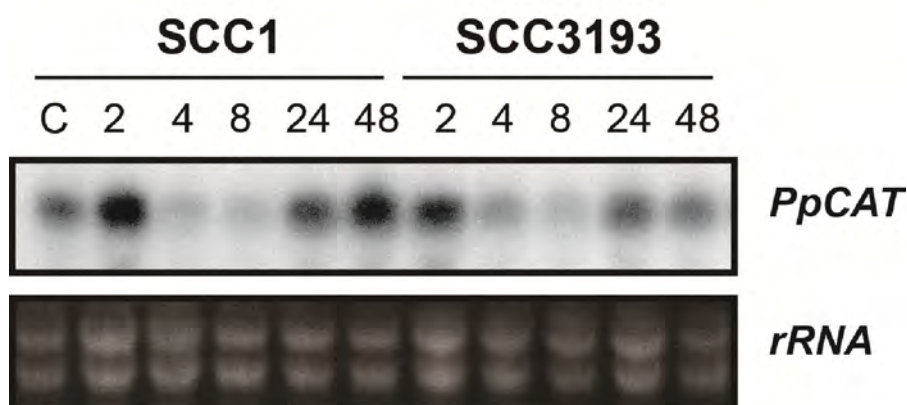


Figura 12. Análisis de la expresión del gen *PpCAT* en respuesta a patógenos. Se aislaron los ARN a los tiempos indicados de colonias crecidas sobre celofán inoculadas con el CF de *P.c. carotovorum* de la cepa SCC1 y *P. wasabiae* SCC3193. C: LB como control del tratamiento. RNAr: ARN ribosomal como control de carga.

4.1.4.2 Reforzamiento de la pared celular

La pared celular es un importante elemento estructural de la planta que se compone de una matriz ordenada principalmente de polisacáridos, incluyendo celulosa, hemicelulosa y pectinas, las cuales desempeñan un papel importante en la defensa de las plantas frente a patógenos. La mayoría de los microorganismos fitopatógenos secretan enzimas que degradan la pared celular (PCWDE), incluyendo celulasas, proteasas y pectinasas, capaces de despolimerizar los polisacáridos de la pared celular vegetal. Las plantas han desarrollado una batería de respuestas de defensa para contrarrestar la degradación de la pared celular, incluyendo la síntesis de inhibidores de estas enzimas. Estos incluyen inhibidores de enzimas que degradan pectina (poligalacturonasas, pectinesterasas y pectina liasas), y de enzimas que degradan la hemicelulosa, tales como endoxilanasas y xiloglucano endoglucanasas (De Lorenzo 1997).

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	Gene location Scaffold:base	FC
Pp1s54_159V6.1	Phypa_434612	Phypa_125385	2178	54:998721-1003340	-2,4
Pp1s97_212V6.1	Phypa_441038	Phypa_132645	2277	97:1080792-1083891	-2,1
Pp1s41_280V6.1	Phypa_432218	Phypa_122802	1947	41:1924473-1928534	-1,9
Pp1s219_8V6.1	Phypa_451978	Phypa_144797	1547	219:45362-47267	-1,4

Tabla 13. Nombre del transcripto y número de Phypa de genes que codifican para PRX putativas identificadas en la versión v1.1 y v1.6 del genoma de *Physcomitrella*. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5'y 3'UTR (de Unstralated Region). Loc: localización subcelular predicha con los programas TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) y ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999), FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Otra de las familias génicas analizadas en este trabajo fue la que codifica para las enzimas pectina metil esterases (PME). Este tipo de proteínas cumplen un rol en la defensa frente a patógenos, puesto que la metil esterificación de la pectina de la pared celular de las plantas, vuelve a la pectina menos susceptible de hidrólisis por parte de enzimas pécticas de los patógenos bacterianos o fúngicos (Lionetti *et al.*, 2012). La búsqueda de genes que codican PMEs en el genoma de *Physcomitrella*, utilizando genes ortólogos de *Arabidopsis* permitió la identificación de seis genes, que en nuestros estudios de expresión, presentaron un valor de Fold Change mayor o igual a dos (Tabla 14). El gen Phypa_150987 presenta los niveles de inducción más altos en respuesta al tratamiento, con valores casi cuatro veces mayores respecto al perfil de expresión de dicho gen en las plantas controles.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS+ UTRs (nt)	FC
Pp1s325_49V6.1	Phypa_457512	Phypa_150987	325:253584-255195	1146	-3,6
Pp1s33_21V6.1	Phypa_430330	Phypa_31765	33:170202-173752	2898	-2,4
Pp1s378_15V6.1	Phypa_459254	Phypa_152856	378:84023-386564	2408	-2,4
Pp1s26_42V6.1	Phypa_428705	Phypa_118762	26:371210-373529	1896	-2,3
Pp1s112_175V6.1	Phypa_442656	Phypa_134522	112:827191-828998	1155	-2,2
Pp1s382_22V6.1	Phypa_459368	Phypa_152977	382:194975-198559	2769	-2,0

Tabla 14. Nombre del transcripto y número de Phypa de genes que codifican para PME putativas identificadas en la versión v1.1 y v1.6 del genoma de *Physcomitrella*. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5' y 3'UTR (de Unstralated Region). Loc: localización subcelular predicha con los programas TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) y ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999), FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

En estudios previos de nuestro grupo, se identificó un gen (Phypa_110421) que codifica una proteína putativa *Dirigent-like* (DIR) (PpDIR) en una biblioteca de ADNc obtenida mediante la técnica SSH, a partir de tejidos de *Physcomitrella* tratados con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* (Ponce de León *et al.*, 2012). Las proteínas DIR son importantes para mediar el acoplamiento de radicales libres de fenoles vegetales tales como el monolignol para producir los polímeros de la pared celular como lignanos y ligninas (Davin *et al.*, 2000). La proteína PpDIR tiene un 25,7 y el 32,4% de identidad con su homólogo de *Arabidopsis* (Theologis *et al.*, 2000) y arroz (Yu *et al.*, 2005), respectivamente (Figura 13).

```

PpDIR -----MAISAAAYTLGVVLCICSFOTSVFAASK---PLKLTYYAHETR-GGPN---ATLLPAAGTGO 55
OsDIR -----MAPSLAPRLAVPELLIVLAAAAAADGVADAGAGAGMTHLHEFFHEVFTAGPNGTTATVAPPEARSGD 66
AtDIR MLQITNMATPFLLLLLLLELIFSTVLLLTITITVQSKPYSKTTFPQGNKPKLTHLHFYFHDIIISGDKP---TIRVAEAPGT 77

PpDIR GNEFALGWSFLVFDNGLREGAALDSKLLGRITCFGAISTVGGG-ATGGVQVTSKWFEGDCKYKCGSSFTVVGTLSTYGP 134
OsDIR C--SSLGFGV--VVDDMLREGADPASRLVGRAGQVTAAGTSLAAADGAGAITTMLSALFTEEGPYAGSTLQVFGRAVIG-T 141
AtDIR N--SATVFCAVLIIVDAPVTEGPELSSKEVGRAGQGLYASTDMKTF----GFTMVFNEVFTEG-EFNGSTAALYGRNPILLE 151

PpDIR PWELVVIGGTGKFRGYSGYGLAQPENSTTVPPPIYVKNKWFYLLTKK-- 179
OsDIR VMERPVVGGTGKFRMARGHTLSRRVNSSDEDNLLVIEYDAYVTTSP 188
AtDIR ERELPIIGGTGDFRFARGYALPKTYKVVNID--AVVEYNVFIWH--- 193

```

Figura 13. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas de genes identificados con alta homología a DIR en arroz, *Physcomitrella*, *Arabidopsis*. Se utilizó el software Mega versión 5.0. Los guiones indican ausencia de aminoácido en esa posición. El sombreado oscuro indica identidad de secuencia $\geq 95\%$.

Una búsqueda en la secuencia completa del genoma de *Physcomitrella* (versión 1.6) en la base de datos pública Phytozome v9.1 base de datos pública (www.phytozome.net) (Goodstein *et al.*, 2012), reveló la existencia de al menos 9 genes que codifican para proteínas *DIR-like*. Una lista de

los genes *DIR*-like de *Physcomitrella*, y sus niveles de expresión en respuesta a elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* se muestran en la Tabla 15.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	FC
Pp1s252_11V6.1	Phypa_454096	Phypa_110421	252:66635- 68003	-2.6
Pp1s252_2V6.1	Phypa_454111	Phypa_170601	252:40343- 42189	-1.3
Pp1s23_51V6.1	Phypa_428179	Phypa_48771	23:387282 – 388692	-1.1
Pp1s104_69V6.1	Phypa_441878	Phypa_166166	104:506510 – 508265	-1.7
Pp1s69_107V6.1	Phypa_437147	Phypa_78106	69:655964 – 657185	0.1
Pp1s114_204V6.1	Phypa_443016	Phypa_83579	114:1206366-1206957	-2.5
Pp1s279_53V6.1	Phypa_455453	Phypa_196945	279: 221702 - 22217	1.1
Pp1s360_13V6.1	Phypa_458747	Phypa_152320	360: 158624 - 160463	1.1
Pp1s5_200V6.1	Phypa_423457	Phypa_27453	5: 1391259 - 1391789	-1,1

Tabla 15. Nombre del transcripto y número de Phypa de genes *PpDIR*-like en la base de datos Phytozome del genoma de *Physcomitrella* versión v1.1 y v1.6. Los Valores de scaffolds representan la posición genómica de los genes. FC: Fold Chage, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Los genes Phypa_110421 y Phypa_170601 se ubican en el "scaffold" 252 y codifican para proteínas 100% idénticas. El gen Phypa_48771 está ubicado en el scaffold 23 y comparte 82% de identidad con los genes Phypa_110421 y Phypa_170601 (Figura 14).

La gran mayoría de los genes analizados no presentan cambios significativos en el perfil de expresión a diferencia de los genes Phypa_110421 y Phypa_83579 que se inducen alrededor de tres veces. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en la biblioteca SSH donde se identificó un clon con homología al gen Phypa_110421, como un gen expresado diferencialmente (Ponce de León *et al.*, 2012).

```

Phypa_110421 MAISAAAYTLCVVLICISFQTSVFAAS-KPLKLYYAHETRGGPNATLLPAAGTGQGNFSALGWGSFLVFDNGLKEGAAL
79
Phypa_170621 MAISAAAYTLCVVLICISFQTSVFAAS-KPLKLYYAHETRGGPNATLLPAAGTGQGNFSALGWGSFLVFDNGLKEGAAL 79
Phypa_48771 MAISAAAYTLCVVLICISLQLLVAGAGPETLKLTYAHETRGGPNATLLPAAGTGQGNFSALGWGSFLVFDNGLKEGAAL 80

Phypa_110421 DSKLLGRITGFGAISTVGGSATGGVQVTSKFWFGDGSKYPGSSFTVVGTLVSYGTPWELVVIIGGTGKFRGYSYGLAQPE 159
Phypa_170621 DSKLLGRITGFGAISTVGGSATGGVQVTSKFWFGDGSKYPGSSFTVVGTLVSYGTPWELVVIIGGTGKFRGYSYGLAQPE 159
Phypa_48771 DSKLLGRITGSGALTIIGGLPETGGVQVTSKFWFGDGSKYPGSSFTVVGTLVSYGTPWELVVIIGGTGKFRGYSYGLAQPE 160

Phypa_110421 NSTTVPPPIYVKNWNYLTKK- 179
Phypa_170621 NSTTVPPPIYVKNWNYLTKK- 179
Phypa_48771 NSTTVPPPIYVKNWNYLTKKHF 181

```

Figura 14. Alineamiento de las secuencias aminoácidas completas de genes identificados con alta homología a *DIR* en *Physcomitrella*. Se utilizó el software Mega versión 5.0 Los guiones indican ausencia de aminoácido en esa posición. El sombreado oscuro indica identidad de secuencia $\geq 95\%$ y el más claro, elevada similitud.

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión temporal de este gen, se realizaron ensayos de *Northern blot* (Figura 15). Se extrajo el ARN total a partir de colonias crecidas sobre celofán, tratadas con los CFs de las cepas SCC1 y SCC3193 de las bacterias *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*, respectivamente. Debido a que el fragmento de ADNc de *PpDIR* utilizado como sonda (Phypa_110421) muestra una alta identidad con los transcritos Phypa_170601 y Phypa_48771 (81,1%-96,7%, respectivamente), los resultados obtenidos por *Northern blot* podrían estar evidenciando la expresión de los tres genes simultáneamente.

Los resultados indican que el gen *PpDIR* no presenta un nivel de expresión basal detectable por esta técnica, y aumenta con el tratamiento con los CFs y que además el patrón de acumulación del ARNm difiere, dependiendo del CF utilizado. La inducción del gen *PpDIR* en colonias tratadas con el CF de la cepa SCC1 tiene un pico de acumulación mayor a las cuatro horas del tratamiento, seguido de un descenso a las 24 horas post tratamiento. El tratamiento con el CF de la cepa SCC3193 también induce la expresión del gen aunque los niveles de acumulación de los transcritos alcanzados son menores que los observados con la cepa SCC1.

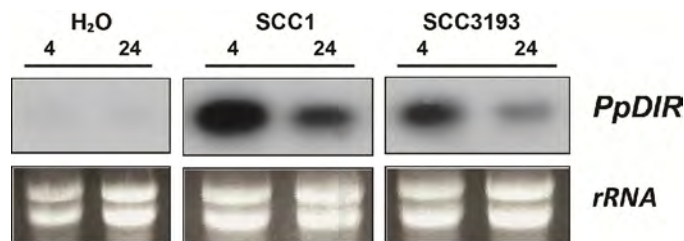


Figura 15. Análisis de la expresión del gen *PpDIR* en respuesta a patógenos. Se aislaron los ARN a los tiempos indicados de colonias crecidas sobre celofán inoculadas con el CF de *P.c. carotovorum* de la cepa SCC1 y *P. wasabiae* SCC3193. C: LB como control del tratamiento. RNAR: ARN ribosomal como control de carga.

Se decidió utilizar la herramienta informática GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) para extraer de las bases de datos información sobre la expresión de los genes homólogos a *PpDIR* de *Physcomitrella* en respuesta a *B. cinerea* y dos diferentes condiciones de crecimiento y estrés (oscuridad y exceso de luz), basada en el análisis de microarreglos de ADN. Al introducir el gen de estudio, en la base de datos, el motor de búsqueda del programa hace una compilación de todos los experimentos en los que aparece dicho gen y los clasifica según tejidos donde se exprese, o tratamientos de estrés. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 16. Se debe tener en cuenta que los datos de expresión presentados en dicha figura, para cada tipo de muestra biológica y para cada gen, son el promedio de un conjunto de análisis independientes realizados por diferentes grupos de investigación.

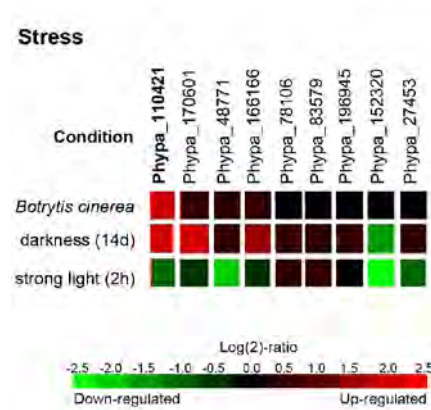


Figura 16. Patrón de expresión de genes homólogos a *PpDIR* en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Los genes se han ordenado según sus relaciones filogenéticas. Los que se muestran en la figura son los que pasaron la selección de tener un Fold Change mayor a 1.5 entre las dos condiciones evaluadas y un p-value mayor a 0.05.

Se observan claramente diferencias en los perfiles de expresión de los distintos genes *DIR-like* en respuesta a las distintas condiciones de estrés. Los genes Phypa_110421, Phypa_170601, que están emparentados entre sí según el análisis filogenético presentan un patrón de expresión similar, aumentando su expresión en respuesta a *B. cinerea* y oscuridad. Los resultados por microarreglos concuerdan con estudios previos realizados por nuestro grupo, donde observamos mediante análisis por *Northern blot* que el gen Phypa_110421 aumenta su expresión en respuesta a *B. cinerea* (Ponce de León *et al.*, 2012). El gen Phypa_48771 que también está emparentado filogenéticamente a los genes Phypa_110421 y Phypa_170601 no presenta un perfil de expresión similar a estos dos últimos. Para el resto de los genes *DIR-like*, los mismos no varían su expresión en respuesta a *B. cinerea*. Los resultados de los perfiles de expresión de los genes *PpDIR-like* en respuesta a *B. cinerea* obtenidos por microarreglos son similares a los obtenidos en respuesta a los elicitores de *P.c. carotovorum* lo que sugiere la participación de estos genes *DIR-like* en la respuesta de defensa a ambos patógenos. A pesar de que los genes Phypa_110421, Phypa_170601 y Phypa_48771 comparten un elevado porcentaje de identidad a nivel de las secuencias codificantes, los perfiles de expresión son muy diferentes lo que sugiere diferencias a nivel de sus regiones promotoras.

La calosa se ha detectado en musgos, incluyendo *Physcomitrella*, utilizando procedimientos de tinción con azul de anilina (Scherp *et al.*, 2001; Tang, 2007; Schuette *et al.*, 2009) y CoMPP (de *Comprehensive Microarray Polymer Profiling*) (Moller *et al.*, 2007). Al igual que en otras plantas y algas, la deposición de calosa en *Physcomitrella* participa en los procesos normales del desarrollo, incluyendo la citoquinesis (Scherp *et al.*, 2001) y la formación de esporas (Schuette *et al.*, 2009). A su vez, la calosa también se forma y se deposita en respuesta a heridas (Abel *et al.*, 1989; Scherp *et al.*, 2001; Tang 2007), así como en respuesta al ataque con el oomycete *Phytophthora irregularis* (Castro *et al.*, 2009). El genoma de *Physcomitrella* contiene 12 genes que codifican para calosa sintetasas putativas (Schuette *et al.*, 2009) para los cuales se analizó el perfil de expresión en respuesta al tratamiento con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* (Tabla 16). De los 12

genes, solamente tres de ellos se inducen con valores de FC menores o iguales a -1.5. En el caso del gen Phypa_127776 el aumento de expresión en respuesta a elicitores es de 2,5 veces comparado con plantas control. La proteína codificada por *PpCaIS5*, con un FC de -1,5, es ortóloga a AtCalS5 con dominios muy conservados y un 64% de similitud a nivel de secuencia aminoacídica. La función de este gen en respuesta a patógenos ha sido evidenciada mediante el estudio de genotipos de *Arabidopsis*, que presentaron mutaciones nulas en ese gen. Esas líneas mutantes (cal5) presentan una alteración en la deposición de calosa que resulta en un aumento en la susceptibilidad al hongo *Blumeria* (Jacobs *et al.*, 2003).

Gene name	Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	FC
Pp_CalS1	Pp1s145_49V6.1	Phypa_446061	Phypa_190367	6721	-1,7
Pp_CalS2	Pp1s40_185V6.1	Phypa_432044	Phypa_207622	743	-
	Pp1s40_186V6.2	Phypa_432070		3972	
	Pp1s40_186V6.1	Phypa_432016		1275	
Pp_CalS3	Pp1s18_300V6.2	Phypa_427055	Phypa_117054	3589	-1,3
	Pp1s18_300V6.1	Phypa_427003		2667	
Pp_CalS4	Pp1s67_70V6.1	Phypa_436681	Phypa_127776	5397	-2,5
	Pp1s67_71V6.1	Phypa_436772		531	
Pp_CalS5	Pp1s199_13V6.1	Phypa_450581	Phypa_143195	5814	-1,5
Pp_CalS6	Pp1s160_88V6.1	Phypa_447423	Phypa_139798	6248	-1,1
Pp_CalS7	Pp1s88_137V6.2	Phypa_439907	Phypa_185944	535	1,5
	Pp1s88_137V6.1	Phypa_439854		600	
	Pp1s88_136V6.1	Phypa_439885		5890	
Pp_CalS8	Pp1s67_234V6.1	Phypa_436789	Phypa_183682	6351	1,3
Pp_CalS9	Pp1s13_132V6.1	Phypa_425505	Phypa_115455	5988	1,0
Pp_CalS10	Pp1s379_24V6.1	Phypa_459280,	Phypa_199665	4911	1,2
	Pp1s379_25V6.1	Phypa_459262		884	
Pp_CalS11	Pp1s66_72V6.1	Phypa_436633	Phypa_183499	6133	1,2
Pp_CalS12	Pp1s13_432V6.1	Phypa_425661	Phypa_175718	6114	1,1

Tabla 16. Nombre del transcripto y número de Phypa de los 12 genes *PpCaIS* de *Physcomitrella* identificadas previamente por Schuette *et al.*, 2009 versión v1.1 y v1.6. Los Valores de scaffold representan la posición genómica de los genes. FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control. Valores de Fold change negativos indican que los genes se inducen en respuesta al CF de SCC1 de *P.c.carotovorum*.

La inducción de genes involucrados en la síntesis de calosa se correlaciona con resultados previos obtenidos por nuestro grupo que indican que elicitores de las cepas *P.c. carotovorum* inducen fortificación de la pared celular en los tejidos de *Physcomitrella*, evidenciadas por la incorporación de compuestos fenólicos y deposición de calosa (Figura 7, Introducción).

4.1.5 Genes involucrados en la síntesis y señalización de hormonas implicadas en la defensa vegetal

En plantas vasculares, la señal del patógeno es percibida y amplificada a través de la acumulación de moléculas señales de la planta, entre las cuales están las hormonas SA, ET y JA (Yang *et al.*, 1997). En los últimos años, varios trabajos implican a otras hormonas, además de las tres ya

mencionadas, en las respuestas de la planta frente al ataque del patógeno; bien favoreciendo la resistencia o bien la susceptibilidad. Es el caso del ABA (Ton *et al.*, 2009), las citoquininas (CK, de Cytokinins; Choi *et al.*, 2010), las giberelinas (GAs, de Gibberellins; Navarro *et al.*, 2008), las auxinas (Wang *et al.*, 2007a) o los brasinosteroides (BR, de Brassinosteroids; Nakashita *et al.*, 2003).

Hasta la fecha hay muy pocos estudios realizados en *Physcomitrella* sobre las vías de señalización hormonal involucradas en la respuesta de defensa de esta planta. *Physcomitrella* presenta además peculiaridades interesantes, incluyendo el hecho de que no sintetiza JA (Ponce de León *et al.*, 2012).

En este trabajo se analizaron los perfiles de expresión de proteínas relacionadas con la síntesis y señalización de las hormonas anteriormente mencionadas relacionadas con la defensa vegetal. Para ello se buscaron los genes ortólogos correspondientes en el genoma *Physcomitrella*. No se encontraron grandes variaciones en la expresión de genes biosintéticos de las hormonas mencionadas, salvo en los genes que participan en la vía de señalización mediada por auxinas (Tabla 17). Se identificaron seis genes que codificarían para proteínas de respuesta a auxinas siendo el gen Phypa_49573 el que presenta la mayor inducción. La inducción de genes de respuesta a auxinas se correlaciona directamente con datos recientes obtenidos por nuestro grupo donde se observa una acumulación de esta hormona en respuesta al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum* (datos no publicados).

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	FC	Protein Function
Pp1s57_86V6.1	Phypa_435009	Phypa_49573	1066	-4,3	Auxin responsive SAUR protein
Pp1s4_222V6.1	Phypa_423043	Phypa_39293	1849	-3,6	Auxin responsive SAUR protein
Pp1s339_28V6.1	Phypa_458057	Phypa_9340	2340	-2,3	Auxin responsive SAUR protein
Pp1s107_89V6.1	Phypa_442285	Phypa_18984	1541	-1,8	Auxin responsive SAUR protein
Pp1s4_223V6.1	Phypa_423272	Phypa_39015	1250	-1,8	Auxin responsive SAUR protein
Pp1s56_150V6.1	Phypa_434958	Phypa_19049	1536	-1,8	Auxin responsive SAUR protein

Tabla 17. Nombre del transcripto y número de Phypa de genes que codifican para proteínas de respuesta a auxinas versión v1.1 y v1.6. Los Valores de scaffolds representan la posición genómica de los genes. FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control. Valores de Fold change negativos indican que los genes se inducen en respuesta al CF de SCC1 de *P.c. carotovorum*.

4.1.6 Metabolismo secundario

Las briofitas se caracterizan por producir una gran variedad de metabolitos secundarios (Krzaczkowski *et al.*, 2008.; McCleary *et al.*, 1960; Sakai *et al.*, 1988), algunos de ellos con valor comercial (Beike *et al.*, 2010). El análisis del transcriptoma de *Physcomitrella*, en condiciones

normales de desarrollo, reveló la posible presencia de un número alto de metabolitos, productos de genes implicados en el metabolismo secundario (Lang *et al.*, 2005). Sin embargo, ninguno de estos estudios describía el cambio de las concentraciones de este tipo de metabolitos durante el desarrollo o en respuesta a cambios ambientales (Hosp *et al.*, 2007; Kaplan *et al.*, 2004; Rizhsky *et al.*, 2004). En 2012 Erxleben *et al.*, demostraron que el protonema y el gametóforo tienen diferentes perfiles de metabolitos, especialmente, con respecto a derivados de azúcares y aminoácidos, precursores de lignina y compuestos de almacenamiento ricos en nitrógeno. Observaron además que bajo condiciones de sequía, se acumulan compuestos osmoprotectores tales como manitol, ácido ascórbico y prolina.

Con la finalidad de analizar si ocurren cambios a nivel de la síntesis de metabolitos secundarios en *Physcomitrella* en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum*, en este trabajo se analizó el perfil de expresión de genes involucrados en la síntesis de este tipo de compuestos. Dentro de este grupo nos centramos en las enzimas que participan en la síntesis de compuestos con actividad antioxidante como el ácido ascórbico (AsA) y de compuestos con actividad antimicrobiana y/o antioxidantes como es el caso de los flavonoides.

Para controlar los niveles de ROS y proteger las células bajo las condiciones de estrés, los tejidos de las plantas contienen además de las enzimas antioxidantes, una red de compuestos de bajo peso molecular con capacidad antioxidantes tales como el ascorbato, glutatión, compuestos fenólicos y tocoferoles. El ácido ascórbico puede eliminar directamente superóxido, radicales hidroxilos y oxígeno singlete, y reduce el H₂O₂ hasta agua por la vía de la ascorbato peroxidasa. En *Arabidopsis* la síntesis de ácido ascórbico a partir de L-galactosa requiere varios pasos enzimáticos (vía Smirnoff-Wheeler) (Laing *et al.*, 2007) (Figura 17).

Otro de los genes identificados por presentar una expresión inducida frente al tratamiento con el CF de SCC1, fue el Phypa_120832, el cual codifica para una proteína similar a la L-galactose dehydrogenase (EC:1.1.1.316). Esta enzima cataliza la conversión de L-galactosa en L-galacona-1,4 lactona, el penúltimo paso de la vía de síntesis del ácido ascórbico.

EL AsA tiene varios papeles en el metabolismo, el transporte de electrones, el control del ciclo celular, y en la respuestas de las plantas a los patógenos y estrés abiótico (Smirnoff *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000). AsA regula los niveles de H₂O₂ cuando se acopla con el sistema redox, denominado AsA/glutación (GSH) o vía Asada-Halliwell. La ascorbato peroxidasa (APX) utiliza como donador de electrones el AsA para reducir el H₂O₂ en agua con la generación concomitante de monodehydroascorbate (MDA).

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	Gene location Scaffold:base	FC
Pp1s114_207V6.1	Phypa_442959	Phypa_166416	3006	114:1225847-1229860	-282,4
Pp1s34_241V6.1	Phypa_430811	Phypa_120832	2854	34:1238371-1242650	-2,1

Tabla 18. Nombre del transcripto y número de Phypa, versión v1.1 y v1.6, de genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de ácido ascórbico. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5'y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Varios estudios de detoxificación de ROS en plantas han demostrado que la actividad de APX generalmente aumenta junto con las actividades de otras enzimas, tales como catalasas, superóxido dismutasa, y reductasa GSH, en respuesta a diferentes tipos de estrés (Shigeoka *et al.*, 2002). Se hicieron búsquedas en la base de datos cosmoss, utilizando las secuencias de los genes que codifican para APX en *Arabidopsis*, identificándose dos genes con similitud de secuencia con APX (Tabla 19). El análisis de la abundancia relativa de los transcriptos de estos genes indicó que ambos genes se inducen en respuesta frente al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum*. Estos resultados sugieren que *Physcomitrella* responde a este patógeno mediante la síntesis de compuestos antioxidantes tales como el ácido ascórbico.

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	CDS+UTRs (nt)	Gene location Scaffold:base	FC
Pp1s43_80V6.1	Phypa_432540		1390	43:711248-714516	-2,2
Pp1s43_80V6.2	Phypa_432539	Phypa_123146	1376		
Pp1s30_255V6.1	Phypa_429648		3329	30:1879393-1887285	-1,6
Pp1s30_255V6.2	Phypa_429647	Phypa_119771	3329		

Tabla 19. Nombre del transcripto y número de Phypa de las APX putativas identificadas en la versión v1.1 y v1.6 del genoma de *Physcomitrella*. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regions reguladoras 5'y 3'UTR (de Unstralated Region) FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

Los flavonoides son metabolitos secundarios sintetizados a partir de un redireccionamiento de precursores del metabolismo primario, en función de la expresión de novo de genes correspondientes a enzimas que participan en las rutas biosintéticas. Los isoflavonoides son sintetizados a partir de L-fenilalanina a través de una serie de enzimas como la L-fenilalanina-amonio-liasa (PAL), 4-cumarato:Coenzima A ligasa (4CL), chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI) que controlan pasos importantes en las subrutas de síntesis (Figura 19).

La PAL cataliza el primer paso de la vía fenilpropanoides, que produce precursores para una variedad de metabolitos secundarios importantes (Dixon *et al.*, 2002). *Arabidopsis* contiene cuatro genes PAL, pero no se han reportado análisis genéticos para dilucidar la función biológica de los miembros de esta familia de genes. A partir de los análisis bioinformáticos en el genoma de *Physcomitrella*, la superfamilia de PAL comprendería 14 genes, de los cuales, cuatro de ellos se inducen en respuesta al CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* (Tabla 20). El gen Phypa_156018 ya había sido identificado por nuestro grupo como un gen de defensa que se induce en *Physcomitrella* en respuesta al tratamiento con el CF de *P.c. carotovorum* así como en respuesta a tratamientos con patógenos necrótrofos (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012).

La 4CL cataliza la conversión de ácido 4-cumárico en 4-cumaroil-CoA, un producto central de la ruta de los fenilpropanoides, el cual es condensado con tres moléculas de malonil CoA para formar naringenina-chalcona por la enzima CHS (chalcona sintetasa). En respuesta al CF se inducen dos genes que codificarían para 4CL, cuyos transcriptos Phypa_117032 y se inducen Phypa_192148 casi tres y dos veces, respectivamente (Tabla 20).

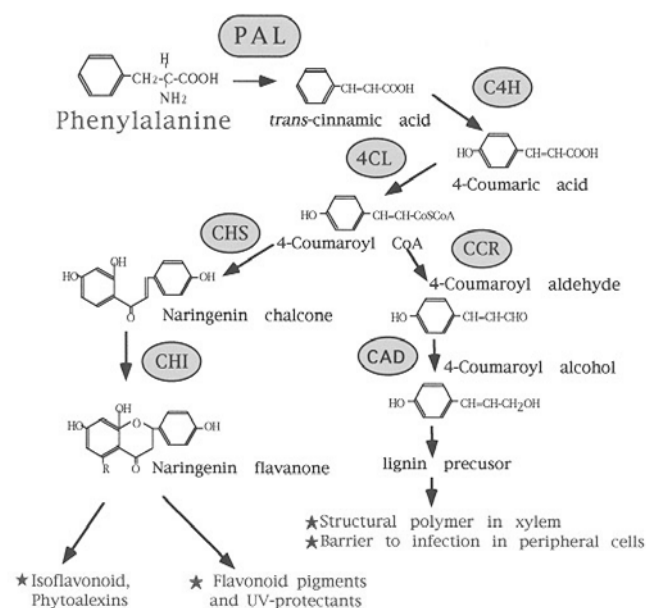


Figura 19. Vía de síntesis de flavonoides. Tomado de http://www.rdi.ku.ac.th/GMOS/GMOs2/2_6/index18.htm

Las CHS pertenecen a la superfamilia de CHS, también conocida como policétidos sintetasas de tipo III, y se encuentran en todas las especies vegetales. En *Physcomitrella*, la familia de CHS comprende 17 genes, de los cuales 14 tienen CDS completas, más tres pseudogenes putativos. Existen genes en múltiples copias y todos son activos a nivel transcripcional (Koduri *et al.*, 2010). A partir de los datos transcriptómicos se identificaron las PpCHS que presentan mayores niveles de inducción en respuesta al tratamiento con el CF de la cepa SCC1. En la Tabla 20 se muestra la información sobre tres de los genes que presentaron mayor inducción en comparación con las muestras control. Hace ya unos años, cuando el genoma de *Physcomitrella* aún no estaba secuenciado, nuestro grupo había identificado el transcripto Phypa_104998, que codifica para una PpCHS como un gen de defensa que se inducía en respuesta al tratamiento con varios patógenos (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009). Sin embargo, dentro de las CHS que se inducen en respuesta a elicitores de SCC1, el transcripto Phypa_101257 es el que presenta mayor inducción respecto a los restantes integrantes de la familia, con un *Fold Change* de 5. Al analizar más en detalle las secuencias nucleotídicas de los tres transcriptos que se inducen en respuesta a elicitores de SCC1, se observó que comparten un alto porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos mayor al 80%. Esto sugiere que en los anteriores ensayos de expresión del gen Phypa_104998 por *Northern blot*, en los cuales se utilizó como sonda la secuencia de ADNc de este gen, pudo haber habido hibridación cruzada de la sonda con los transcriptos de los genes Phypa_101257 y Phypa_14969. Esto sumado al hecho que los transcriptos de los tres genes tienen tamaños similares, podría estar explicando el alto grado de inducción observado en esos estudios para el gen Phypa_104998 (Figura 1 del Anexo).

El gen Phypa_104998, que codifica para una CHS se ubica en el scaffold 22, el mismo scaffold (orientación cabeza-cabeza) donde se ubica el gen Phypa_177179 que codifica para una PAL. La ubicación cercana de genes que codifican para proteínas de una misma vía es una estrategia ampliamente utilizada para aumentar la velocidad de síntesis.

Las chalconas generadas por la CHS son sustrato de la CHI para dar lugar a flavonas, que son los precursores de los flavonoides, compuestos en muchos casos con capacidad protectora y antioxidante. Se realizaron búsquedas en las bases de datos cosmoss y Phytozome y se identificaron seis genes que codificarían para proteínas CHI. Se analizó el perfil de expresión de cada uno de ellos y solamente el gen Phypa_127780 presentó una leve inducción en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* (Tabla 20).

Los policétidos son metabolitos secundarios que están presentes en bacterias, hongos y plantas. Son estructuralmente una familia muy diversa de productos naturales con actividades biológicas y propiedades farmacológicas distintas (Bourgaud *et al.*, 2001; Facchini *et al.*, 2012). En las plantas, los policétidos son sintetizados por policétido sintetasas de tipo III (PKS) que catalizan la condensación de metabolitos primarios activados (acetil-CoA y Malonil-CoA) para formar compuestos complejos. (Austin *et al.*, 2003). La diversidad estructural de los policétidos vegetales

resulta de la cantidad de sustratos que pueden ser utilizados por las PKS y de las modificaciones posteriores a través de condensación regio-específica, ciclación, aromatización, hidroxilación, entre otras (Noel *et al.*, 2005). De esta manera se forman flavonoides y estilbenos los cuales están involucrados en la defensa vegetal (Bourgaud *et al.*, 2001)

	Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	FC
PAL	Pp1s20_305V6.1	Phypa_427381	Phypa_156018	20:2102537-2104933	-2,2
	Pp1s32_311V6.1	Phypa_430153	Phypa_123073	32:2151201-2153997	-1,8
	Pp1s22_3V6.1	Phypa_427931	Phypa_177179	22:8691-11394	-1,5
	Pp1s5_197V6.1	Phypa_113035	Phypa_180561	5: 1385525 – 1388218	-1,4
4CL	Pp1s18_41V6.1	Phypa_426960	Phypa_117032	18: 188092 - 192003	-2,1
	Pp1s174_72V6.1	Phypa_448670	Phypa_192148	174: 533772 – 539991	-1,6
CHS	Pp1s463_8V6.1	Phypa_460896	Phypa_101257	463:99838	-5,5
	Pp1s303_6V6.1	Phypa_456605	Phypa_149692	303:69378	-2,5
	Pp1s22_4V6.1	Phypa_427901	Phypa_104998	22:12268	-1,4
CHI	Pp1s67_154V6.1	Phypa_436774			
	Pp1s67_154V6.2	Phypa_436773	Phypa_127780	67:1093489-1096195	-1.3

Tabla 20. Nombre del transcripto y número de Phypa, versión v1.1 y v1.6, de genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis e metabolitos secundarios. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5'y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

En estudios previos de nuestro grupo, se identificó un gen (Phypa_105033) que codifica una proteína putativa policétido ciclasa (PpPKC) en una biblioteca de ADNc obtenida mediante la técnica SSH, a partir de tejidos de *Physcomitrella* tratados con elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* (Álvarez *et al.*, datos no publicados). Las policétido ciclasas son enzimas que ciclan y producen policétidos con diversas funciones, algunos de los cuales podrían cumplir funciones en la defensa vegetal.

Una búsqueda en la secuencia completa del genoma de *Physcomitrella* (versión 1.6) en la base de datos pública Phytozome v9.1 base de datos pública (www.phytozome.net) (Goodstein *et al.*, 2012), reveló la existencia de al menos siete genes que presentaron una alta homología con PpPKC. A partir de los datos transcriptómicos se identificaron tres genes *PpPKC-like* que presentan mayores niveles de inducción en respuesta al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 (Tabla 21). Entre estos genes se encuentra el Phypa_105033 ya analizado por nuestro grupo como un gen de expresión diferencial en respuesta al tratamiento. Si bien se induce menos que los genes Phypa_109415 y Phypa_72518, al analizar la cantidad de lecturas en los datos de RNAseq para cada gen, se observó que el gen Phypa_105033 acumula un mayor número de transcriptos en respuesta al tratamiento y además es el único de los tres genes que presenta el dominio policétido

ciclasa conservado, además del dominio Bet v presente en proteínas relacionadas con la patogénesis (Mogensen *et al.*, 2002).

Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Gene location Scaffold:base	CDS+ UTRs (nt)	FC
Pp1s2_443V6.1	Phypa_422600	Phypa_109415	2:2407036-2409503	1913	-2,9
Pp1s2_443V6.1	Phypa_431390	Phypa_72518	37:1193892-1195804	1657	-1,8
Pp1s2_443V6.1	Phypa_428021	Phypa_105033	22:1928568-1930444	1450	-1,5
Pp1s2_443V6.1	Phypa_445542	Phypa_137698	139:421343-423679	1277	-1,1
Pp1s2_443V6.1	Phypa_431407	Phypa_72516	37:1193987-1195899	1657	1,1
Pp1s2_443V6.1	Phypa_422322	Phypa_62196	2:2410674-2412872	1644	1,2
Pp1s2_443V6.1	Phypa_425161	Phypa_159273	11:1113022-1114674	1408	1,6

Tabla 21. Nombre del transcripto y número de Phypa, versión v1.1 y v1.6, de genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de policétidos. CDS+UTRs (nt): indica el número de nucleótidos de la secuencia codificante más las regiones reguladoras 5'y 3'UTR (de Unstralated Region). FC: Fold Change, cambios en los niveles de expresión en colonias tratadas con SCC1 en comparación con plantas control.

En suma, la secuenciación y el análisis del transcriptoma de *Physcomitrella* en respuesta a elicitores de SCC1 permitieron identificar un conjunto de genes inducidos en respuesta al tratamiento y que codifican para proteínas relacionadas con la defensa vegetal como MAPKs, proteínas de resistencia, enzimas detoxificadoras de ROS y enzimas involucradas en la síntesis de compuestos con actividad antioxidante, enzimas involucradas en el fortalecimiento de la pared celular, proteínas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios, incluyendo flavonoides y policétidos.

También se identificaron genes que se inducen y codificarían para proteínas con actividad antimicrobiana tales como β -1,3-glucanasas, quitinasas y taumatinas, entre otras (datos no presentados). A partir de los resultados obtenidos y la bibliografía disponible en ese momento, resultó interesante enfocar nuestro estudio a la caracterización funcional de genes expresados diferencialmente en respuesta al CF, con el fin de evaluar su capacidad de conferir resistencia. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

4.2 Análisis funcional de genes de *Physcomitrella* con un posible rol en la defensa vegetal

En base a los resultados obtenidos y a datos de la literatura, se decidió profundizar en el análisis funcional de dos genes expresados diferencialmente en respuesta al CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum*, entre los cuales se incluyeron el gen *PpPKC*, que codifica para una policétido ciclasa, y el gen *PpBI-1*, el cual es un posible regulador de la PCD en *Physcomitrella*.

Los resultados mostraron que en respuesta al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum* en *Physcomitrella* hay cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo secundario, algunos de los cuales están involucrados en la síntesis de policétidos, incluyendo flavonoides. Resultó interesante modular los niveles de esos compuestos, mediante la sobre-expresión de *PpPKC*, que codificaría para una enzima que podría estar involucrada en la síntesis y/o ciclado de policétidos, con la finalidad de evaluar su participación en la defensa vegetal.

La PCD ocurre durante procesos del desarrollo y en respuesta a patógenos, toxinas, y estrés abiótico. El hongo necrotrofo *B. cinerea* y elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* generan muerte celular de los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD, incluyendo el colapso del citoplasma, acumulación de compuestos fenólicos y amarronamiento de los cloroplastos (Ponce de León *et al.*, 2007). Dada la poca información disponible hasta la fecha sobre procesos de PCD en *Physcomitrella*, se propuso generar conocimiento sobre el rol que cumple un gen con homología al regulador antiapoptótico Bax Inhibitor (BI-1) en *Physcomitrella*.

4.2.1 Análisis funcional del gen *PpPKC* de *Physcomitrella* y su capacidad de conferir resistencia

El gen Phypa_105033, denominado *PpPKC*, codifica para una proteína deducida de 290 aminoácidos y 31 KDa que tiene un dominio policétido ciclasa y un dominio Bet v presente en proteínas relacionadas con la patogénesis. El dominio Bet v puede unir brasinosteroides, citoquininas, flavonoides y ácidos grasos (Mogensen *et al.*, 2002).

Utilizando la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen, se realizaron búsquedas de genes homólogos de *PpPKC* en el genoma de *Physcomitrella* mediante BlastP en la base de datos Phytozome (www.phytozome.net) y la base de datos Cosmoss (www.cosmoss.org), específica de *Physcomitrella*. En *Physcomitrella*, se identificaron siete genes con homología de secuencia mayor al 60% a *PpPKC*. Se realizó el alineamiento utilizando el método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) con la secuencia proteica deducida de los mismos (Figura 20).

```
Phypa_105033 -----MAHTLSHTEFLNCDAAADAWECCKHSDKVLDPDLLPEEF 38
Phypa_109415 -----MAHTLSHTEFLNVDAAADAWMCCKHSDKVLDPDLLPEEFA 38
Phypa_62196 -----MAHTLSHTEFLNVDAAADAWMCCKHSDKVLDPDLLPEEFA 38
Phypa_137698 MMAFTAET---ALPTAAPQAVFES-----TRVOTLSHTEFLNGESHNLWEACKHVAALPDLAPEMFA 60
Phypa_72518 -----MSOTLSHTEVLQVRDELWEAVKQADTLMRANMPEEFA 38
Phypa_72516 -----MSOTLSHTEVLQVRDELWEAVKQADTLMRANMPEEFA 38
Phypa_159273 -MAFTEITSSPSLVLTSTEVAPAHQAGSSVDTSLAHVDETTISPEKTESHTEVLRGNADDVWEACKHGVAFLPDLAEMET 79
```

```

Phypa_105033 SAETILEGNGCGPGTLRVVHFHFGPAIPGAGAAKERIDDKVDEASKTLSYTVVEGDPR--YTNFTADVSEKSVGDNQTEATWTAKY 117
Phypa_109415 KETILEGDCGPGTLRVVHFHFGPAIPGAGAAKERIDDKVDEASKTLSYTVVEGDPR--YVNVTVGVVSPASTGEKQTKATWTISKY 117
Phypa_62196 KETILEGDCGPGTLRVVHFHFGPAIPGAGAAKERIDDKVDEASKTLSYTVVEGDPR--YVNVTVGVVSPASTGEKQTKATWTISKY 117
Phypa_137698 RAETFEKGGWCGPGSIGVHFHFGPAIPGAGSVKHERIDDKVDEASKTLSYTVVEGDPR--YSSFAAEMKQSPADDNTEVTIWTAKY 139
Phypa_72518 KSEYVQGNCGPGSIRVILLGSAIPHVQIKERVDKFDADMTMAATVLEGDPR--YSSSEQVQLVPRGD--TTEATWTAKY 116
Phypa_72516 KSEYVQGNCGPGSIRVILLGSAIPHVQIKERVDKFDADMTMAATVLEGDPR--YSSSEQVQLVPRGD--TTEATWTAKY 116
Phypa_159273 KAEYERGWCGPGSISVHFHFGPAIPGARKVROHVDVDDNSRTLAYTVIEGDISYSSEKVELKIPAGESETEATWTIVKY 159

Phypa_105033 DPVGEAGPPEHIIKRNISILMFKTFEKALQOKKTVHTHTLNASPDATWKAKEENSILPAAWPOVFESISFVQSGCEPGEVSV 197
Phypa_109415 DTVGEAGPPEHVKNITALMFKTFEKAVQSKKTAHTHTLNASPDATWSAVKOENAILPKALPHLFESCTEAKNGEVGSI 197
Phypa_62196 DTVGEAGPPEHVKNITALMFKTFEKAVQSKKTAHTHTLNASPDATWSAVKOENAILPKALPHLFESCTEAKNGEVGSI 197
Phypa_137698 ETVGEAGPPEHIIKKNVIVTLKTFEKAVMNRVVRHTHTLNASPDATWNIILMHEVILLPRVPHILIASYEFLEGNCEGESSI 219
Phypa_72518 EPVCDMGPPEEKRAISALMLKTLERAVLDKKTITHVOTLDVSPEDITWACERVDDIILAKAMPQEFETVTLNNGEGEPEVSV 196
Phypa_72516 EPVCDMGPPEEKRAISALMLKTLERAVLDKKTITHVOTLDVSPEDITWACERVDDIILAKAMPQEFETVTLNNGEGEPEVSV 196
Phypa_159273 VEVGEAGPPEIRDIVAITLKAPEKAVTEKRIVRHTHTLNASPDATWNIILMHEVILLPRVPHILIESYEFLEGNCEGESSI 239

Phypa_105033 RVCKMGPAPFGGGEVVERIDILDDGSKVQWTVLKGDPREKHVSAVLKYAPGSDGTTTATWTA----- 261
Phypa_109415 RLSKMGPAIPDA GELVEQVDVFDAAEKKVGYTVLKGDPREKYVTAVVOYAPGPTAGTTTATWTA----- 261
Phypa_62196 RLSKMGPAIPDA GELVEQVDVFDAAEKKVGYTVLKGDPREKYVTAVVOYAPGPTAGTTTATWTA----- 261
Phypa_137698 RLLKLGHAIPNGNHVVERIDVNEAATKRWGYTVLQDPKYKYL SAVOFLPGAEEGTTLAKWLPGLSGEGNVHCLSHQAA 299
Phypa_72518 RVVKMGPAVPHA GEVTERMDLFDKETRKLGYTVLKGDPRWCFKATMOFNEGPTKGTTEGLWMA----- 260
Phypa_72516 RVVKMGPAVPHA GEVTERMDLFDKETRKLGYTVLKGDPRWCFKATMOFNEGPTKGTTEGLWMA----- 260
Phypa_159273 RLLKLGHAIPNGKNVVEHIDVNDAAATKRWGYTVLQDPKYKYL SAVOFLPGSEEGTTLAKWV----- 303

Phypa_105033 -----TFVPEEENCVTLEN--KFVAVVWKALEAAAAA----- 290
Phypa_109415 -----TFVPEEENCVLDS--KFVAVVWKALESAAKA----- 290
Phypa_62196 -----TFVPEEENCVLDS--KFVAVVWKALESAAKA----- 290
Phypa_137698 HKQLRTIHHLVNKA SPSVLLSNQMLVACSATTSFP---LQLLELFRIMKAARELNSSHARSHNWSALLMIVLAPSSSETL 376
Phypa_72518 SYGPLGNMCPPEHIWGIQVVKATAGDVREHPELYA----- 297
Phypa_72516 SYGPLGNMCPPEHIWGIQVVKATAGDVREHPELYA----- 297
Phypa_159273 AYVPHNPTITPP---DLALHVKVVFEGVAKASPOAVY----- 337
Phypa_105033 ----- 290
Phypa_109415 ----- 290
Phypa_62196 ----- 290
Phypa_137698 SPFVTRLQSHS 387
Phypa_72518 ----- 297
Phypa_72516 ----- 297
Phypa_159273 ----- 337

```

Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas completas de genes identificados con alta homología a PpPKC de *Physcomitrella*. Los guiones indican ausencia de aminoácido en esa posición. El sombreado oscuro indica identidad de secuencia $\geq 95\%$ y el más claro, elevada similitud. Se utilizó el software Mega versión 5.0.

Con el objetivo de identificar elementos de respuesta conservados que pudieran estar involucrados en la regulación de la expresión de *PpPKC*, se buscó la secuencia genómica disponible en la base de datos Phytozome que se encontrara corriente arriba del inicio de la traducción. Se ha reportado que la mayoría de los promotores de *Arabidopsis* utilizan regiones regulatorias localizadas en los primeros 1.000-1500 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Lebel *et al.*, 1998; Maleck *et al.*, 2000). En este trabajo se estudiaron 1.500 pb anteriores al +1 (primer nucleótido del triplete ATG de iniciación de la traducción) (Figura 21). Para buscar motivos conservados en la región promotora se utilizó la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1999, Prestridge 1991): *A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>), la cual contiene datos publicados sobre elementos regulatorios de promotores de plantas vasculares. En la secuencia analizada se observó la presencia de cinco cajas G, presentes en promotores de genes inducidos por luz, dos elementos MBS (de *MYB binding site involved in drought-inducibility*) de respuesta a sequía (Urao *et al.* 1993). Además se observaron dos elementos TGA y dos AuxR-core (Sakai *et al.*, 1996), ambos elementos se encuentran presentes en las regiones promotoras de genes de respuesta a auxinas. Los elementos que responden a auxina, se encuentran generalmente combinados con otros elementos que responde a otras hormonas permitiendo que exista un control mucho más complejo de la inducción de expresión (Peremarti *et al.*, 2010). También están presentes tres motivos TGACG de

Se observa claramente diferencias en los perfiles de expresión de las distintas PpPKC-like en respuesta a distintas condiciones de estrés. Los genes Phypa_109415 y Phypa_62196, que según el análisis filogenético están más emparentados al gen *PpPKC* (Phypa_105033) presentan un patrón de expresión similar, aumentando su expresión en respuesta a *B. cinerea* y oscuridad. Para el resto de las PpPKC-like, las mismas no varían su expresión en respuesta a estos tipos de estrés y en algunos casos incluso disminuyen.

Respecto a su expresión en los distintos estadios de desarrollo, los resultados indican que todos los genes se expresan durante la fase gametofítica con niveles similares y aparecen variaciones entre los genes homólogos en el esporofito y durante la etapa de germinación de esporas. En particular el gen *PpPKC* disminuye notoriamente su expresión en la fase esporofítica en comparación con el resto de los genes.

El perfil de expresión del gen *PpPKC* frente a diferentes condiciones de estrés fue estudiado mediante *Northern blot*. El estrés biótico se realizó mediante tratamientos con los CFs de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y la cepa SCC3193 de *P. wasabiae*, esporas del hongo *B. cinerea* y plugs conteniendo micelio de *P. irregulare*. Todos los tratamientos se realizaron sobre colonias de *Physcomitrella* de tres semanas, a partir de las cuales se extrajo ARN total para analizar mediante electroforesis y transferencia a membrana de nylon y su posterior hibridación con sondas marcadas radiactivamente.

Como se puede ver en la Figura 23, el gen en estudio se encuentra fuertemente inducido frente al estrés biótico, en especial frente a tratamientos con la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y *B. cinerea*, lo cual coincide con la posible función de este gen en la respuesta a la infección con patógenos. En el caso del tratamiento con elicitores de la cepa SCC1 la inducción se observa principalmente a las 4 h post-tratamiento, mientras que con *B. cinerea* la inducción se detecta a las 4 h y aumenta a las 24 h. El aumento de expresión de *PpPKC* a las 24 h del tratamiento con elicitores de SCC1 es leve comparado con el detectado a las 4 h, lo cual explica el leve aumento de expresión de *PpPKC* observado en el transcriptoma realizado en este trabajo.



Figura 23. Perfil de expresión génica de *PpPKC*. Análisis por *Northern blot* utilizando muestras de ARN de colonias crecidas sobre celofán tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y la cepa SCC3193 de *P. wasabiae*. Ctl: plantas sin tratar. rRNA: ARN ribosomal como control de carga.

Con el objetivo de identificar las señales celulares que intervienen en la activación del gen *PpPKC* en *Physcomitrella*, se procedió a analizar el patrón de expresión del gen *PpPKC* en respuesta al tratamiento con distintas moléculas señales involucradas en la respuesta de defensa vegetal. Para ello se procedió a examinar la expresión del gen *PpPKC* en colonias crecidas sobre celofán tras la aplicación exógena de ácido salicílico (SA, 1mM), metil jasmónico (MeJa, 100 μ M), ácido abscísico (ABA, 100 μ M) y ácido naftaleno acético (NAA, 10 mM). Las concentraciones elegidas fueron las mismas que en plantas vasculares inducen los genes marcadores de las distintas vías tales como PR1 para la vía del SA (Dunner *et al.*, 1997) y PDF1.2 para la vía del JA y etileno (Penninckx *et al.*, 1996). Los resultados derivados de este análisis aparecen reflejados en la Figura 24, en la que se observa una moderada y rápida inducción, aunque transitoria, de este gen frente al tratamiento con fitohormonas tales como SA, MeJA y NAA (Figura 24, parte A).

También se analizó el patrón de expresión del gen *PpPKC* en condiciones de estrés abiótico que generan estrés oxidativo incluyendo, el estrés salino, osmótico, térmico y radiación UV. De esta manera, se extrajo ARN total de colonias de *Physcomitrella* tratadas con manitol 0,9 M, NaCl 0,5 M, 37°C durante 24 horas y tratadas con radiación UVB durante 2 horas. Los resultados derivados de este análisis aparecen reflejados en la Figura 24, parte B. El gen *PpPKC* se induce en respuesta a factores de estrés salino, osmótico y térmico. Sin embargo, no se observó inducción por radiación UV.

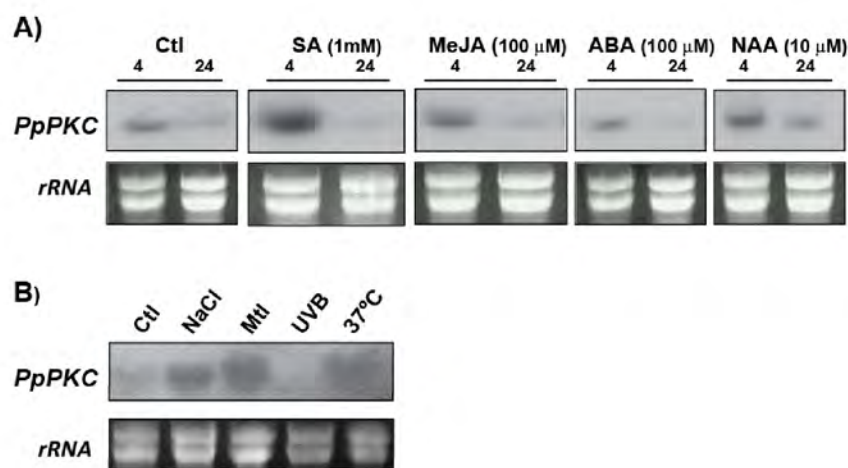


Figura 24. Perfil de expresión génica de *PpPKC*. A) en respuesta tratamientos con: ácido salicílico (SA) 1 mM, ácido metil jasmónico (MeJA) 100 μ M, ácido abscísico (ABA) 100 μ M y ácido naftaleno acético (NAA) 10 μ M. Se extrajeron los ARN a 4 y 24 h post-tratamiento. Los tratamientos de estrés abiótico se realizaron durante 24 horas cada uno: NaCl: tratamientos con NaCl 0,5M; Mtl: tratamientos con manitol 0,9M; UVB: tratamiento con UVB durante 2 h; 37°C: tratamiento con temperatura de 37°C ; rRNA: ARN ribosomal, control de carga.

4.2.1.2 Aislamiento de *PpPKC*

El ADNc del gen *PpPKC* fue obtenido por RT-PCR a partir de una mezcla de muestras de ARN totales de plantas de *Physcomitrella* tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* durante 4 y 24 horas. Los cebadores utilizados se diseñaron generando sitios de restricción para el

subclonado orientado y en fase en el vector de entrada pENTR2B (ver sección 3.6.1 de Materiales y Métodos).

4.2.1.3 Determinación de la localización subcelular de PpPKC

Con el fin de conocer la ubicación subcelular de la proteína PpPKC se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco, de una construcción que dirige la expresión constitutiva, de la proteína de fusión PpPKC-GFP en hojas de tabaco. Para ello, se amplificó, a partir de ADNc, la región codificante del gen *PpPKC*, utilizando cebadores diseñados de manera tal que se eliminó el codón de terminación y se conservó el marco de lectura con la proteína GFP. La secuencia amplificada fue clonada en el vector de entrada pENTR2B y luego clonada por recombinación LR en el vector binario destino pK7FWG2, obteniéndose el vector de expresión 35S:PpPKC-GFP (Figura 25, parte A).

A)



B)

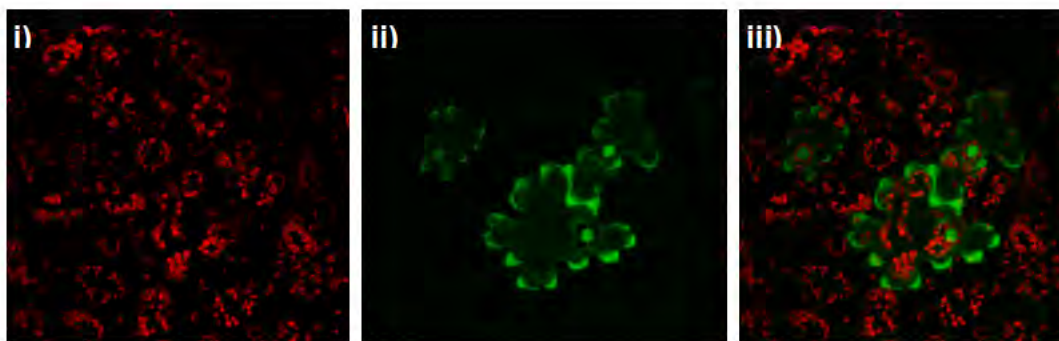


Figura 25. A) Esquema de la construcción genética, contenido en el vector binario pK7FWG2, para la sobre-expresión de la proteína de fusión PpPKC-GFP en tabaco. promotor constitutivo p35S, terminador T35S; attR1 y attR2, sitios específicos para la recombinación LR; RB y LB, borde derecho y borde izquierdo respectivamente. B) Expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de tabaco para determinar la localización subcelular de la proteína PpPKC fusionada con GFP. i) Autofluorescencia de los cloroplastos ii) Patrón de acumulación de fluorescencia observado en hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción 35S:PpPKC. iii) Imagen solapada del marcador fluorescente GFP (verde) (i), y la autofluorescencia de los cloroplastos en rojo (ii).

Con este tipo de enfoque no es posible determinar el patrón de expresión espacial de este gen debido a que la expresión del gen quimérico está regulada por un promotor constitutivo (CaMV35S). Sin embargo, esta aproximación permite contribuir a determinar el patrón de localización intracelular de la proteína.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco, determinaron un patrón de fluorescencia uniforme en el citoplasma, ya que no se observaron asociaciones con organelos o compartimentos subcelulares (Figura 25, parte B). Los resultados obtenidos concuerdan con las predicciones bioinformáticas de la secuencia aminoacídica deducida

de *PpPKC*, utilizando el sitio web WoLF PSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>) y SignalIP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) que sugieren la ausencia de un péptido de tránsito a organelos.

4.2.1.4 Generación y caracterización molecular de líneas de *Physcomitrella* que sobre-expresan PpPKC

Con el objetivo de determinar la contribución del gen *PpPKC* a la resistencia a patógenos en *Physcomitrella*, se realizó una construcción génica en el vector pTHubi, que permite la expresión del gen bajo la regulación del promotor constitutivo de la ubiquitina de maíz. Posee un cassette de selección que confiere resistencia a hygromicina (Hyg) y contiene una región 5' y una 3' homologas al locus 108 de *Physcomitrella*, la cual corresponde a una región no codificante presente en copia única en el genoma (Schaefer y Zrýd 1997). Para ello se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia codificante obtenida de la base de datos Phytozome. La CDS del gen *PpPKC* se clonó en el vector de expresión pTHubi. La presencia del inserto fue confirmada mediante análisis de restricción y secuenciación y se denominó ubi:*PpPKC* (Figura 26, parte A).

Entre 10-30 µg de ADN lineal obtenido a partir de la digestión de ubi:*PpPKC* con *Swa*I fueron utilizados para transformar protoplastos de *Physcomitrella*. 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 alrededor de 5×10^5 protoplastos por transformación.

Una vez realizada la transformación, los protoplastos fueron regenerados durante 5-10 días en medio PMRB/PMRT. Una vez pasado el tiempo de regeneración se transfirieron a medio selectivo, con el antibiótico hygromicina 25µg/mL, y se les realizó un seguimiento durante dos semanas. En estas condiciones, aquellos clones sin transformar mueren dentro de un período de una semana. Durante el período de selección se pueden observar diferencias en el crecimiento de los clones, aquellos con crecimiento lento corresponden a transformantes inestables, y aquellos con una velocidad de crecimiento equivalente a individuos de genotipo salvaje en medio sin selección, probablemente correspondan a transformantes estables. Este período debe ser seguido de un período de crecimiento en medio sin antibiótico, de forma de favorecer que los transformantes inestables pierdan la resistencia, para luego ser incubados una vez más en medio con selección. Se ha reportado que únicamente los individuos transformantes estables sobreviven a esta segunda etapa de selección (Schaefer 2002). También se ha descrito que existen dos tipos de transformantes estables, individuos que han integrado el transgen en su genoma mediante recombinación homóloga y aquellos que lo han integrado mediante recombinación ilegítima (Kamisugi *et al.*, 2005; Kamisugi *et al.*, 2006). Luego de realizados los experimentos de transformación se obtuvieron dos clones al finalizar las etapas de selección denominados *OEPKC1* y *OEPKC3*.

4.2.1.5 Análisis de los transformantes

Se procedió a examinar mediante *Northern blot*, los niveles de expresión del gen *PpPKC* en plantas salvajes y en las plantas que incorporaron la construcción, utilizando una sonda derivada del ADNc

de *PpPKC*. Para ello, se extrajo ARN de plantas wt tratadas durante 4 horas con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y plantas salvajes y sobre-expresantes sin tratar. Como se observa en la Figura 26 parte B, en las plantas wt el nivel de expresión del gen *PpPKC* aumenta claramente a las 4 horas post-tratamiento. En las líneas sobre-expresantes los niveles de transcritos son elevados en condiciones normales de crecimiento, incluso en la *OEPKC3* los niveles de transcritos de *PpPKC* son mayores que los observados en las plantas wt tratadas con elicitores de *P.c. carotovorum*.

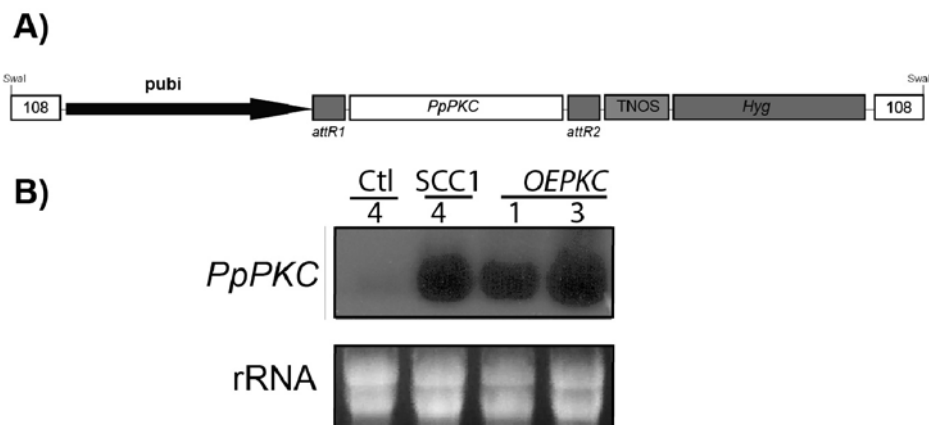


Figura 26. A) Esquema de la construcción génica *ubi:PpPKC*, contenido en el vector binario pTHubi, para la sobre-expresión de *PpPKC* en *Physcomitrella*. Promotor constitutivo ubiquitina, terminador TNOS; attR1 y attR2, sitios específicos para la recombinación LR. Posee un casete de selección que confiere resistencia a hygromicina (Hyg) y contiene regiones 5' y 3' homólogas al locus 108 de *Physcomitrella* (Schaefer & Zrýd, 1997). B) Análisis por *Northern blot*, de la expresión de *PpPKC* en diferentes líneas transgénicas. Se analizaron muestras de ARN extraídas a partir de plantas wt tratadas con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* durante 4 horas y plantas wt y sobre-expresantes sin tratar.

Dado que durante la transformación de *Physcomitrella* se pueden generar plantas poliploides, debido a la fusión de protoplastos (Schween 2005), se chequearon mediante citometría de flujo el nivel de ploidía de las plantas transgénicas en comparación con las plantas salvajes. Este estudio mostró que las plantas sobre-expresantes *OEPKC1* y *OEPKC3* son haploides al igual que las plantas salvajes (Figura 27).

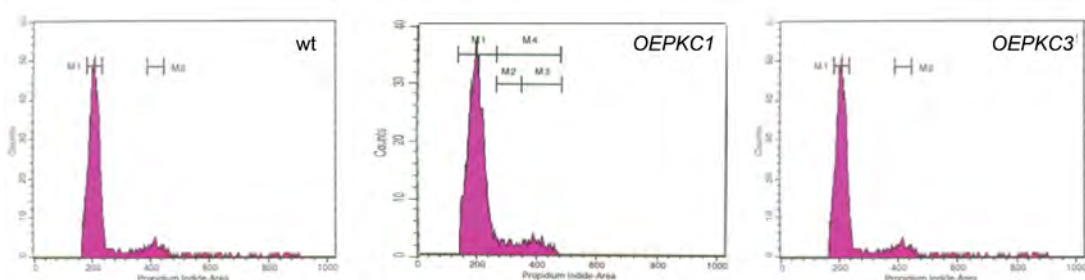


Figura 27. Diagramas de citometría de flujo obtenidos para plantas de tipo salvaje de *Physcomitrella* y para las dos líneas sobre-expresantes *OEPKC1* y *OEPKC3*.

4.2.1.6 Respuesta durante el desarrollo y crecimiento de *Physcomitrella*

Para evaluar el efecto de la expresión de *PpPKC* durante el desarrollo, se analizó el crecimiento de plantas transgénicas y el genotipo wt en condiciones normales de crecimiento. Se realizó una

evaluación visual del crecimiento a lo largo del tiempo y se tomaron fotografías. Para ambas líneas transgénicas no se observaron diferencias en la morfología ni en el diámetro de las colonias respecto a las plantas wt (datos no mostrados).

Physcomitrella crece la mayor parte de su ciclo de vida en estado haploide. Se puede inducir el paso al estado de esporofito sometiendo las plantas a bajas temperaturas (15-16 °C) y fotoperíodo de día corto durante dos meses. No se observó la generación del esporofito, y por lo tanto tampoco esporas viables en la línea *OEPKC3*, a diferencia de lo observado para la línea *OEPKC1* y wt (Figura 2 del Anexo). Estudios transcriptómicos realizados por otros investigadores revelan que el 12% del transcriptoma de *Physcomitrella* en estado de gametofito haploide se ve alterado en la transición al estado de esporofito, siendo el metabolismo de carbohidratos uno de los más afectados. Esto también se reflejó en la alteración de los niveles de transcripción de genes implicados en el almacenamiento de carbono y la formación de la pared celular (O'Donoghue *et al.*, 2013). Según los datos de expresión obtenidos con el Genevestigator, el gen Phypa_105033 tiene niveles de expresión bajos en el estado de esporofito en comparación con el protonema y gametofito. La acumulación inapropiada de transcriptos así como productos derivados de la actividad enzimática de esta policétido ciclasa putativa podrían estar alterando la transición a la fase esporofítica en la línea *OEPKC3*.

4.2.1.7 Respuesta frente al ataque de patógenos

La obtención de dos líneas sobre-expresantes de *PpPKC* permite identificar algún fenotipo asociado con la mutación generada. Dado que los transcriptos de *PpPKC* se acumulan en respuesta al tratamiento con el CF de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y *B. cinerea*, lo primero que se analizó en este trabajo fue la muerte celular generada por diferentes tipos de patógenos en las líneas sobre-expresantes comparado con plantas wt. Para ello se realizaron varios tratamientos con elicitores y patógenos que inducen muerte celular y se cuantificó el nivel de muerte celular mediante tinción con azul de Evans. El colorante azul de Evans es excluido de las células viables y células en los estadios tempranos de PCD, las cuales mantienen las membranas plasmáticas intactas (Turner y Novacky 1974; O'Brien *et al.*, 1997). Las tinciones con azul de Evans se realizaron según Levine *et al.* (1994) como se describe en la sección 3.11.1 de Materiales y Métodos.

Para los tratamientos con los CFs de las cepas SCC1 y SCC3193 de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*, respectivamente, así como para la suspensión de esporas de *B. cinerea* se realizaron seis experimentos independientes. Las tinciones con azul de Evans se realizaron a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Los resultados obtenidos para los tratamientos con los CFs no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos ($p \leq 0,05$) (datos no presentados). Los resultados reflejan que las líneas sobre-expresantes de *PpPKC*, y la probable acumulación constitutiva de esta proteína no conduce a disminuir los niveles de muerte celular generados por

elicitors de *Pectobacterium* o esporas de *B. cinerea*. Esto sugiere que la presencia de PpPKC en los tejidos vegetales de *Physcomitrella*, no contribuye a contener la muerte celular generada por este tipo de patógenos, ya sea porque las defensas activadas y/o los compuestos generados no son efectivos contra estos patógenos. En este punto es importante destacar, que estos patógenos desencadenan muerte celular en los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD (Ponce de León *et al.*, 2007; Ponce de León *et al.*, 2012).

A continuación se evaluó la capacidad de las líneas sobre-expresantes de conferir resistencia a *P. irregulare*. Estudios previos de nuestro grupo indican que *Physcomitrella* activa múltiples respuestas frente a dicho oomicete, incluido el reforzamiento de la pared celular, la inducción de los genes de defensa CHS, LOX y PAL, y la acumulación del precursor del JA, el ácido fitodienoico (OPDA). Sin embargo, las respuestas que se disparan en *Physcomitrella* no son suficientes, y la infección no puede ser impedida, lo que conduce a la colonización de los tejidos del musgo por las hifas del oomicete (Castro *et al.*, 2009).

Para evaluar el efecto de la expresión de PpPKC en la respuesta de defensa frente a *P. irregulare*, se analizaron la colonización y el crecimiento de *P. irregulare*, los síntomas de enfermedad y la muerte celular generada en plantas transgénicas y wt. Después de 24 horas de la inoculación, las hifas de *P. irregulare* crecieron notoriamente en la parte superior de colonias de genotipo wt, siendo mucho menor el crecimiento en las líneas sobre-expresantes, especialmente en la línea OEPKC3 (Figura 28).



Figura 28. Colonias de tres semanas de *Physcomitrella* salvajes y líneas sobre-expresantes OEPKC1 y OEPKC3 inoculadas con plugs conteniendo el micelio de *P. irregulare*.

Para evaluar la colonización de *P. irregulare* en los distintos genotipos se tiñeron gametóforos de líneas sobre-expresantes y wt con el colorante solofenil, el cual tiñe la pared del oomicete y se observaron los tejidos por microscopía de epifluorescencia (Figura 29, parte A). A nivel de hoja, las líneas *sobre-expresantes* presentan menor proliferación del oomicete en comparación con plantas wt (Figura 29, parte A). Con el objetivo de determinar si las transgénicas presentaban una alteración en los niveles de muerte celular generados por *P. irregulare* con respecto a plantas wt, se trataron colonias de los sobre-expresantes y wt con plugs conteniendo el micelio de *P. irregulare*. Para los tratamientos se realizaron seis experimentos independientes. Las tinciones con Azul de Evans se realizaron a las 24 horas post-tratamiento. Los resultados obtenidos para los tratamientos con *P. irregulare* se muestran en la Figura 29, parte B. Se detectaron diferencias en

los niveles de muerte celular en plantas *PpPKC* respecto a las plantas wt frente al tratamiento con *P. irregulare*. Para ambas líneas sobre-expresantes, la menor captación de azul de Evans ocurre en la línea *OEPKC3*. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos mediante análisis de *Northern blot* de las líneas sobre-expresantes, en los que el nivel del transcrito del gen *PpPKC* es mayor en la línea *OEPKC3*. A continuación se procedió a evaluar si existían diferencias significativas entre las plantas wt y las líneas sobre-expresantes frente al tratamiento con *P. irregulare*. En primer lugar, el ANOVA no detectó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas wt y la línea *OEPKC1*. Por el contrario, sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,05$) entre plantas wt y *OEPKC3* en respuesta al tratamiento con *P. irregulare*. Finalmente, para cuantificar el crecimiento del micelio durante las etapas iniciales de la infección, cuando los síntomas no son evidentes, se aisló el ADN total y se realizó una PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos para *P. irregulare* y *Physcomitrella*. Como se muestra en la Figura 29 parte C, la biomasa de *P. irregulare* a las 24 horas es significativamente menor en los tejidos de las plantas sobre-expresantes respecto a las plantas wt.

En suma, los análisis fenotípicos cuantitativos de muerte celular y cuantificación del patógeno apoyaron los resultados cualitativos observados inicialmente, mostrando que *P. irregulare* coloniza y profiera más en los tejidos de plantas wt comparado con los sobre-expresantes, dando lugar a una mayor muerte celular y daño de los tejidos.

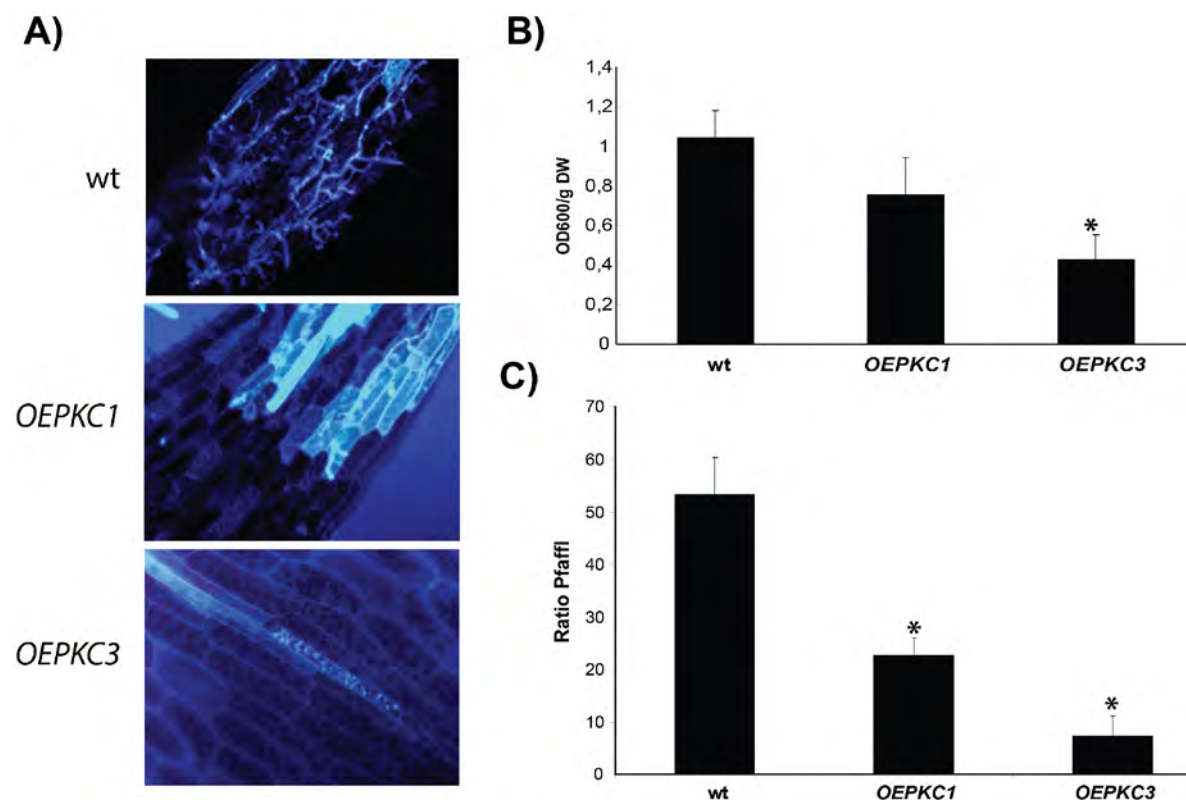


Figura 29. A) Tinción con solofenil de protonema y hojas de plantas wt y sobre-expresantes infectadas con *P. irregulare* durante 24 horas. B) Evaluación de la muerte celular en plantas salvajes: wt, *OEPKC1*, *OEPKC3* luego de 24 h de tratamiento con plugs conteniendo el micelio de *P. irregulare*. C) Los niveles de ADN de *P. irregulare* a un día post-tratamiento en los distintos genotipos se estimaron por qPCR adaptado de Pfaffli (2001), normalizando contra los contenidos ADN de la planta como una referencia endógena y con respecto a

tiempo 2 horas de la evolución en el tiempo de la infección. Todos los tratamientos se realizaron con colonias de 3 semanas crecidas en medio normal con celofán.

Con el objetivo de determinar si existen cambios en la pared celular de las líneas sobre-expresantes y plantas salvajes se realizaron tinciones para visualizar la acumulación de compuestos fenólicos en la pared de las células vegetales y deposición de calosa. Tejidos de *Physcomitrella* wt, *OEPKC1* y *OEPKC3* en condiciones normales de crecimiento fueron teñidos con safranina-O, un colorante que permite visualizar la presencia de compuestos fenólicos (Figura 30). La tinción con safranina-O indica que existe un enriquecimiento basal de compuestos fenólicos, en algunas células del borde de la hoja, evidenciados como acúmulos, en las líneas *OEPKC1* y *OEPKC3* respecto a las plantas wt. En las células del protonema no se observaron diferencias claras con safranina-O entre los diferentes genotipos. Sin embargo, en el tejido de protonema de ambas líneas sobre-expresantes en condiciones normales de crecimiento teñidas con solofenil, se observa la acumulación de la señal fluorescente a diferencia de la wt, lo cual podría estar asociado a una modificación de la pared celular (Figura 3 del Anexo) y no se observan diferencias claras entre los diferentes genotipos a nivel de hoja. Dado que no se sabe a qué compuestos se une el fluoróforo solofenil (Castro *et al.*, 2009), no podemos determinar el tipo de modificación que ocurren a nivel de la pared celular.

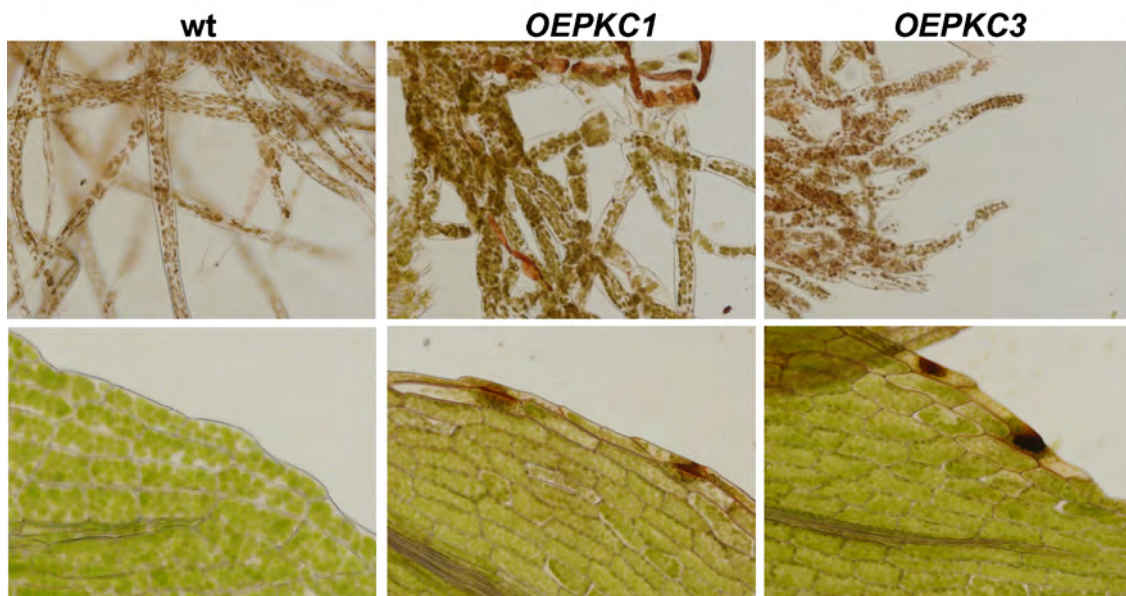


Figura 30. Incorporación de compuestos fenólicos en las paredes de células de protonema y hojas de *Physcomitrella* wt y líneas sobre-expresantes *OEPKC1* y *OEPKC3* en condiciones normales de crecimiento, mediante tinciones con safranina-O.

Tanto la safranina como el solofenil detectan acumulación de compuestos fenólicos. Dado que con la safranina detectamos acumulación de compuestos fenólicos en hoja y no en protonema en las líneas sobre-expresantes respecto a las wt y con solofenil observamos acumulación de compuestos en protonema y no en hoja de las líneas sobre-expresantes, esto probablemente indique que en ambos tejidos se estén produciendo compuestos diferentes.

La calosa es un polímero β -1,3-glucano sintetizado entre la pared celular y la membrana plasmática. La deposición de calosa hace que la pared celular sea menos vulnerable a la infección y la degradación del patógeno mediante CWDEs. Con el fin de analizar si la sobre-expresión de la proteína codificada por PpPKC induce la deposición de calosa en los tejidos de *Physcomitrella*, protonema de líneas transgénicas y el genotipo wt, creciendo en condiciones normales, fueron teñidos con azul de metilo. Los resultados muestran que los filamentos de protonema de la línea *OEPKC3* acumulan depósitos de calosa (Figura 31).

Los resultados obtenidos muestran que los tejidos de las líneas transgénicas presentan fortificación de la pared celular, evidenciadas por la incorporación de compuestos fenólicos y deposición de calosa, siendo mayor en la *OEPKC3*, la cual presenta mayores niveles de transcripto en condiciones normales de crecimiento.

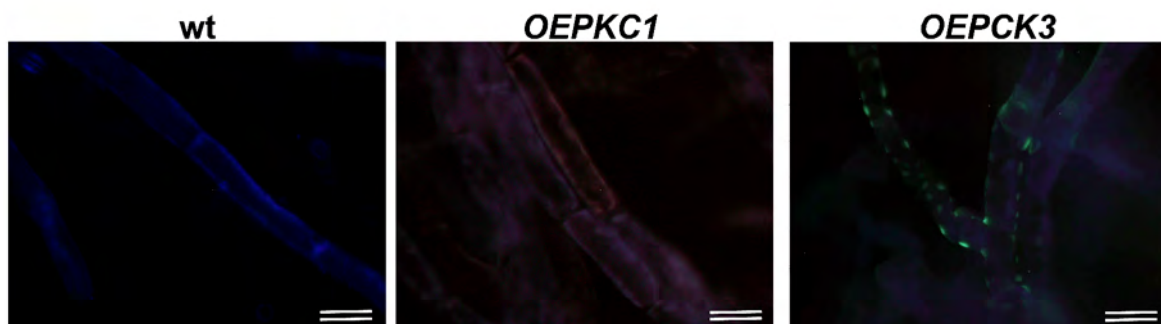


Figura 31. Deposición de calosa en protonema de *Physcomitrella* wt y líneas sobre-expresantes *OEPKC1* y *OEPKC3* en condiciones normales de crecimiento. Los depósitos de calosa aparecen como manchas verdes fluorescentes. La barra de escala representa el 20 μ m.

4.2.1.8 Generación y caracterización molecular de líneas de *Arabidopsis* que sobre-expresan *PpPKC*

Con el objetivo de analizar el efecto de la expresión heteróloga del gen *PpPKC* de *Physcomitrella*, se transformaron plantas de *Arabidopsis* con la construcción 35S:PpPKC-GFP. Utilizando el método de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* mediante el procedimiento de inmersión floral. Se obtuvieron 20 líneas que fueron seleccionadas en base a su resistencia a kanamicina durante dos generaciones (plantas T2) y se realizaron extracciones de ADN para la caracterización molecular de las mismas. La presencia del gen *PpPKC* en el genoma de las líneas obtenidas fue analizada por PCR utilizando los cebadores específicos para amplificar completamente la región codificante del gen. Se analizó la expresión del transgén en las líneas confirmadas por medio de RT-PCR. Se observó una acumulación significativa del transcripto correspondiente al gen *PpPKC* en las distintas líneas, de las cuales se muestran cinco que fueron seleccionadas para estudiar la acumulación a nivel de proteína (Figura 32, parte A).

Debido a que las plantas que sobre-expresan el gen *PpPKC* contienen además el gen codificante para la proteína fluorescente GFP, el análisis de la expresión de los transgenes se realizó también mediante la visualización de hojas y raíz de diferentes líneas resistentes al antibiótico de selección

en un microscopio de epifluorescencia. La mayoría de las líneas analizadas expresaron la proteína de fusión con GFP. A partir de la distribución e intensidad de la fluorescencia de la proteína de fusión con GFP, se seleccionaron las líneas 1, 2 y 5 para estudiar en mayor profundidad. Por otro lado, y dado que la PpPKC está fusionada a GFP, se llevaron a cabo estudios por Western blot en las líneas de *Arabidopsis* que exhibían fluorescencia debido a la expresión de GFP. Se extrajeron proteínas de las líneas 1, 2 y 5 crecidas en condiciones normales, se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó la detección de la proteína PpPKC (Figura 32, parte B). Además, se agregó como control positivo una línea que expresa GFP libre. Los resultados fueron concordantes con la intensidad de fluorescencia de los análisis por microscopía. Una banda de aproximadamente 58 kDa consistente con el tamaño esperado para la proteína de fusión PpPKC-GFP se observó en las tres líneas analizadas. Se observó una banda adicional de peso molecular 27 kDa en todos los experimentos correspondiente al clivaje de la GFP. En la Figura 32 parte C, se muestran las tres líneas seleccionadas en base a los niveles de transcritos y proteínas de fusión acumulados.

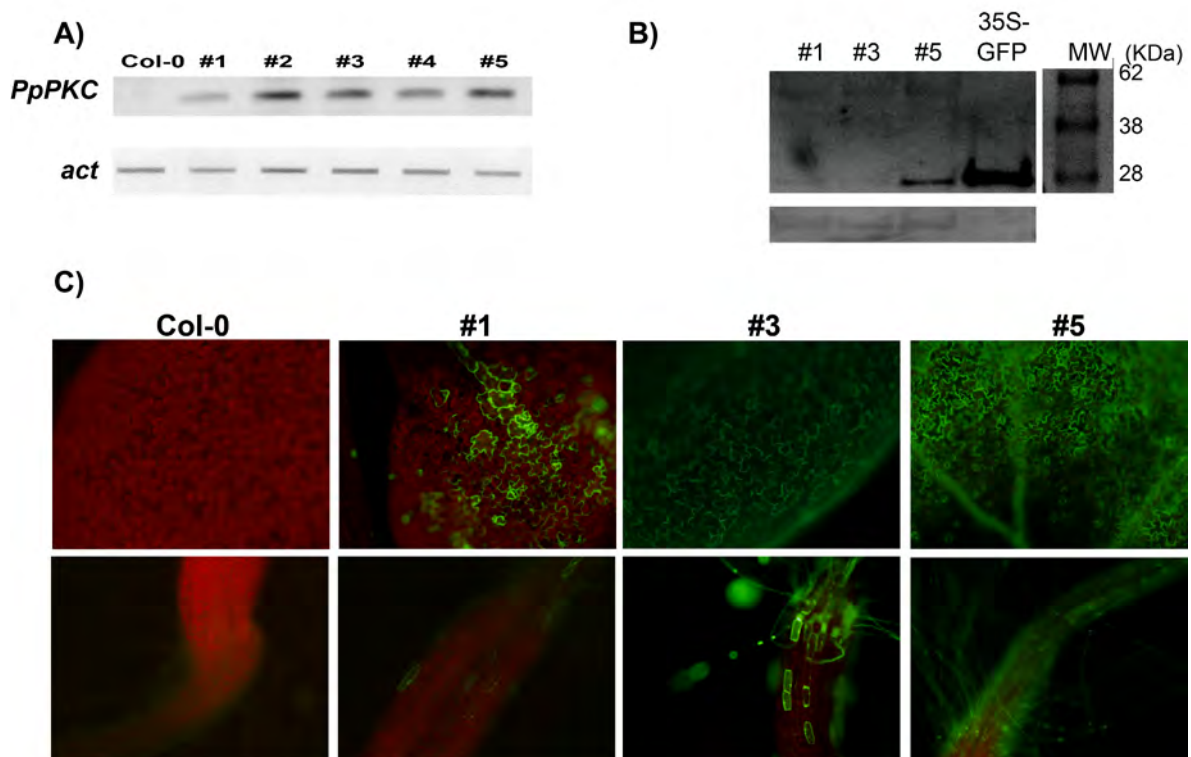


Figura 32. A) RT-PCR de diferentes líneas transgénicas de *Arabidopsis* resistentes al antibiótico de selección. PCR a partir de ADNc de líneas transformadas y plantas Col-0. act, actina utilizado como control de la calidad y concentración de los ADNc, B) *Western blot* mostrando la acumulación de PpPKC-GFP en las distintas líneas transgénicas. Carriles: 1) Línea 1, 2) línea 2, 2) línea 5 y 4) línea de Col-0 que expresa GFP libre. Como control de carga de proteínas se utilizó tinción de la subunidad grande de la Rubisco C) Microscopía de fluorescencia de las plantas Col-0 y líneas sobre-expresantes de PpPKC fusionada a GFP a nivel de hoja y raíz.

4.2.1.9 Análisis fenotípicos preliminares

Para determinar si las líneas sobre-expresantes presentan cambios en los niveles de susceptibilidad frente a patógenos, se analizó el daño celular de los tejidos después del tratamiento con plugs de

micelio de *P. irregulare* y el tratamiento con la suspensión de esporas de *B.cinerea*-GFP como se describe en la sección 3.3.1 de Materiales y Métodos.

El tratamiento con la suspensión de esporas de *B. cinerea*-GFP no reflejó diferencias en la susceptibilidad al patógeno entre los distintos genotipos (datos no presentados).

En la Figura 33 se muestran los síntomas de enfermedad en las plantas transgénicas y Col-0 que fueron infectadas a nivel de raíz con plugs de PDA conteniendo micelio de *P. irregulare*. En esta forma de infección, *P. irregulare* penetra a los tejidos de la planta a través de la raíz y coloniza el tallo y el resto de los tejidos, lo cual se refleja en un marchitamiento y decaimiento de la parte aérea (Adie *et al.*, 2007). Las plantas Col-0 presentaron una mayor propagación del oomicete a nivel de raíz en comparación con las líneas sobre-expresantes. A nivel de la parte aérea las líneas sobre-expresantes presentan menor marchitamiento del tallo y de las flores en comparación con las salvajes.

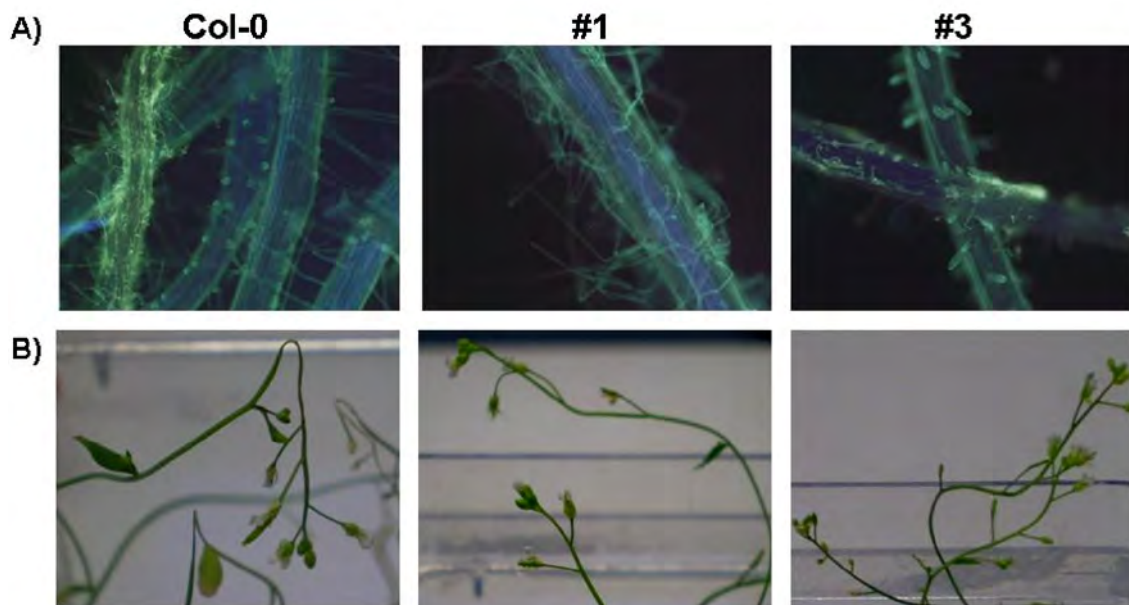


Figura 33. A) Propagación de la infección con *P. irregulare* a través de las raíces de las plantas transgénicas y plantas Col-0. Las raíces fueron teñidas con solofenil. B) Marchitamiento de la parte aérea de plantas transgénicas y plantas Col-0 en etapas avanzadas de la infección.

A partir de los perfiles de expresión del gen *PpPKC* en *Physcomitrella* se determinó que dicho gen se induce en respuesta a elicitores así como diferentes tipos de estrés abiótico como NaCl, manitol, y altas temperaturas. Para determinar el efecto de la expresión del gen *PpPKC* en la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis*, se realizaron varios ensayos preliminares *in vitro* y tierra en diferentes condiciones de estrés osmótico y salino.

Antes de comenzar, se observó que en condiciones de ausencia de estrés, el crecimiento de las líneas transgénicas es similar al de las plantas salvajes. Se observaron diferencias contrastantes entre genotipos durante el crecimiento de las semillas en respuesta a estrés salino. Estas condiciones fueron impuestas por la adición al medio de cultivo vegetal MS2 al 1/2 de NaCl a una

concentración de 150 mM. La germinación de los distintos genotipos en condiciones normales y estrés fue monitoreada a lo largo del tiempo y se realizó un registro fotográfico de su fenotipo 15 días después. Luego de este período de crecimiento se pudo observar que las plantas transgénicas habían desarrollado dos hojas verdaderas en condiciones de estrés salino, mientras que las plantas salvajes mantenían su estado de dos cotiledones (Figura 34 parte A y B).

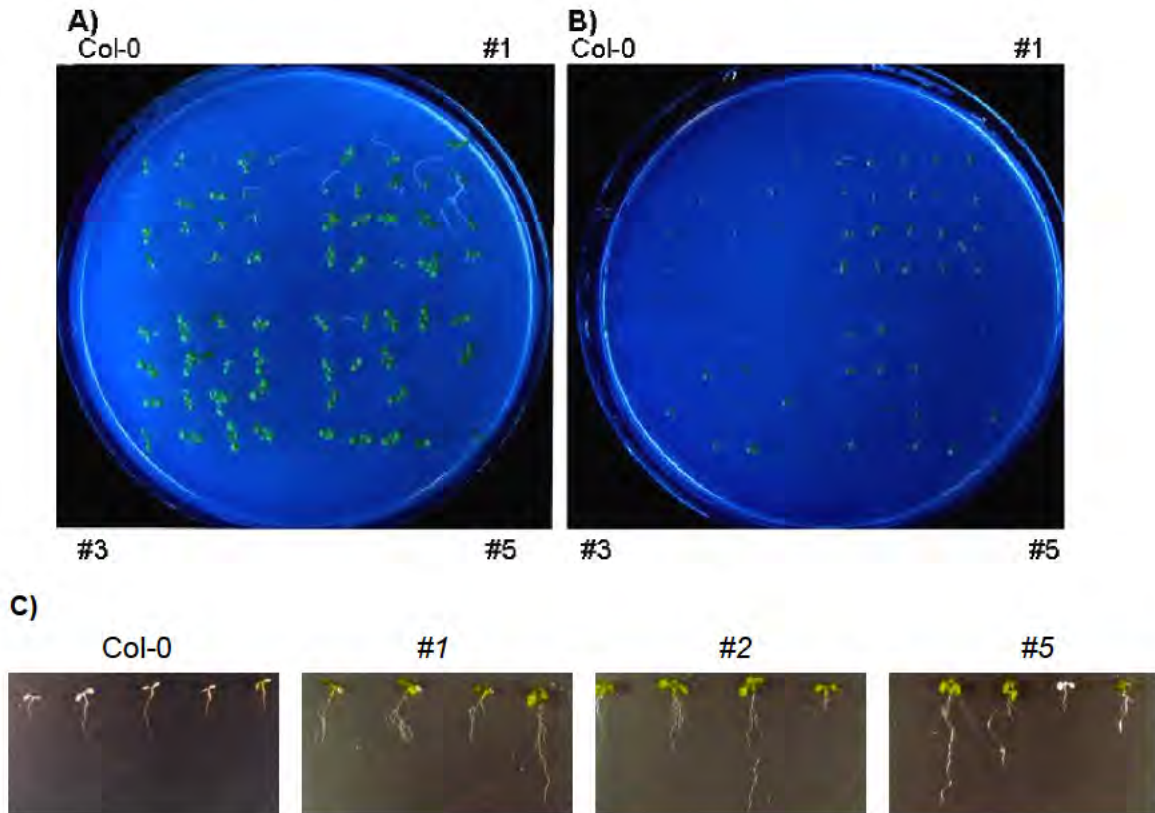


Figura 34. A) Germinación en medio MS y B) Germinación en medio MS suplementado con NaCl 150 mM luego de 7 días. Plantas salvajes (Col-0), y líneas transgénicas #1, #2 y #5. C) Crecimiento en medio MS suplementado con NaCl 150 mM luego de 7 días. Plantas salvajes (Col-0), y líneas sobre-expresantes 1, 2 y 5.

Además, se evaluó el desarrollo de las líneas transgénicas en condiciones de estrés salino y se comparó con el genotipo Col-0. En la Figura 34 parte C se muestran los resultados obtenidos a partir de la evaluación visual del crecimiento a los 6 días de establecidos los tratamientos de estrés. Se observó para ambas líneas un crecimiento diferencial, en presencia de 150 mM de NaCl, tanto en la parte aérea como en las raíces en comparación con plantas Col-0.

Con el objetivo de comparar el fenotipo resultante de la imposición de un estrés salino a plantas crecidas en condiciones *in vitro*, con el fenotipo de las plantas crecidas en tierra y sometidas a condiciones de estrés, se llevaron a cabo ensayos de estrés salino de las líneas transgénicas 1, 2 y 5. Las plantas fueron crecidas durante dos semanas en tierra y luego se regaron durante dos semanas con una solución NaCl 300 mM. Al cabo de 14 días de impuesto el estrés, se tomaron fotografías. Los resultados de estos experimentos claramente mostraron que la sobre-expresión de *PpPKC* en *Arabidopsis* aumentó significativamente la tolerancia al estrés salino en estas plantas comparado con Col-0 (Figura 35).

En suma, los análisis fenotípicos en *Physcomitrella* y *Arabidopsis*, demuestran que PpPKC participa en la resistencia a *P. irregulare* y en la tolerancia al estrés salino.

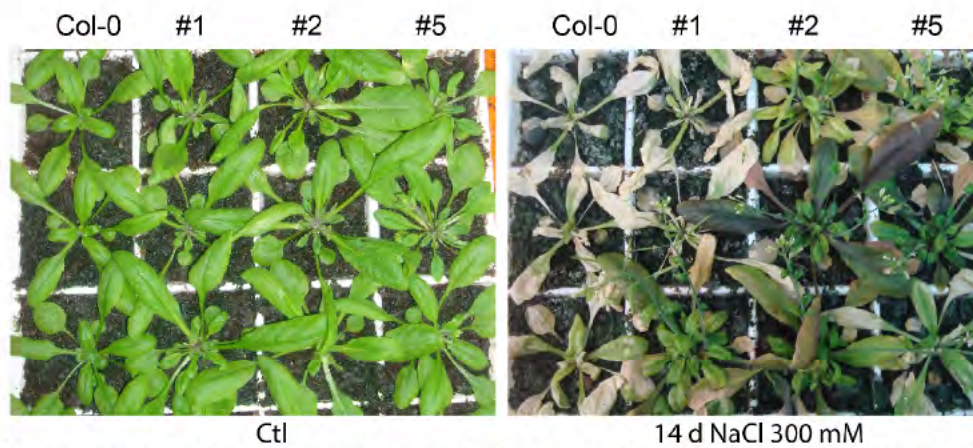


Figura 35. Crecimiento en tierra suplementado con NaCl 300 mM durante 14 días, de plantas salvajes (Col-0) y líneas transgénicas #1, #2 y #5.

4.2.2 Análisis funcional del gen PpBI-1 de *Physcomitrella* con homología al regulador anti-apoptótico Bax-inhibitor-1 de animales

Una vez que las proteínas receptoras de plantas reconocen la presencia de patógenos, se activan las vías moleculares que conducen a la activación de mecanismos de defensa. Uno de estos mecanismos es la respuesta hipersensible (HR), la cual, como se mencionó anteriormente, es una forma de muerte celular programada (PCD) que se produce en el sitio de infección con el fin de prevenir la propagación del patógeno (Heath 2000).

Entre los reguladores más importantes de la PCD, mucho interés han tenido las proteínas del tipo BCL2 como factores inductores de PCD (Hückelhoven *et al.*, 2004). Por otro lado, la proteína BAX inhibidor-1 (BI-1) ha sido implicada como un factor anti-PCD regulando la actividad de BAX en los procesos de desarrollo así como durante las respuestas frente a condiciones de estrés (Scorrano y Korsmeyer 2003; Sanchez *et al.*, 2000; Hückelhoven *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

En los últimos años, nuestro grupo ha demostrado que el oomycete *P. irregulare* y el hongo *B. cinerea* infectan los tejidos de *Physcomitrella* de diferentes formas (Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012). Si bien, ambos son patógenos necrotrofos, *B. cinerea* desencadena muerte celular en los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD mientras que *P. irregulare* no lo hace. Con el objetivo de estudiar este tipo de muerte celular en mayor detalle en este musgo, nos resultó interesante sobre-expresar un posible regulador de muerte celular y evaluar su capacidad de conferir resistencia a patógenos.

Cuando todavía no se tenía acceso a la información del genoma, se realizó una búsqueda en la base de datos de ESTs de *Physcomitrella* del National Institute for Basic Biology de Japón (<http://moss.nibb.ac.jp/>) utilizando la secuencia aminoacídica de At-BI1 de *Arabidopsis* (AtBI-1; gi:834758), con el objetivo de identificar una secuencia homóloga a BI-1 en *Physcomitrella*. A partir de la búsqueda en el genoma de *Physcomitrella*, se identificó el contig 6085, el cual contiene el clon pphb21j10 cuya secuencia disponible tiene homología con el extremo 5' y 3' de AtBI-1. Se encargó el clon pdp02459 al centro RIKEN Biological Research Center en Japón, y su identidad fue confirmada por secuenciación utilizando cebadores específicos.

Posteriormente la secuencia fue analizada en la base de datos del genoma de *Physcomitrella* y se comprobó que correspondía al gen Phypha_185792. De acuerdo al análisis de secuencia nucleotídica, el marco abierto de lectura da lugar a una proteína de 27,9 kDa que se denominó PpBI-1. El gen *PpBI-1* consta de seis exones y cinco intrones, estructura génica similar a su homólogo en *Arabidopsis* y arroz. Utilizando la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen *PpBI-1*, se realizaron búsquedas de genes homólogos de *PpBI-1* en el genoma de *Physcomitrella* mediante BlastP en la base de datos Phytozome y no se identificaron otros genes con alta homología con *PpBI-1*.

PpBI-1	1	MDYAAFFFEGRGSO----WNYNSLKNFNAISTAVQHLQRVYMTLAATVLLISAVGVYTHLWLN--IGGII
AtBI-1	1	MDAFSFEEDSQPGS--RSRYSYDSLKNFRQISPAVQNHKRVYLLTCCALVASAFGAYLHVWLN--IGGII
OsBI-1	1	MDAFY-LTSSAYGAAASGTGYDSLKNFRQISPAVQSHLKLIVYLLTCCALVASAVGAYLHVWLN--IGGII
MmBI-1	1	MN----IFDRK-----INEDALLKFSHTPESTQOHLKRVYASFAALCMFVAAAGAYVHVVTHTFIQAGLL
SmNI-I	1	MD----FEE-RSSS-----WNYGALKNFHRITSEPVKRHVRQVYWTVALALVSAVGVYAHVWLN--IGGII
NtBI-1	1	MESCTSFENSQSASSRNRFSDYDSLKNFRQISPFVQTHLKRYYLSTCCALVASAAGAYLHVWLN--IGGII
HsBI-1	1	MN----IFDRK-----INEDALLKFSHTPESTQOHLKRVYASFAALCMFVAAAGAYVHVVTHTFIQAGLL
PpBI-1	65	TSILFLIGASTWLAIVTPSTAENENKRIQLLCAAALCEGASLGTLLVGVLOENPSIVMFAFLGSAITAEACFT
AtBI-1	67	TTICICIGTMIWLLSCEPYE--HOKRISLLEFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSILITAFVGTALAEVCFCS
OsBI-1	68	TMLCCVGSIAWLFVVEVFE--ERKRFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVIDFSSILVYAFVGTALAEVCFCS
MmBI-1	60	SALCGLALMIWLMATPHSHETEOKRLLAGFAFITGVLGPALELCIAVNPSIILETAFVGTAMIEFCFS
SmNI-I	60	TTICFLGCSFALMNTSSSYAAGKRWNNWMAAFCEGASLGNFVGVAVIEFDPSILVYAFVGTAVAEVCFCS
NtBI-1	69	TTICCVGSIVWLMATPLYE--EOKRIALLMAALFKGASITGPIELALVIDFDPSTIVIGAFVGTAVAEVCFCS
HsBI-1	60	SALCGLIILMIWLMATPHSHETEOKRLLAGFAFITGVLGPALELFCIAVNPSIILETAFVGTAMIEFCFT
PpBI-1	135	GAALVAKRREYFLGGILSSVISMMIMMCGSMVEVGRGAFMENVLYLGLAVFVGVYVLEDTQMIIEKAHL
AtBI-1	135	AAAMVARRREYFLGGILSSGLSMLMWCFASSIFGGSASTFKFELYFGLLIFVGMVVDVQEIIEKAHL
OsBI-1	136	CAALVAKRREYFLGGILSSGLSILLWLCFAASIFGHSTGSEMFVYFGLLIFVGMVVDVQEIIEKAHL
MmBI-1	130	LSALVARRRSYFLGGIILSAMSLLSSLGNLFFG--SIWLFQANLYLGLLVMCGEVLEDTQMIIEKAHL
SmNI-I	130	GAALVAKRREYFLGGIILSATSSMLTTHVLSSEFPGAALMFEVELYGGILLVVGVIYVLEDTQMIIEKAHL
NtBI-1	137	AAAMVARRREYFLGGILSSGLSIFWLFHASSIFGGSMALEKFEVYFGLLVFVGVYVLEDTQMIIEKAHL
HsBI-1	130	LSALVARRRSYFLGGIILSALSLLSSLGNVFFG--SIWLFQANLYVGLVVMCGEVLDTQMIIEKAHL
PpBI-1	205	GDYDYKHAALDLEDFVAVFVRIIVIMTKNAERERKDRERRRRRD
AtBI-1	205	GDMDYVKKHSLTLEDFVAVFVRIIVIMTKNSADK--EKKKKRRN--
OsBI-1	206	GDYDYKHAALDLEDFVAVFVRIIVIMTKNSADKSEEKRRKRS--
MmBI-1	199	GDKDYIWHCVDLEDFVVTIRKILMLLAFNEKDRKKKKK-----
SmNI-I	200	GDMDYKHAALDLEDFVAVFVRIIVILVSVHTRFHWT-----
NtBI-1	207	GDYDYKHAALDLEDFVAVFVRIIVIMTKNSADR--EKKKKRRN--
HsBI-1	199	GDDYIWHCVDLEDFVIRKILMLLAFNEKDRKKKKK-----

Figura 36. Alineamiento de secuencias aminoácidas predichas de BI-1 a partir de plantas y mamíferos. El dominio C-terminal conservado para cada BI-1 se muestra en un recuadro. Los números de acceso para cada BI-1 son: *Physcomitrella* (Pp) (A9SK21), *Arabidopsis* (AY091134), *Mus musculus* (Mm) (BAC29575), *Oryza sativa* (Oz) (AB025926), *Selaginella moellendorffii* (Sm) XP_002969696, tabaco (Nt) (AF390556) y *Homo sapiens* (Hs) (NP003208)

Las proteínas BI-1 son proteínas pequeñas (25 a 27 kDa) conservadas a lo largo de la evolución (Watanabe *et al.*, 2009). Como se puede observar en la Figura 36, las proteínas BI-1 de plantas y humanos son muy similares a lo largo de toda la secuencia aminoácida.

Las proteínas BI-1 contienen un extremo C-terminal altamente hidrofílico, que consiste en un tramo corto de aminoácidos cargados, una característica que se conserva entre las BI-1 de plantas y animales (Watanabe *et al.*, 2009). Como se observa en la Figura 36, las proteínas BI-1 de *Physcomitrella* y *Selaginella moellendorffii* (una licofita) presentan argininas (R) en vez de lisinas (K) en el extremo C-terminal.

4.2.2.1 Análisis de la expresión génica

Se decidió utilizar la herramienta informática GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) para extraer de las bases de datos información sobre la expresión de *PpBI-1* de *Physcomitrella* en diferentes estados de desarrollo y en diferentes condiciones de crecimiento y estrés, basada en el análisis de microarreglos de ADN. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 37.

Se observa una clara inducción del gen en respuesta a luz ultravioleta, durante la regeneración de protoplastos y durante la deshidratación. Respecto a su expresión en los distintos estadios de desarrollo, los resultados indican que *PpBI-1* se expresa durante la fase gametofítica con niveles superiores a los niveles de expresión en la fase esporofítica y durante la etapa de germinación de esporas.

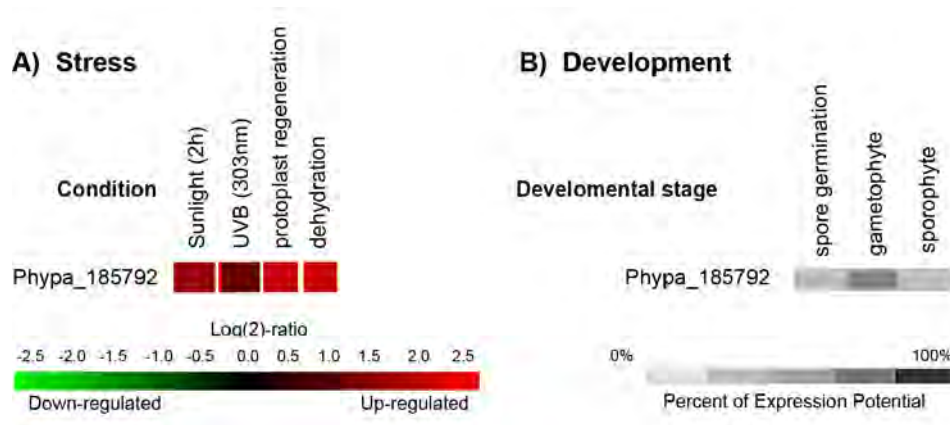


Figura 37. Patrón de expresión de *PpBI-1* en *Physcomitrella* según análisis con microarreglos de ADN. Los genes se han ordenado según sus relaciones filogenéticas. A) En respuesta a diferentes condiciones de estrés, B) en diferentes estados del desarrollo. Los que se muestran en la figura son los que pasaron la selección de tener un Fold Change mayor a 1.5 entre las dos condiciones evaluadas y un p-value mayor a 0.05.

Como un posible regulador de la PCD mediada por Bax, se ha demostrado que *BI-1* se induce en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico (Watanabe y Lam 2006). El perfil de expresión del gen *PpBI-1* frente a diferentes condiciones de estrés fue estudiado mediante *Northern blot*. El estrés biótico se realizó mediante tratamientos con los CFs de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* y la cepa SCC3193 de *P. wasabiae*, esporas del hongo *B. cinerea* y plugs conteniendo micelio de *P. irregulare*. Todos los tratamientos se realizaron sobre colonias de *Physcomitrella* de tres semanas, a partir de las cuales se extrajo ARN total para analizar mediante electroforesis y transferencia a membrana de nylon y su posterior hibridación con sondas marcadas radiactivamente.

Como se puede ver en la Figura 38, el gen *PpBI-1* es de baja expresión en condiciones normales y se induce frente al estrés biótico, en especial frente a tratamientos con elicitores de *Pectobacterium* y esporas de *B. cinerea*.

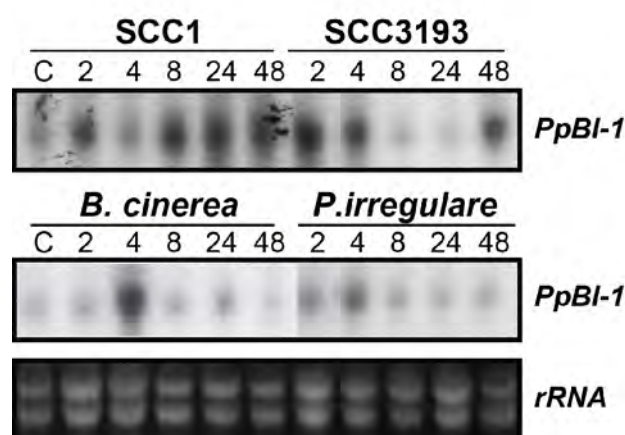


Figura 38. Perfil de expresión génica de *PpBI-1*. Análisis por *Northern blot* utilizando muestras de ARN de colonias de *Physcomitrella* en condiciones control (C) y en respuesta a patógenos. Los tratamientos de estrés biótico se realizaron durante 4 y 24 horas, tratamientos con los CF de las cepas SCC3193 y SCC1 de *Pectobacterium*; tratamientos con suspensión de esporas de *B. cinerea*; tratamientos con *plugs* conteniendo micelio del *P. irregulare*.

Finalmente se analizó el patrón de expresión del gen *PpBI-1* en respuesta a ABA y condiciones de estrés abiótico que generan estrés oxidativo incluyendo, el estrés salino, osmótico, térmico y radiación UV. De esta manera, se extrajo ARN total de colonias de *Physcomitrella* tratadas con ABA 100 μ M, NaCl 0,5 M, manitol 0,9 M, 37°C durante 24 horas y tratadas con radiación UVB durante 2 horas. Los resultados derivados de este análisis aparecen reflejados en la Figura 39. El gen *PpBI-1* se induce en respuesta a ABA y UVB.

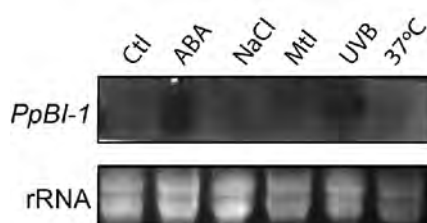


Figura 39. Perfil de expresión génica de *PpBI-1* en respuesta a tratamientos con: C: control; ABA: ácido abscísico 100 μ M NaCl: tratamientos con NaCl 0,5M; Mtl: tratamientos con manitol 0,9M; UVB: tratamiento con UVB durante 2 h; 37°C: tratamiento con temperatura de 37°C. Se extrajeron los ARN a las 24 h post tratamiento rRNA: ARN ribosomal, control de carga.

4.2.2.2 Determinación de la localización subcelular de PpBI-1

Estudios de predicción de topología indican que AtBI-1 posee siete dominios transmembrana (Xu y Reed, 1998; Kawai *et al.*, 1999) y se asocia a la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Kawai-Yamada *et al.*, 2001). En 2003, Bolduc *et al.* demostraron que la región C-terminal de BI-1 en *Brassica napus* (BnBI-1) se encuentra en el lado citosólico de la membrana del RE. En 2004, Yamada *et al.*, demostraron que el extremo C-terminal de AtBI-1 es esencial para inhibir la muerte celular mediada por BAX.

Con el fin de conocer la topología que puede adoptar la PpBI-1 de *Physcomitrella* se utilizó el servidor Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para realizar la predicción de la topología. Como se observa en la Figura 40 parte A, las proteínas BI-1 de *Physcomitrella* y humano adoptaron una topología similar conteniendo siete alfa hélices transmembrana seguidas de un dominio C-terminal expuesto al lado citosólico de la membrana del retículo endoplásmico.

Para determinar la ubicación subcelular de la proteína PpBI-1 se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco, con una construcción que dirige la expresión constitutiva de la proteína de fusión PpBI-1-GFP en hojas de tabaco. Para ello, se amplificó a partir de ADNc, la región codificante del gen *PpBI-1*, utilizando cebadores diseñados de manera tal que se eliminó el codón de terminación y se conservó el marco de lectura con la proteína GFP. La secuencia amplificada fue clonada en el vector de entrada pENTR2B y luego clonada por recombinación LR en el vector binario destino pK7FWG2, obteniéndose el vector de expresión *35S:PpBI-1-GFP* (Figura 40, parte B).

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco, determinaron un patrón de fluorescencia uniforme en el citoplasma, ya que no se observaron asociaciones con organelos o compartimentos subcelulares (Figura 40, parte C). Los resultados obtenidos no concuerdan con las predicciones bioinformáticas de la secuencia aminoacídica deducida de PpBI-1 que sugieren una localización asociada a membranas.

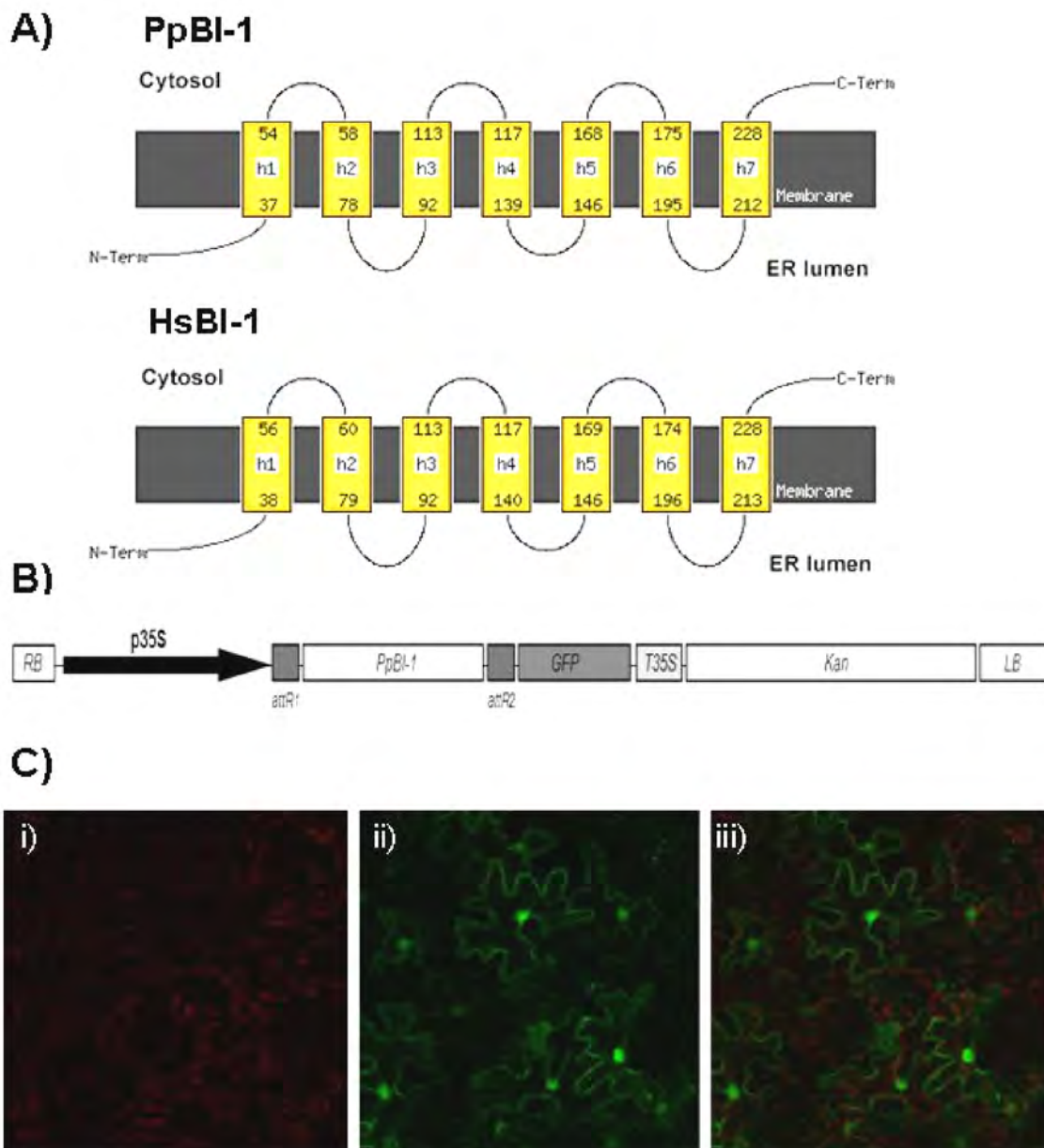


Figura 40. A) Modelo de topología de membrana para las proteínas BI-1 de *Physcomitrella* y humano, predicha por el servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). B) Esquema de la construcción génica, contenido en el vector binario pk7FGW2, para la expresión transitoria de la proteína de fusión BI-1-GFP en tabaco. promotor constitutivo p35S, terminador T35S; attR1 y attR2, sitios específicos para la recombinación LR; RB y LR, borde derecho y borde izquierdo respectivamente. C) Expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de tabaco para determinar la localización subcelular de la proteína PpBI-1 fusionada con GFP. i) Autofluorescencia de los cloroplastos ii) Patrón de acumulación de fluorescencia observado en hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción 35S:*PpBI-1*. iii) Imagen solapada del marcador fluorescente GFP (verde) (i), y la autofluorescencia de los cloroplastos en rojo (ii).

4.2.2.3 Generación y caracterización molecular de líneas de *Physcomitrella* que sobre-expresan PpBI-1

Con el objetivo de determinar la contribución del gen *PpBI-1* durante el desarrollo normal de los tejidos de *Physcomitrella* así como en condiciones de estrés, se realizó una construcción génica en el vector pTHubi, que permite la expresión del gen bajo la regulación del promotor constitutivo ubiquitina. La secuencia correspondiente al ADNc fue amplificada por PCR, utilizando como molde el clon pphb21j10. Los cebadores utilizados, los cuales se diseñaron generando sitios de restricción para el subclonado orientado en el vector de entrada pENTR2B, así como las condiciones de la PCR se realizaron tal como se describe en la sección 3.6.2 de Materiales y Métodos. Se confirmó la presencia del fragmento mediante análisis de restricción y la identidad de la secuencia mediante secuenciación. Por último se llevó a cabo la reacción de recombinación entre el vector de entrada pENTR2B-*PpBI-1* y el vector binario destino pTHubi (Schaefer y Zrýd 1997) utilizando la tecnología Gateway. Este vector contiene los sitios attR1 y attR2 que permiten el clonado de un fragmento de ADN por recombinación homóloga, utilizando la clonasa LR. La inserción de una secuencia entre estos dos sitios permite la expresión de la misma bajo el control del promotor constitutivo ubiquitina. El vector obtenido se denominó ubi:*PpBI-1* (Figura 41 parte A).

Entre 10-30 µg de ADN lineal obtenido a partir de la digestión de ubi:*PpBI-1* con *Swa*I fueron utilizados para transformar protoplastos de *Physcomitrella*, y el procedimiento realizado fue el mismo que se detalla para la sobreexpresión de PpPKC. Luego de realizados los experimentos de transformación se obtuvieron dos clones al finalizar las etapas de selección denominados *OEBI-3* y *OEBI-6*.

4.2.2.4 Análisis de los transformantes

Dado que durante la transformación de *Physcomitrella* se pueden generar plantas poliploides, debido a la fusión de protoplastos (Schween, 2005), se chequearon mediante citometría de flujo el nivel de ploídia de las plantas transgénicas en comparación con el plantas salvajes. Este estudio mostró que las plantas sobre-expresantes *OEBI-3* y *OEBI-6* son haploides al igual que las plantas salvajes (datos no presentados).

Se procedió a examinar mediante *Northern blot*, los niveles de expresión del gen PpBI-1 en plantas wt y en las plantas que incorporaron la construcción, utilizando una sonda derivada del ADNc de *PpBI-1*. Para ello, se extrajo ARN de plantas wt tratadas durante 4 horas con una suspensión de esporas de *B. cinerea*, y plantas wt y sobre-expresantes sin tratar. Como se observa en la Figura 41 parte B, en las plantas wt el nivel de expresión del gen *PpBI-1* aumenta claramente a las 4 horas post tratamiento. En las líneas sobre-expresantes los niveles de transcripto son elevados en condiciones normales de crecimiento, incluso para ambas líneas los niveles de transcripto de *PpBI-1* son mayores que para las plantas wt tratadas con la suspensión de esporas de *B. cinerea*.

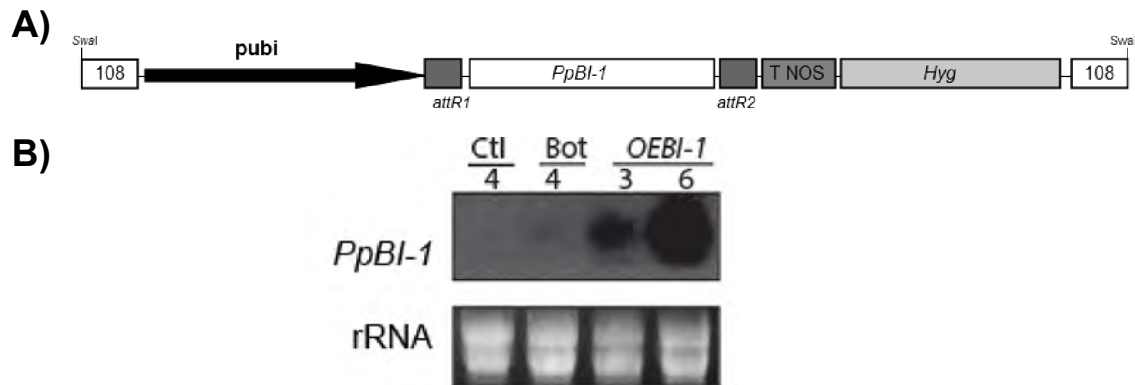


Figura 41. A) Esquema de la construcción génica *ubi:PpBI-1*, contenido en el vector binario pTHubi, para la sobre-expresión de *PpBI-1* en *Physcomitrella*. *pubi*: promotor constitutivo ubiquitina, terminador TNOS; *attR1* y *attR2*, sitios específicos para la recombinación LR. Posee un cassette de selección que confiere resistencia a hygromicina (*Hyg*) y contiene regiones 5' y 3' homólogas al locus 108 de *Physcomitrella* (Schaefer & Zrjyd, 1997). B) Análisis por *Northern blot* de la expresión de *PpBI-1* en líneas transgénicas. Se analizaron muestras de ARN extraídas a partir de plantas salvajes tratadas con una suspensión de esporas de *B. cinerea* 1×10^5 esporas/ml y sin tratar y muestras de ARN extraídas de las líneas sobre-expresantes sin tratar.

4.2.2.5 Respuesta durante el desarrollo y crecimiento de *Physcomitrella*

La PCD es esencial para mantener la homeostasis tisular en muchas formas de vida. En las plantas, de igual forma que en los animales, la PCD es el mecanismo por el cual se regulan una serie de procesos fisiológicos tales como la germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de semillas (Wu y Cheung 2000; Young y Gallie 2000; Stone *et al.*, 2003; Newbigin y Vierstra 2003). En plantas, la PCD es esencial para el desarrollo y supervivencia, por ejemplo las células del xilema una vez maduras pierden el contenido citoplasmático y lignifican sus paredes para dar origen a los vasos del xilema, encargados del transporte de nutrientes y agua, sustancias éstas fundamentales para la supervivencia de las plantas (Greenberg 1996).

4.2.2.5.1 Crecimiento de las colonias

Analizando los clones en mayor detalle se observó que las colonias de los clones sobre-expresantes presentaban un diámetro de la colonia menor al del genotipo salvaje. Las colonias del don denominado *OEBI6* además de ser más chicas que las de plantas salvaje son más chicas que las del sobre-expresante *OEBI3*. 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 42 parte A). Los resultados muestran que el diámetro de las colonias del sobre-expresante *OEBI-6* es significativamente menor al diámetro de colonias salvajes.

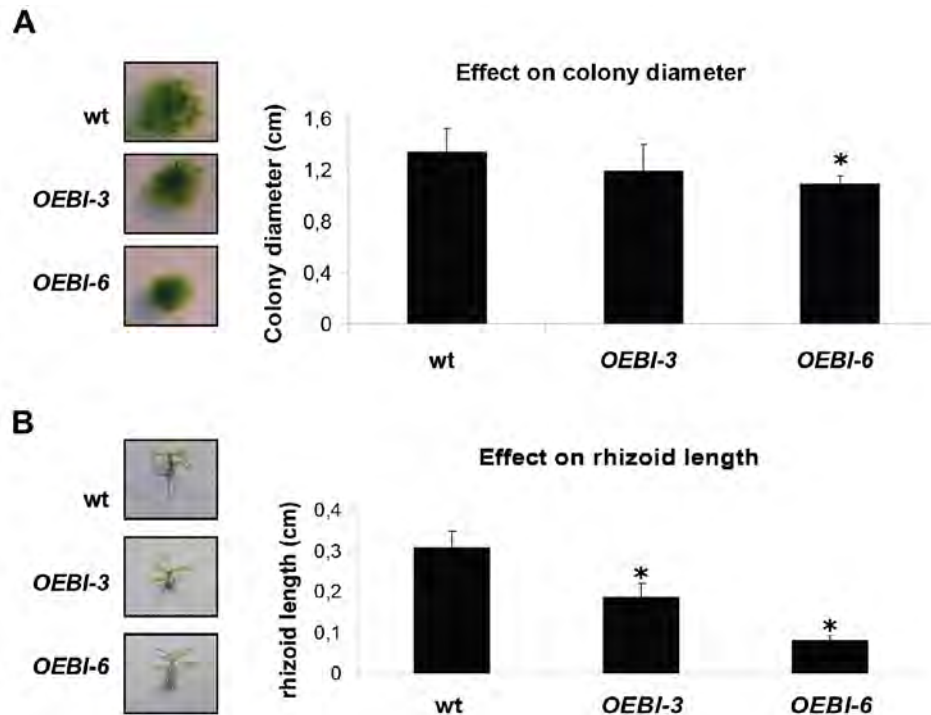


Figura 42. A) Efecto de la sobreexpresión en el diámetro de las colonias de *Physcomitrella salvaje* (wt) y sobreexpresantes (*OEBI-3* y *OEBI-6*) crecidas 3 semanas sin celofán y medida del diámetro de las mismas. Se realizaron 16 medidas independientes. Se utilizó el test estadístico de Kruskal-Wallis no paramétrico, $p < 0,001$. (*) B) Tinción con toluidina de rizoides de colonias de 3 semanas crecidas sin celofán de *Physcomitrella* wt, *OEBI-3* y *OEBI-6*. Medida del largo de los rizoides de *Physcomitrella* wt, *OEBI-3* y *OEBI-6*. Se realizaron 16 medidas independientes del largo de los rizoides. Se utilizó el test estadístico de Kruskal-Wallis no paramétrico, $p < 0,001$ (*).

4.2.2.5.2 Desarrollo de los rizoides

Mediante el análisis con la lupa de los gametóforos de plantas salvajes, *OEBI3* y *OEBI6*, se detectó que las plantas de los genotipos sobre-expresante presentaban rizoides más cortos en comparación con plantas salvajes. Para poder analizar con más detalle esta observación se realizaron tinciones con el colorante azul de toluidina y se analizaron los rizoides en un microscopio invertido (Marca: Olympus, Modelo: IX81, Cámara CCD: DP71). 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 42 parte B). Mediante el análisis estadístico se demostró que los rizoides de gametóforos salvajes son significativamente más largos en comparación con rizoides de los sobre-expresante *OEBI-3* y *OEBI-6*.

4.2.2.5.3 Regeneración a partir de protoplastos

Para estudiar en mayor detalle el crecimiento de las líneas sobre-expresantes en comparación con la wt, se obtuvieron protoplastos de los tres genotipos y se analizó la regeneración de los mismos a lo largo del tiempo. Como se muestra en la Figura 43 con el transcurso del tiempo las líneas sobre-expresantes presentan un menor crecimiento radial respecto a la wt.

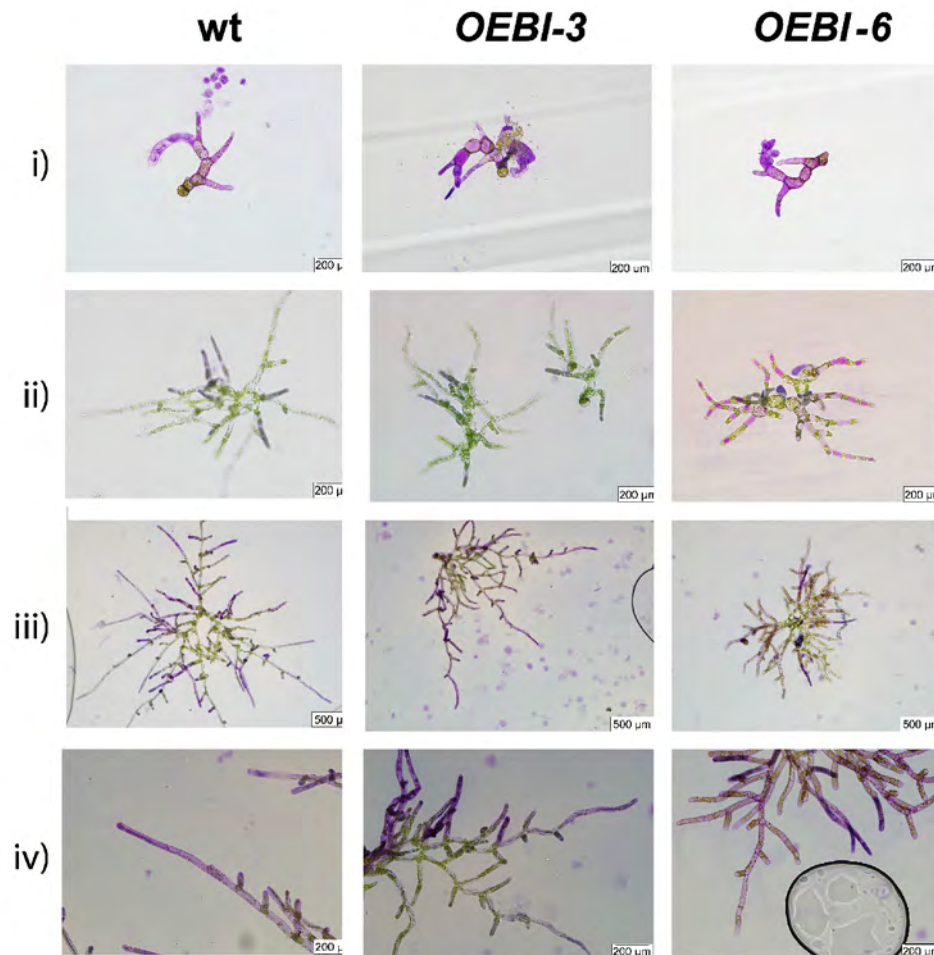


Figura 43. Tinción con toluidina de protoplastos de *Physcomitrella* salvaje y sobre-expresantes *OEBI-3* y *OEBI-6* regenerando. Se tomaron fotos representativas a los 2 (i), 5 (ii) y 8 (iii) días de tiempo de regeneración. iv) es una región ampliada de iii) para cada genotipo.

4.2.2.5.4 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 44 parte A). Dado que el cloronema crece más lentamente que el caulonema se decidió estudiar con más detalle lo que ocurre en el desarrollo de los tejidos del caulonema y cloronema. Para estudiar el desarrollo del caulonema se crecieron colonias salvajes y sobre-expresantes en condiciones que favorece el desarrollo de este tejido. Luego de tres semanas se realizó una tinción con azul de toluidina y se realizaron las observaciones mediante el uso de lupa y microscopio. Al medir el largo de los filamentos de este tejido de colonias de los tres genotipos, se determinó que la línea *OEBI-6* presenta células del caulonema significativamente más chicas respecto a las wt, mientras que para la línea *OEBI-3* no se observaron diferencias significativas (Figura 44 parte B).

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 siete días. Al medir el largo de 50 células para cada genotipo no se observaron diferencias significativas entre los genotipos (datos no presentados).

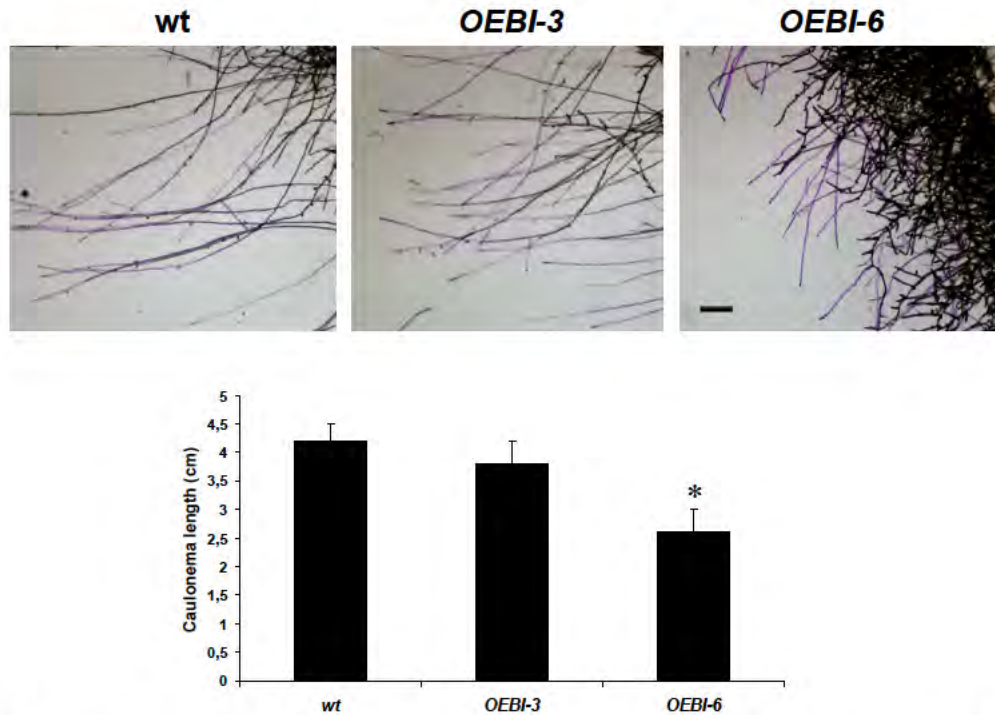


Figura 44. A) Tinción con azul de toluidina de colonias de *Physcomitrella* wt, OEBI-3 y OEBI-6 de 3 semanas crecidas en medio que favorece el desarrollo del caulonema B) Medida del largo del filamento de caulonema de colonias; wt: plantas salvajes, y líneas sobre-expresantes OEBI-3 y OEBI-6 Test estadístico de Kruskal–Wallis no paramétrico, $p < 0,001$ (*).

4.2.2.6 Respuesta frente al ataque de patógenos

En la interacción de las plantas con patógenos, la PCD parece desempeñar diferentes roles dependiendo de la forma de vida del agente de inducción de la enfermedad. En la interacción con biótrofos, la PCD es parte de la HR, que impide que estos patógenos lleguen al suministro de nutrientes, limitando la propagación de patógenos (Govrin *et al.*, 2000). En la interacción con patógenos necróticos, la PCD puede favorecer el crecimiento del patógeno (Govrin *et al.*, 2000). Hoy en día sigue siendo un tema de debate si la HR restringe a los patógenos necrótrofos, y si eso depende del tiempo y el tipo de tejido infectado. Mutantes de plantas que muestran resistencia a biótrofos presentan mayor susceptibilidad a necrótrofos o hemibiotros o viceversa, lo que apoya la opinión de que la regulación de la muerte celular está vinculada tanto a la resistencia como a la susceptibilidad frente a diferentes agentes patógenos (Jansen *et al.*, 2005; Jarosch *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2005; Veronese *et al.* 2004 y 2006). Una estrategia de virulencia de los patógenos necrótrofos es disparar la PCD intrínseca con el fin de ganar acceso a las células muertas (Wolpert *et al.*, 2002).

La obtención de dos líneas sobre-expresantes de *PpBI-1* permite identificar algún fenotipo asociado con la mutación generada. Dado que los transcriptos de *PpBI-1* se acumulan en respuesta al tratamiento con patógenos, lo primero que se analizó en este trabajo fue la muerte celular generada por diferentes tipos de patógenos en las líneas sobre-expresantes comparado

con plantas wt. Para ello se realizaron varios tratamientos con elicitores y patógenos que inducen muerte celular y se cuantificó el nivel de muerte celular mediante tinción con azul de Evans. El colorante azul de Evans es excluido de las células viables y células en los estadios tempranos de PCD, las cuales mantienen las membranas plasmáticas intactas (Turner y Novacky 1974; O'Brien *et al.*, 1997). Las tinciones con azul de Evans se realizaron según Levine *et al.* (1994) como se describe en la sección 3.11.1 de Materiales y Métodos.

Para los tratamientos con los CFs de las cepas SCC1 y SCC3193 de *P.c. carotovorum* y *P. wasabiae*, respectivamente, así como para los plugs conteniendo el micelio de *P. irregulare* se realizaron seis experimentos independientes. Las tinciones con azul de Evans se realizaron a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Los resultados obtenidos para los tratamientos con los CFs, así como con el oomicete necrótrofo *P. irregulare* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos ($p \leq 0,05$) (datos no presentados). Los resultados obtenidos reflejan que las líneas sobre-expresantes de *PpBI-1*, y la probable acumulación temprana de esta proteína no contribuya a contener la muerte celular generada por este tipo de patógenos.

Como se describió en los antecedentes, *B. cinerea* causa síntomas de enfermedad a nivel macroscópico, como amarronamiento del tallo y protonema, así como la maceración visible y la muerte celular del tejido infectado (Ponce de León *et al.*, 2007; Ponce De León *et al.*, 2012). Los cambios celulares que ocurren durante esta infección pueden ser examinadas con técnicas de tinción histoquímicas. En la Figura 46 parte A se pueden observar las etapas iniciales de la colonización de *B. cinerea*. Las líneas sobre-expresantes presentan menor amarronamiento de los tejidos en comparación con plantas wt, Después de 24 horas de la inoculación, el micelio de *B. cinerea* que expresa GFP creció notoriamente en la parte superior de las colonias del genotipo salvaje. Al observar las hojas infectadas en los diferentes genotipos, se observó que el crecimiento de *B. cinerea* es menor en la línea *OEBI-6* comparado con plantas wt (Figura 45 parte A).

Los resultados obtenidos para el daño celular generado por el tratamiento con la suspensión de esporas de *B. cinerea* se muestran en la Figura 45 parte B. Analizando los datos obtenidos mediante un test estadístico se determinó que la diferencia entre la muerte celular de la línea *OEBI-6* en comparación con plantas salvajes es significativamente menor ($p=0,0003$), mientras que para la línea 3 no se detectan diferencias significativas. Finalmente, para cuantificar el crecimiento del micelio durante las etapas iniciales de la infección, cuando los síntomas no son evidentes, se aisló el ADN total y se realizó una PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos para *B. cinerea* y *Physcomitrella* tal como se describe en la sección 3.11.5 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 45 parte C, la biomasa de *B. cinerea* a las 24 horas es significativamente menor en los tejidos de la línea *OEBI-6* respecto a las plantas wt. En suma, los análisis de cuantificación de la muerte celular y crecimiento del patógeno apoyaron los resultados observados inicialmente a nivel de síntomas y colonización de la cepa de *B. cinerea*-GFP. Esto demuestra que *B. cinerea* coloniza y profliera más en los tejidos de plantas wt comparado con el

sobre-expresante *OEBI-6*, el cual presenta muy altos niveles de transcritos, dando lugar a una mayor muerte celular y daño de los tejidos.

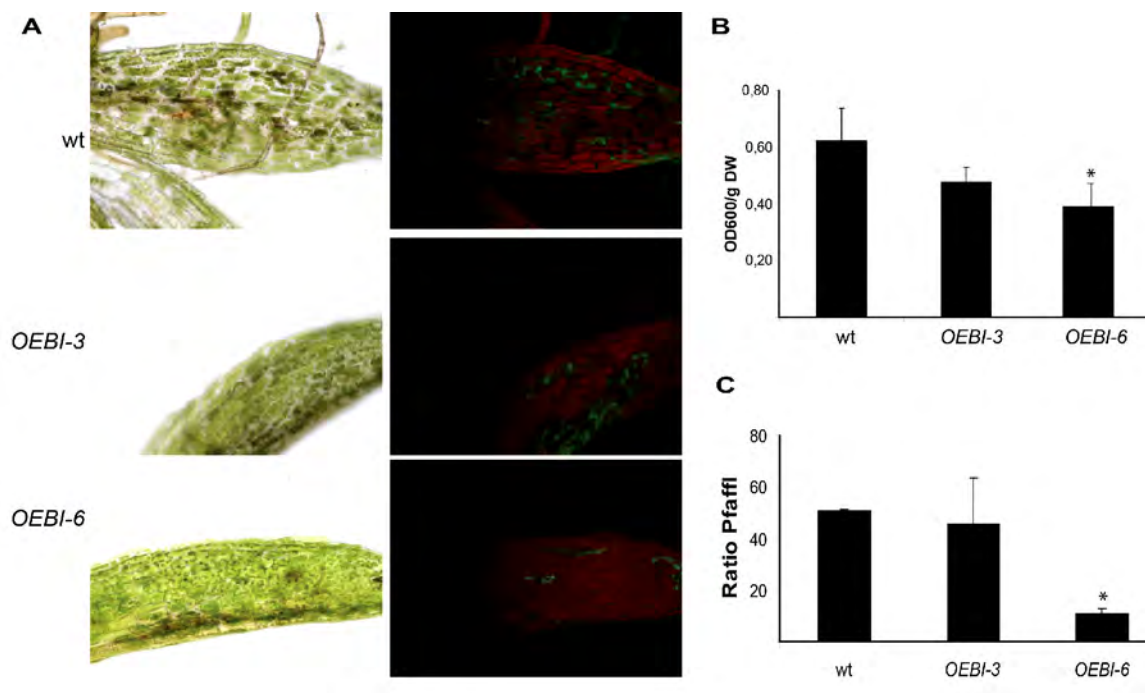


Figura 45. A) Síntomas de las diferentes plantas infectadas con *B. cinereaGFP* y crecimiento de *B. cinereaGFP*. B) Evaluación de la muerte celular en plantas salvajes: wt, *OEBI-3*, *OEBI-6* luego de 24 h de tratamiento con una suspensión de esporas del hongo *B. cinerea* (1×10^5 esporas/mL). Ctl: control, plantas sin tratar. C) Los niveles de ADN de *B. cinerea* se estimaron por qPCR adaptado de Pfaffli (2001), normalizando contra los contenidos ADN de la planta como una referencia endógena y con respecto a tiempo cero de la evolución en el tiempo de la infección. Todos los tratamientos se realizaron con colonias de 3 semanas crecidas en medio normal con celofán.

4.2.2.7 La línea sobre-expresante *OEBI-6* es más resistente que plantas wt a inductores de PCD

El quitosano ha sido ampliamente utilizado como un inductor de la respuesta de defensa en plantas vasculares (Ramonell *et al.*, 2002) y el tratamiento previo con quitosano puede inducir inmunidad frente al ataque de patógenos (Bhaskara Reddy *et al.*, 1999). El quitosano también se ha demostrado que induce la PCD en cultivos celulares (Zuppini *et al.*, 2003; Ning *et al.*, 2004). En *Physcomitrella* se ha demostrado que a bajas concentraciones el quitosano induce una respuesta de defensa que se caracteriza por la producción de ROS y cambios en la expresión de genes de defensa (Lawton y Saidasan 2009). En dosis más altas, el quitosano induce una respuesta de muerte celular en los tejidos de protonemas y gametofito con características de PCD (Lawton y Saidasan 2009).

Para determinar si los sobreexpresantes *OEBI* presentan cambios en las respuestas al tratamiento con inductores de PCD, se analizó el daño celular en protoplastos de los sobreexpresantes después de incubarlos con quitosano 50 y 150 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con protoplastos de *Physcomitrella* wt.

Se seleccionaron dichas condiciones debido a que previamente habíamos observado muerte celular de protoplastos de *Physcomitrella* de manera dependiente de la dosis. Para los dos tratamientos se realizaron tres experimentos independientes, los cuales mostraron resultados similares. Las tinciones con azul de Evans se realizaron a las 4 horas post-tratamiento y se analizó la incorporación del colorante el cual es proporcional al daño generado. En la Figura 46 se muestran los datos correspondientes al tratamiento con quitosano. Se graficaron los porcentajes de viabilidad celular para cada genotipo como la diferencia entre el total de células y el de células muertas. Analizando los datos obtenidos mediante un test estadístico se determinó que la diferencia entre la muerte celular del clon *OEBI-6* generado por el quitosano en comparación con plantas wt es significativamente menor ($p < 0,001$) para ambas concentraciones, mientras que para la línea *OEBI-3* no se detectan diferencias significativas.

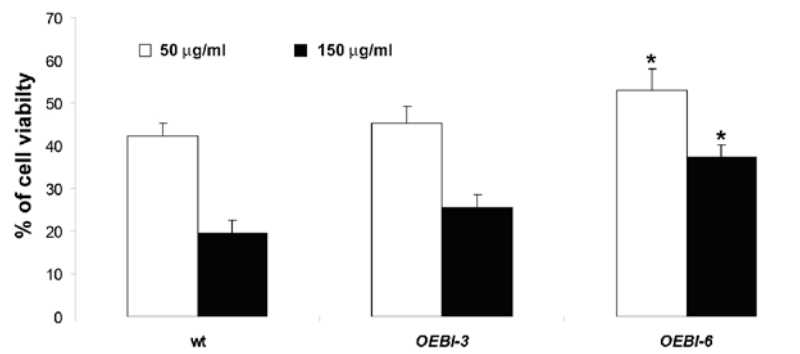


Figura 46. Evaluación de la muerte celular en protoplastos de plantas salvajes: wt, *OEBI-3* y *OEBI-6* luego de 4 h de tratamiento con quitosano 50 y 150 µg/ml.

En conjunto, los resultados obtenidos con la línea *OEBI-6*, cuyos niveles de expresión constitutiva de *PpBI* son los más altos, tanto para el desarrollo como para el tratamiento con esporas de *B. cinerea* y el inductor de PCD quitosano, demuestran que *PpBI-1* cumple un rol en los procesos que involucran muerte celular de *Physcomitrella*.

5. DISCUSIÓN -

5.1 Caracterización molecular de la respuesta de *Physcomitrella* al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum*

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para responder a los cambios del medio ambiente y este proceso de adaptación les ha permitido su supervivencia. En situaciones adversas las plantas responden con cambios en su desarrollo, como la reducción del crecimiento, y con cambios morfológicos y fisiológicos, como el cierre de estomas y la disminución de la transpiración en situación de déficit hídrico. En el caso de un ataque por microorganismos patógenos, las plantas responden reforzando la pared celular, e induciendo un conjunto de genes algunos de los cuales codifican para proteínas que producen compuestos antimicrobianos. Muchas de estas respuestas fisiológicas requieren la expresión génica de novo de proteínas reguladoras, entre ellas quinasas, fosfatasa y factores de transcripción, y de proteínas funcionales.

La identificación de genes que se inducen en respuesta a la infección por patógenos contribuye a la generación de conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la resistencia al estrés en plantas. *Physcomitrella* ha demostrado ser un buen modelo para esto debido a su posición evolutiva y la capacidad de ser manipulada genéticamente. El análisis comparativo de las anotaciones funcionales revela que el genoma de *Physcomitrella* presenta expansiones de genes "housekeeping" y genes metabólicos, posiblemente de adaptación linaje específico, así como la ganancia de al menos 13% de genes huérfanos no identificados hasta el momento en otras plantas (Zimmer *et al.*, 2013).

Para facilitar la identificación de genes expresados diferencialmente se han desarrollado varios métodos que incluyen el *mRNA diferencial display* por medio de PCR (Liang y Paradee 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE; Velculescu *et al.*, 1995), PCR cuantitativo, (Bassler *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996), *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH; Diatchenko *et al.*, 1996), hibridación de microarreglos (Chee *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1998) y recientemente la secuenciación directa de transcriptomas (Li *et al.*, 2008; Marioni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación de la secuenciación de ADNc, o más recientemente de la secuenciación directa de

ARN, tecnología conocida como RNA-seq (Wang *et al.*, 2009; Garber *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2012). Mediante RNA-seq se ha logrado tener una mayor cobertura de los transcriptomas, ensamblaje de novo, estimación de la abundancia de cada transcrito y la detección de isoformas génicas, limitantes que presentan las tecnologías convencionales como SAGE y microarreglos (Trapnell *et al.*, 2010).

En este trabajo se logró con éxito la secuenciación del transcriptoma de *Physcomitrella* en respuesta al CF de SCC1 de *P.c. carotovorum* y el transcriptoma de *Physcomitrella* en condiciones normales de crecimiento. El CF contiene enzimas que degradan la pared de las células vegetales y toxinas que podrían ser reconocidas como MAMPs, mientras que los fragmentos de pared resultantes de la degradación enzimática podrían ser reconocidos como DAMPs. Se realizaron los estudios comparativos para identificar los genes expresados diferencialmente entre ambas condiciones. Los resultados obtenidos muestran que en respuesta a los elicitores de *P.c. carotovorum* se inducen en *Physcomitrella* la expresión de genes que codifican para proteínas homólogas a las de plantas vasculares involucradas en la percepción y señalización, además de proteínas de respuesta involucradas en la detoxificación de ROS, fortalecimiento de la pared celular y producción de flavonoides, entre otras funciones involucradas en la defensa vegetal.

El análisis parcial de transcriptoma en respuesta a *P.c. carotovorum* SCC1 muestra la inducción de vías de defensa, algunas de las cuales parecen estar conservadas entre *Physcomitrella* y plantas vasculares. A nivel de la percepción, no se identificaron genes expresados diferencialmente que codifiquen para receptores clásicos aunque no se descarta la existencia de otros no identificados hasta la fecha. Resulta interesante destacar que se inducen tres genes con homología a AtCERK1, los cuales podrían funcionar en la percepción de MAMPs o DAMPs. También se identificaron varios genes que codifican para MPKs que participan probablemente en la señalización. Los análisis bioinformáticos permitieron identificar un gen que codificaría para una MP4K, el cual contiene en la región 5'UTR un sitio de unión para el microRNA 477 (Arazi 2012), el cual podría estar modulando los niveles de transcritos. El reconocimiento de MAMPs y/o DAMPs es indispensable para la activación de la PTI (Boller y Felix 2009; Jones y Dangl 2006). En los últimos años se han aportado evidencias de que la biogénesis de microRNAs es importante para la PTI (Li *et al.*, 2010). Hasta el momento se conocen muy pocos microRNA involucrados en este proceso. Se ha reportado que la sobre-expresión del miR160a regula positivamente la deposición de calosa inducida por PAMPs, mientras que el miR398b y miR773 regulan negativamente la deposición de calosa y la resistencia a patógenos, lo que sugiere una compleja regulación de la respuesta de defensa de las plantas que involucra microRNAs (Li *et al.*, 2010). Otro ejemplo es la acumulación de miR393 tras la percepción de flg22, lo que contribuye a inducir la resistencia contra bacterias fitopatógenas mediante la regulación negativa del nivel de ARNm de los receptores de auxinas TIR1, AFB2 y AFB3 (Navarro *et al.*, 2006).

Algunos estudios realizados por nuestro grupo han relacionado el estrés oxidativo con la respuesta de defensa de *Physcomitrella* frente a diferentes estreses bióticos (Castro *et al.*, 2009; Ponce de León 2012). La producción de ROS no se limita a la PTI, sino que es una respuesta general al estrés que también se produce durante el estrés abiótico y en la ETI que desencadena HR (Zurbruggen *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2012). Al igual que en las plantas con flores, las ROS también se producen bajo condiciones de estrés abiótico en *Physcomitrella* (Frank *et al.*, 2007). Un mutante de *Physcomitrella* ($\Delta PpTSP01$) incapaz de mantener la homeostasis redox es muy sensible al estrés salino y hongos patógenos (Frank *et al.*, 2007; Lehtonen *et al.*, 2012).

Los análisis del transcriptoma mostraron que en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* se inducen varios genes que codifican para las tres familias de enzimas antioxidantes tales como SOD, CAT y peroxidasa. Este mecanismo está descrito en plantas observándose que su activación se produce para evitar los daños celulares generados por las ROS (Mittler *et al.*, 2004). Los mecanismos de las plantas que controlan el nivel de ROS son complejos. En *Arabidopsis* se han descrito al menos 152 genes implicados en el control de ROS (Mittler *et al.*, 2004). Esta red de genes relacionados con el metabolismo de las ROS supone una constante regulación para controlar la defensa y el daño celular.

Uno de los genes que codifica para una ascorbato peroxidasa presenta una alta inducción con elicitores de SCC1, y esta enzima controla los niveles de H_2O_2 presentes dentro de las células de la planta. También se observó la inducción de dos genes que codifican para la vía de síntesis del ácido ascórbico. Estos resultados sugieren que el AsA podría cumplir un rol fundamental en la detoxificación de ROS en esta planta.

Este tipo de moléculas pueden estar implicadas en la inducción de respuestas que contrarresten el estrés oxidativo generado por las ROS. Estudios metabolómicos de Erxleben *et al.*, (2011) revelaron que *Physcomitrella* acumula metabolitos osmoprotectores tales como altrosa, manitol, ácido ascórbico y prolina en respuesta a sequía. Estos estudios revelaron que estos metabolitos no son exclusivos de plantas vasculares y que han evolucionado en una fase temprana de la colonización de la tierra por las plantas.

Será interesante determinar los niveles endógenos de este tipo de compuestos y analizar el rol que cumplen en respuesta a estrés biótico mediante la generación de plantas transgénicas alteradas en su síntesis.

Las ROS, además de ser tóxicas frente al patógeno, pueden favorecer la fortificación de la pared celular. La fortificación de las paredes celulares es un mecanismo para impedir la penetración de patógenos en las células de las plantas mediante la formación de una barrera física. En respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* se indujeron genes que codificarían para proteínas involucradas en la fortificación de la pared, incluyendo calosa sintetas, proteínas dirigidas y pectina metil esterases. *Physcomitrella* no produce lignina, sin embargo su genoma contiene los ocho genes ortólogos que codificarían para las enzimas biosintéticas de lignina requeridos para la biosíntesis de

alcohol p-cumaril y alcohol coniferílico, mientras que el alga *Chlamydomonas reinhardtii* verde no contiene ninguna (Silber *et al.*, 2008; Weng *et al.*, 2008b; Xu *et al.*, 2009). Esta evidencia sugiere que los andamios metabólicos para la biosíntesis de monolignol evolucionaron antes de la aparición de traqueófitas, y probablemente se establecieron en las primeras plantas terrestres, donde algunos o la totalidad de estos genes de esta vía servirían en la generación de moléculas con capacidad protectora frente a la luz UV (Weng *et al.*, 2010).

También hemos observado una fortificación de la pared celular tras la infección con *B. cinerea* y dos especies de *Pythium* mediante la utilización de diferentes colorantes. *Physcomitrella* induce la acumulación de compuestos fenólicos y deposición de calosa en la pared de las células vegetales en respuesta a la infección con estos patógenos (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009, Ponce de León *et al.*, 2012). La acumulación de compuestos fenólicos así como la deposición de calosa actuaría en *Physcomitrella* como un mecanismo de defensa basal, lo que indicaría que la inmunidad innata estaría conservada entre briofitas y traqueofitas.

La ruta del shiquimato es el punto de partida para la síntesis de compuestos fenólicos cuya función está relacionada con la respuesta frente a patógenos, como los flavonoides y las cumarinas (Ortuño *et al.*, 1997; Angioni *et al.*, 1998; Afek *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 2004). Los flavonoides son un grupo representativo de metabolitos secundarios denominados "metabolitos especializados" ya que las plantas sintetizan metabolitos especie específico (Harborne y Williams 2000). En respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* se observó un aumento en la expresión de genes que codificarían para enzimas involucrados en la síntesis de flavonoides, incluyendo CHS, CHI y 4CL. La inducción de este tipo de genes puede conducir a la generación de metabolitos secundarios involucrados en la fortificación de pared, con actividad antimicrobiana, o con otras funciones en la defensa vegetal, algunas de los cuales pueden ser novedosas.

Se postula que *Physcomitrella* es más tolerante a estrés abiótico y biótico por la expansión en la cantidad de metabolitos secundarios con funciones en la defensa vegetal, así como un sistema antioxidante más eficiente que le permite lidiar con las elevadas concentraciones de ROS que se producen durante el estrés. La expansión de familias génicas que codifican para CHS, PAL involucradas en la síntesis de flavonoides y fenilpropanoides, respectivamente podría contribuir en parte a la síntesis de metabolitos con capacidad antioxidante.

La defensa de las plantas como respuesta al ataque por patógenos está regulada por una compleja red de rutas de señalización, en la que están implicadas hormonas como el ET, JA, SA y ABA (Majalingam *et al.*, 2003; Mauch-Mani y Mauch 2005; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Adie *et al.*, 2007). Elictores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* inducen en *Arabidopsis* la acumulación de SA y JA, que son requeridas para el establecimiento de la SAR y la inducción de genes marcadores como PR-1 y PDF1.2 a nivel local y sistémico (Kariola *et al.*, 2003). En la síntesis del SA en plantas

participan las isocorismato sintetas (ICS) y las PAL (Dempsey *et al.*, 2011). Mientras que la ruta biosintética completa todavía tiene que ser establecida, *Arabidopsis* parece sintetizar SA principalmente a través de la vía ICS en el cloroplasto (Dempsey *et al.*, 2011). En los estudios transcriptómicos se observó la inducción de varias PALs pero no se observó inducción de los genes que codificarían para ICS, lo cual coincide con estudios previos realizados por nuestro grupo donde no se observó acumulación de SA en respuesta a elicitores de la cepa SCC1 (Ponce de León *et al.*, datos no publicados). Estos resultados sugieren entonces, que el SA en *Physcomitrella* podría también sintetizarse mayoritariamente vía ICS, como ocurre en plantas vasculares.

La señalización mediada por JA es importante en la respuesta de defensa de *Arabidopsis* contra *B. cinerea* y *Alternaria brassicicola*, el oomycete *P. irregulare* y el patógeno bacteriano *P.c. carotovorum*; anteriormente llamada *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Staswick *et al.*, 1998; Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2003; Staswick y Tiryaki 2004). El JA también es necesario para la activación de la ISR, la cual se expresa en las hojas en respuesta a la colonización de las raíces por algunas especies de rizobacterias (Verhagen *et al.*, 2004). Además, se ha propuesto que el JA participa en el control de la PCD y dependiendo de la planta puede promover o prevenir la PCD (Przybyla *et al.*, 2008; Danon *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). El precursor del JA, el ácido 12-oxo-fitodienoco (OPDA), también actúa como molécula señal induciendo la expresión de genes asociados a la respuesta de defensa (Stintzi *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 2005). Aunque muchos de los genes inducidos por OPDA también se inducen por JAs, hay un conjunto de genes que solo se inducen por OPDA de manera independiente de COI-1 (receptores del JA en plantas vasculares) en *Arabidopsis* (Taki *et al.*, 2005). También hay genes que solo se inducen por JAs (dependiente de COI-1) y las características de los genes inducibles solo por OPDA y solo por JAs son bien diferentes.

En *Physcomitrella* no se acumula JA (Ponce de León *et al.* 2012; Stumpe *et al.*, 2010; Browse 2009). Los resultados obtenidos por RNAseq muestran que se inducen lipooxigenasas, aleno oxido sintasa y aleno oxida ciclasas en respuesta a elicitores de SCC1 de *P.c. carotovorum*, sin embargo no aumenta la síntesis del precursor del JA, el OPDA (Ponce de León *et al.*, datos no publicados). *Physcomitrella* es capaz de responder a jasmonatos, evidenciado por la inducción de genes de defensa y por el acortamiento de los rizoides de manera similar al acortamiento de raíces que ocurre en plantas vasculares (Ponce de León *et al.*, 2012). A diferencia de lo que ocurre en respuesta al tratamiento con el CF de *P.c. carotovorum*, si hemos detectado un claro aumento de OPDA tras la infección con *B. cinerea* y dos especies de *Pythium* (Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012). La presencia de seis genes COI-1 a diferencia de un solo gen en *Arabidopsis* sugiere que estos receptores podrían sensar una variedad más amplia de metabolitos. En *Physcomitrella*, solamente uno de los seis genes (Phypa_41982) se induce en respuesta a *P.c. carotovorum* (datos no presentados). En plantas vasculares el OPDA es capaz de inducir genes relacionados con la defensa a patógenos y heridas (Stintzi *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 2005) y en musgos podría tener un rol central en la respuesta de defensa vegetal.

Los resultados sugieren por lo tanto que estas dos vías de señalización hormonal, a diferencia de lo que ocurre en plantas vasculares, no estarían involucradas en respuesta de defensa contra *P.c. carotovorum* SCC1 en *Physcomitrella*. Existen cada vez más evidencias sobre la importancia de otras hormonas en la interacción planta-patógeno. Existen estudios sobre la participación en dicha interacción de las auxinas (Navarro *et al.*, 2006), las citoquininas (Jameson 2000), las giberelinas (Hedden *et al.*, 2001) y los brasinosteroides (Krishna 2003). Estas hormonas vegetales están normalmente relacionadas con la regulación de procesos de crecimiento, desarrollo de órganos o en respuesta a distintos tipos de estrés, con un amplio efecto en la fisiología de la planta. Generalmente se asume que las auxinas inducen la susceptibilidad a microorganismos biótrofos y la resistencia a necrótrofos (Jamson 2000; Walters y McRoberts 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la inducción de genes que codificarían para proteínas de respuesta a auxinas en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum*. Los resultados transcriptómicos se correlacionan con el aumento de los niveles de auxinas en respuesta a SCC1 observados por nuestro grupo (Ponce de León *et al.*, datos no publicados). Esto sugiere una posible función de las auxinas en la respuesta de defensa a patógenos en *Physcomitrella*. Actualmente nuestro grupo está analizando la importancia de la vía del SA y auxinas en la defensa de *Physcomitrella*, mediante la generación de plantas transgénicas NahG que degradan el SA y la utilización de plantas transgénicas que tienen un promotor de un gen de respuesta a auxinas fusionado al gen reportero glucuronidasa (GH3:GUS) (Ludwig-Müller *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo junto con los resultados previos de nuestro grupo, muestran que *Physcomitrella* representa una excelente planta modelo para estudiar los mecanismos de defensa en plantas, permitiendo comparar los mecanismos de defensa a lo largo de la evolución de las plantas. El transcriptoma generado en este trabajo representa una fuente de genes que pueden ser analizados en mayor detalle, ya sea para identificar mecanismos de defensa conservados y diferentes entre musgos y angiospermas. Además, algunos de los genes identificados pueden ser utilizados para generar plantas de interés agrícola más resistentes a enfermedades.

5.2 Análisis funcional de genes relacionados con la defensa vegetal

Gran parte de la investigación básica en plantas se ha orientado en dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a las respuestas de las plantas al estrés, conocimiento que podría aumentar la resistencia al estrés biótico a través de programas de mejoramiento genético o enfoques biotecnológicos. Entre las ventajas principales de *Physcomitrella* que lo hacen un excelente modelo para estudios moleculares, se encuentra la capacidad de generar mutantes *knockout* mediante recombinación homóloga (Schaefer y Zryd, 1997). La estrategia original elegida para evaluar la relevancia funcional de *PpPKC* y *PpBI-1* en la respuesta al estrés en *Physcomitrella* era mediante la generación de mutantes *knockout* y líneas sobre-expresantes para dichos genes en

Physcomitrella. Luego de hacer una revisión bibliográfica encontramos que hace unos años un grupo habían generado un mutante *knockout* para *PpPKC* (Brun *et al.*, 2004; denominada en el paper PpUBP34), aunque en ese entonces solamente evaluaron su respuesta a diferentes tipos de estrés abióticos y señales. Solicitamos que nos cedieran la línea para incluirla en este trabajo y evaluar su comportamiento en respuesta a estrés biótico, sin embargo luego de varios intentos no conseguimos obtenerla. De todas formas, dado que existen varios genes homólogos a *PpPKC* que podrían ser redundantes y que además nuestro interés original era evaluar si un aumento en la producción de metabolitos secundarios confiere resistencia a patógenos, se procedió a la sobre-expresión del gen *PpPKC* en *Physcomitrella* y en un sistema heterólogo como *Arabidopsis*. Con respecto al gen *PpBI-1* existe una comunicación donde los investigadores Lawton y Saidasan (2009) indican que poseen un mutante *knockout* más susceptible a diferentes tipos de patógenos pero solamente son comunicaciones personales y no existe bibliografía documentada. Dado que nuestro grupo tiene bien caracterizada la respuesta de defensa de *Physcomitrella* frente a la infección con dos patógenos necrotróficos, los cuales desencadenan muerte celular en los tejidos de *Physcomitrella* con características diferentes, nos resulto interesante generar líneas sobre-expresantes para *PpBI-1* y evaluar su capacidad de atenuar los procesos de PCD. Las construcciones que se utilizaron para la sobre-expresión en *Physcomitrella* dirigen la construcción al locus 108. Sin embargo, se ha reportado que durante las transformaciones ocurre un fenómeno denominado concatenación que consiste en la inserción en forma consecutiva de varias construcciones (Kamisugi *et al.*, 2006). Esto conlleva a tener diferentes líneas con variaciones en los niveles de transcritos que pueden ser utilizadas para llevar adelante los estudios fenotípicos.

5.2.1 Rol de *PpPKC* en la resistencia al estrés biótico y abiótico

Es importante conocer cual es la expresión de un gen para poder intentar inferir un posible mecanismo de acción en determinados procesos. Un primer aspecto a conocer es el nivel de expresión basal, pudiéndose así distinguir entre genes ubicuos en toda la planta, o genes que sólo se expresan en determinados tejidos o situaciones. *PpPKC* ha demostrado ser un gen con baja expresión basal, detectándose en todos los estados del desarrollo, lo cual sugiere una relevancia en la fisiología de la planta.

La proteína *PpPKC* es una proteína citoplasmática que presenta un dominio Bet v característico de proteínas relacionadas con la patogenicidad PR-10 y un dominio policétido ciclasa que participaría en la formación de policétidos aromáticos. *PpPKC* presenta una expresión diferencial durante el ciclo de vida de *Physcomitrella*, y por lo tanto se podrían estar produciendo diferentes concentraciones de metabolitos que sean importantes para el desarrollo de los diferentes tejidos de la planta.

Al igual que en las plantas vasculares, el desarrollo de *Physcomitrella* es regulado por señales ambientales y fitohormonas. En el protonema la transición de cloronema a caulonema está bajo el control de auxinas (Jang y Dolan 2011). La formación de yemas que dan lugar a los gametóforos

requiere de citoquininas (von Schwartzberg *et al.*, 2007). Hace unos años Gonneau *et al.*, (2001) lograron demostrar que PpPKC se acumula en respuesta a citoquininas y es capaz de unirse a este tipo de hormonas. En 2004 el mismo grupo generó un mutante *knockout* para PpPKC y los estudios fenotípicos en respuesta a citocininas, estrés salino y osmótico no revelaron ninguna alteración fenotípica visible (Brun *et al.*, 2004). Estudios bioquímicos y moleculares de los transformantes revelaron la existencia de un mecanismo compensatorio. En los mutantes identificaron un segundo gen, denominado *UB34-like*, con elevada homología a PpPKC, que codifica para una proteína que en ese *background* genético es capaz de unirse a citoquininas (Brun *et al.*, 2004). En este punto es importante destacar que estos investigadores no evaluaron el desempeño de las plantas *knockout* generadas durante la recuperación del estrés. Existen varios trabajos en *Physcomitrella* donde se demuestra que *knockout* de genes que se inducen en respuesta a diferentes condiciones de estrés, afectan notoriamente la recuperación de las plantas de un estrés osmótico, salino, etc. (Saavedra *et al.*, 2006, Ruibal *et al.*, 2012 y 2013).

Los estudios de *Northern blot* permitieron confirmar la expresión diferencial del gen *PpPKC* en respuesta a patógenos. Para dilucidar la contribución de las policétidos ciclasas, en particular PpPKC, en la resistencia a patógenos y la tolerancia al estrés salino en plantas, se generaron líneas transgénicas de *Physcomitrella* y *Arabidopsis* que sobre-expresan PpPKC. Los resultados fenotípicos obtenidos para plantas de *Physcomitrella* expresando constitutivamente el gen *PpPKC* sugieren un rol de esta proteína en la resistencia a *P. irregulare*. Las plantas de *Physcomitrella* que sobre-expresan *PpPKC* presentan menor cantidad de síntomas, menor crecimiento del micelio y menor muerte celular de los tejidos vegetales comparado con plantas *wt*. Hemos demostrado que la sobre-expresión de PpPKC en *Arabidopsis* también tiene un efecto significativo en la resistencia a *P. irregulare*, observado como una menor colonización de la raíz y marchitamiento de la parte aérea. Sin embargo, la sobre-expresión de *PpPKC* no proporciona resistencia a *B. cinerea*. Ambos patógenos son necrótrofos y si bien desencadenan en *Physcomitrella* algunas respuestas de defensa similares, incluyendo fortalecimiento de la pared celular, acumulación de OPDA e inducción PAL, CHS y LOX (Ponce de León *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012), probablemente disparan otras defensas que son específica de cada patógeno. Una posible explicación a estas observaciones podría ser que los productos derivados de PpPKC tengan actividad antimicrobiana efectivos contra *P. irregulare* y no contra *B. cinerea*. El reforzamiento que se observa en la pared celular de las líneas sobre-expresantes podría por otro lado no ser un impedimento para la forma de infección de este último. *B. cinerea* a diferencia de *P. irregulare* desencadena muerte celular en los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD (Ponce de León *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2009). La sobre-expresión de PpPKC podría también provocar una alteración de las vías metabólicas que afecten el proceso de infección.

En respuesta al estrés salino, las líneas transgénicas de *Physcomitrella* no presentan un fenotipo contrastante con la del tipo salvaje. Las líneas de *Arabidopsis* en cambio, presentan una mayor

tolerancia, como se ve por una mayor tasa de crecimiento de las raíces y las partes aéreas de las líneas transgénicas en comparación con el tipo salvaje.

Hasta la fecha solo existe un trabajo en *Cannabis* donde demostraron que una PKS tipo III requiere la presencia de una enzima denominada ácido olivetólico ciclasa (OAC, de *olivetolic acid cyclase*), que cataliza una condensación aldólica intramolecular C2-C7 para formar el ácido olivetólico (Gagne *et al.*, 2012). La identificación de la OAC reveló una nueva ruta biosintética para policétidos vegetales en las que las ciclasas cooperarían con las PKS de tipo III PKS para generar los andamios de carbono. El ácido olivetólico se combina con geranil pirofosfato y con ácido olivetólico para formar Cannabigerol (CBG) el primer paso de la síntesis de carabinoides (Gagne *et al.*, 2012). Algunos cannabinoides son responsables de los principales efectos del cannabis y algunos de ellos poseen importantes propiedades medicinales, que la comunidad científica sigue descubriendo cada día.

Las isoflavonas se cree que desempeñan diversos roles en las interacciones planta-patógeno y también son potencialmente importantes para la salud humana, la nutrición y la medicina. La isoflavona sintasa (IFS) es una enzima clave para la formación de las isoflavonas. El silenciamiento génico por RNAi para esta enzima en la soja condujo a un aumento de la susceptibilidad a *Phytophthora sojae*, interrumpiendo tanto la resistencia mediada por un gen R en las raíces y la resistencia no específica en tejidos de cotiledones (Subramanian *et al.*, 2005).

Los flavonoides pueden presentar actividad de captación de radicales libres y contribuir a mitigar el estrés oxidativo y la sequía en *Arabidopsis* (Nakabayash *et al.*, 2014) Estudios de perfiles transcriptómicos y metabolómicos en respuesta a estrés oxidativo y sequía en *Arabidopsis* tipo salvaje, y líneas deficientes y sobre-expresantes de flavonoides permitieron demostrar que la sobreacumulación de flavonoides conlleva a una mejor tolerancia de tales tipos de estrés. Estos estudios confirmaron la utilidad de los flavonoides para mejorar la tolerancia al estrés biótico y abiótico en diferentes cultivos (Nakabayash *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesis son la primera evidencia de que una PKC podría estar involucrada en la respuesta de defensa a patógenos. El mecanismo involucrado en la resistencia conferida por la expresión de este gen podría explicarse de diferentes maneras. Una de ellas podría deberse a cambios estructurales a nivel de la pared celular, debido a la actividad policétido ciclasa aumentada en las líneas transgénicas, que podría conducir a la generación y/o acumulación de compuestos fenólicos y/o depósitos de calosa que ayudan a impedir la propagación de *P. irregulare*. Estos acúmulos los observamos tanto en plantas que sobre-expresan PpPKC de *Physcomitrella*, como en *Arabidopsis* (datos no mostrados). Otra explicación podría ser la acumulación de compuestos fenólicos con actividad antifúngica que se acumularían en mayor cantidad en las plantas sobre-expresantes. Para responder estas preguntas es necesario realizar

más experimentos, sobre todo los que implican la producción de la proteína recombinante y purificación de los metabolitos derivados de la actividad enzimática de esta proteína. Hay un gran interés a nivel mundial en identificar compuestos con propiedades biológicas de interés. Por lo tanto, será importante identificar el o los posibles sustratos de esta enzima así como los metabolitos generados.

5.2.2 Rol de *PpBI-1* en el desarrollo y en la resistencia al estrés biótico

A partir de la gran cantidad de información disponible y con la finalización de los proyectos genoma de varias especies vegetales, los estudios de genómica comparativa han mostrado que algunos genes de animales reguladores de procesos de muerte celular parecen tener sus secuencias homólogas en plantas (Aravind *et al.*, 2001). Sin embargo, la clonación de BI-1 de *Arabidopsis* y arroz y el descubrimiento de su capacidad para inhibir con éxito la letalidad inducida por Bax en levadura (Kawai *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000), sugiere una conservación importante de esta proteína en la evolución. La proteína BI-1 ha sido implicada como un factor anti-PCD regulando la actividad de BAX en los procesos de desarrollo, así como durante las respuestas frente a condiciones de estrés (Hückelhoven, 2004).

Además de su función como un regulador de la PCD, ha sido reportado que la sobre-expresión de BI-1 puede aumentar la susceptibilidad a patógenos biotróficos tales como *Blumeria graminis* (Eichmann *et al.*, 2004; Hückelhoven *et al.*, 2003) o conferir resistencia a patógenos necrótrofos en plantas susceptibles (Imani *et al.*, 2006).

En los últimos años, nuestro grupo ha caracterizado los procesos de infección de dos hongos necrótrofos en *Physcomitrella*, demostrando que el oomicete *P. irregulare* y el hongo *B. cinerea* infectan los tejidos de *Physcomitrella* de diferentes formas (Castro *et al.*, 2009; Ponce de León *et al.*, 2012). Si bien, ambos son patógenos necrótrofos, *B. cinerea* desencadena muerte celular en los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD, mientras que *P. irregulare* no lo hace. Con el objetivo de estudiar este tipo de muerte celular en mayor detalle en este musgo, nos resultó interesante sobre-expresar el *PpBI-1*, y evaluar su capacidad de conferir resistencia a patógenos.

Los análisis bioinformáticos de las secuencias proteicas revelaron que PpBI presenta un elevado grado de similitud con sus homólogos de plantas y animales. Esta similitud fue particularmente relevante entre los miembros de las plantas. El análisis de la secuencia aminoacídica de BI-1 de plantas reveló la presencia de siete dominios transmembrana potenciales, indicativo de una proteína integral de membrana. Sin embargo, los estudios de expresión transitoria en tabaco de la proteína de fusión PpBI:GFP sugieren que esta proteína se localiza en el citosol. No se descarta la posibilidad que la fusión C-terminal pueda alterar la localización de la proteína. Se deberá realizar una fusión N-terminal para poder corroborar los resultados obtenidos.

Existen dos hallazgos que respaldan que el extremo C-terminal de BI-1 estaría fuera del retículo endoplásmico, en el citoplasma. En primer lugar, Bolduc *et al.*, (2003) encontraron que la digestión de células de tabaco con digitonina, que permeabiliza la membrana plasmática pero no

endomembranas, permitió mediante inmunodetección el reconocimiento de la proteína de fusión BI-1-GFP (GFP fusión C-terminal) en el ER. En segundo lugar, la mayor parte de las proteínas BI-1 comprenden secuencias de aminoácidos RXR y/o KKXX cerca del extremo C-terminal que representa motivos que normalmente median la retención en la membrana del RE con el C-terminal en el citoplasma (Shikano *et al.*, 2003). La BI-1 de *Physcomitrella* así como la de *Selaginella* (una licofita) presenta argininas (R) en vez de lisinas (K) en el extremo C-terminal. No se descarta que estas variaciones a nivel del C-terminal podrían ser las responsables de que la proteína no se localice en el ER.

Los estudios de *Northern blot* permitieron observar que el gen PpBI-1 es de baja expresión en condiciones normales de crecimiento y se induce frente al estrés biótico, en especial frente a tratamientos con elicitores de *Pectobacterium* y esporas de *B. cinerea*. En respuesta a *P. irregulare* no se observa casi inducción. Estos resultados se relacionan con estudios previos obtenidos por nuestro grupo donde caracterizamos las respuestas de defensa frente a este tipo de patógenos y pudimos determinar que elicitores de *Pectobacterium* y *B. cinerea* inducen respuestas similares en *Physcomitrella*. Demostramos que *B. cinerea* y elicitores de la cepa SCC1 de *P.c. carotovorum* generan muerte celular en los tejidos de *Physcomitrella* con características de PCD, incluyendo el colapso del citoplasma, acumulación de compuestos fenólicos y amarronamiento de los cloroplastos (Ponce de León *et al.*, 2007). Recientemente pudimos confirmar mediante "terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling" (TUNEL) que *B. cinerea* induce PCD, particularmente en células colonizadas por hifas del hongo, indicando la fragmentación del ADN (Ponce de León *et al.*, 2012).

La generación de líneas que sobre-expresan PpBI-1 permitió abordar los estudios para la identificación de algún fenotipo asociado con la mutación generada. En un principio, se evaluó el crecimiento de *Physcomitrella* y las líneas sobre-expresantes en condiciones óptimas de crecimiento, encontrándose diferencias significativas en el crecimiento de las colonias, así como en la morfología del protonema, y rizoides. Si bien hasta la fecha no existen reportes que la sobre-expresión de BI-1 pueda generar alteraciones en el desarrollo de los tejidos vegetales, si existe un reporte reciente realizado en la línea celular NIH3T3 (Xiang-Yong *et al.*, 2010). Los estudios mostraron que las células NIH3T3 que sobreexpresan BI-1 muestran una mayor tasa de crecimiento, formando más cantidad de células y de mayor tamaño que las células control. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que BI-1 podría desempeñar un papel crucial en el desarrollo y en la génesis neoplásica (Xiang-Yong *et al.*, 2010).

La medición de muerte celular en plantas wt y líneas que sobre-expresan *PpBI-1* en respuesta al tratamiento con los CFs de las cepas SCC1 y SCC3193 así como *P. irregulare* no detectó diferencias significativas entre los genotipos. Para el tratamiento con el hongo *B. cinerea*, los resultados obtenidos revelan que existe un aumento en la resistencia de las líneas sobre-expresantes respecto a las plantas del tipo salvaje que se relaciona con una disminución en la muerte celular en los

tejidos de las líneas sobre-expresantes respecto a las plantas tipo salvajes, así como una menor proliferación del hongo.

Algunos hongos necrótrofos tales como el hongo *B. cinerea* son difíciles de controlar por métodos químicos, dado que la resistencia a los plaguicidas se genera rápidamente en las poblaciones de hongos (Staub 1991). Por lo tanto, parece razonable considerar otros medios de control de enfermedades tales como el mejoramiento de los cultivos mediante transgénesis. Debido a que las respuestas de defensa que se disparan en la planta aparentemente contribuyen a la muerte celular inducida por *B. cinerea*, una estrategia razonable sería bloquear vías de PCD intrínsecas de la planta para obtener resistencia. Tal enfoque ya ha tenido éxito en la creación de plantas de tabaco que son resistentes a *B. cinerea* por sobre-expresión de proteínas inhibitoras de PCD (Dickman *et al.*, 2001).

Finalmente las líneas sobre-expresantes son más resistentes al quitosano, el cual ya había sido demostrado ser capaz de inducir muerte celular con características de PCD en los tejidos de *Physcomitrella* (Lehtonen *et al.*, 2009). A pesar que PpBI-1 no presente el extremo C-terminal conservado, la proteína tendría actividad anti-apoptótica. Si bien deberíamos explorar las respuestas de las sobre-expresantes a otros inductores de PCD los resultados obtenidos sugieren que PpBI-1 confiere resistencia a *B. cinerea* y apoyan la idea de que la inhibición de la muerte celular es un enfoque aplicable a controlar la muerte celular que inducen los patógenos en plantas.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo se centró en primer lugar en la identificación de genes de *Physcomitrella* expresados diferencialmente en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum*. La secuenciación del transcriptoma de *Physcomitrella* en respuesta al tratamiento con elicitores de *P.c. carotovorum* ha permitido identificar un conjunto amplio y variado de genes con expresión diferencial comparado con el transcriptoma de plantas control. *Physcomitrella* responde a los MAMPs presentes en el CF de *P.c. carotovorum* y/o DAMPs generados por la acción de las enzimas que degradan la pared celular, mediante la activación de genes involucrados en la percepción, señalización, acumulación de ROS, fortificación de la pared celular y síntesis de flavonoides, entre otros. La inducción de genes involucrados en la vía de síntesis del ácido ascórbico en respuesta a elicitores de *P.c. carotovorum* es interesante, y demuestra la importancia de determinar los niveles de metabolitos involucrados en la detoxificación y la protección frente al estrés tales como el ácido ascórbico, prolina y glutatión, así como los niveles de transcriptos y proteínas involucradas en su síntesis, en las plantas silvestres en respuesta a diferentes tipos de patógenos. También será interesante poder determinar los flavonoides y fenilpropanoides que se sintetizan en *Physcomitrella* en respuesta a patógenos, dada la gran familia de PALs y CHSs presentes en esta planta. La extensión en el tamaño de estas familias génicas podría contribuir a la síntesis de una mayor diversidad de metabolitos, algunos de los cuales pueden poseer funciones novedosas.

El estudio global del transcriptoma en respuesta a *P.c. carotovorum* SCC1 permitió identificar vías de señalización que se conservan entre *Physcomitrella* y plantas vasculares así como vías de señalización que se activan en respuesta a este tratamiento y no habían sido reportadas hasta el momento, como es el caso de vía de las auxinas.

Los estudios trascritómicos permitieron además identificar una fuente potencial de genes novedosos para posibles aplicaciones biotecnológicas con el fin de mejorar el desempeño de los cultivos en condiciones de estrés.

Se seguirá analizando en mayor profundidad los resultados transcriptómicos con el objetivo de identificar genes y vías que se inducen en respuesta a patógenos en *Physcomitrella*, lo cual contribuirá a la generación de conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés en plantas.

La segunda parte de la tesis estuvo destinada a la caracterización funcional de dos genes de *Physcomitrella* que se inducen en respuesta a patógenos (*PpPKC* y *PpBI-1*). Para ello se obtuvieron líneas transgénicas estables que sobre-expresan ambos genes en *Physcomitrella* y el gen *PpPKC* también fue expresado heterológamente en *Arabidopsis*. Los datos obtenidos de los patrones de expresión de *PpPKC*, junto con el estudio fenotípico de las líneas transgénicas de *Physcomitrella* y *Arabidopsis* sugiere que los productos derivados de *PpPKC* podrían contribuir al fortalecimiento de la pared y que dicho fortalecimiento contribuye a la resistencia a *P. irregulare* así como a aumentar la tolerancia al estrés salino. Los productos derivados de *PpPKC* podrían además tener otras funciones biológicas, incluyendo actividad antimicrobiana o incluso actuar como metabolitos antioxidantes.

Con respecto a la continuación del trabajo con *PpPKC*, nos proponemos evaluar fenotípicamente las líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *PpPKC* en respuesta a otro tipo de patógenos y en respuesta a estrés hídrico y comparar los resultados con plantas Col-0. Además se repetirán los ensayos de germinación de estas semillas en diferentes condiciones de estrés, incluyendo ABA, NaCl, entre otros. Se evaluará también el desempeño de las líneas sobre-expresantes de *Physcomitrella* durante la recuperación del estrés salino y osmótico. Dependiendo los resultados fenotípicos, como perspectiva a futuro nos proponemos expresar la *PpPKC* en plantas de interés agrícola con el fin de generar un producto de interés biotecnológico.

Queda pendiente para futuros proyectos expresar la proteína en un sistema heterólogo y determinar cuáles son los posibles sustratos, si tiene activa la función "ciclase" y que productos genera. Sería además interesante, determinar la actividad biológica de dichos productos, incluyendo estudios para determinar si tienen actividad antimicrobiana, antioxidante, etc.

La sobre-expresión del gen *PpBI-1* modifica el patrón de desarrollo de *Physcomitrella*, disminuyendo el largo de los rizoides y la cantidad de caulonema en los tejidos. Asimismo, la sobre-expresión del gen *PpBI-1*, modifica la respuesta de la planta frente al tratamiento con *B. cinerea*, aumentando de forma significativa la resistencia respecto a las plantas wt. La sobre-expresión de *PpBI-1* protege además a los tejidos de *Physcomitrella* de la PCD inducida por quitosano. Si bien la *PpBI-1* de *Physcomitrella* tiene un elevado grado de similitud con las proteínas BI-1 de otras plantas y animales, presenta variabilidad en el extremo C-terminal el cual se postula como el dominio anti-apoptótico.

Como perspectiva a futuro nos planteamos determinar si el C-terminal de la *PpBI-1* de *Physcomitrella* es funcional. Una posibilidad sería evaluar si *PpBI-1* es capaz de complementar el mutante *knockout* por T-DNA del *AtBI-1* de *Arabidopsis*. Queda pendiente para futuros proyectos analizar el grado de susceptibilidad de las líneas transgénicas a patógenos biótrofos.

7. BIBLIOGRAFÍA -

- Abad G, Abad J, Ochoa C (1995) Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the Peruvian Andes as the centre of origin of *Phytophthora infestans*. En: LJ Dowley, E Bannion, LR Cooke, T Keane, and E O'Sullivan (eds.). *Phytophthora infestans* 150. Ireland: Boole Press Ltd. 239-245.
- Abel, WO, Knebel W, Koop HU, Marienfeld JR, Quader H, Reski R, Schnepf E, Spörlein B (1989). A cytokinin-sensitive mutant of the moss *Physcomitrella patens*, defective in chloroplast division. *Protoplasma* 152:1–13.
- Abramoff MD, Magalhaes PJ y Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7):36-42.
- Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.* 20:60–69.
- Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. Fifth edition. Burlington, MA, USA., Elsevier Academic Press.
- Akita M, Valkonen JPT (2002) A Novel Gene Family in Moss (*Physcomitrella patens*) Shows Sequence Homology and a Phylogenetic Relationship with the TIR-NBS Class of Plant Disease Resistance Genes. *Journal of Molecular Evolution* 55:595–605.
- Albert M, K. Jehle A, Lipschis M, Mueller K, Zeng Y *et al.* (2010) Regulation of cell behaviour by plant receptor kinases: Pattern recognition receptors as prototypical models. *European Journal of Cell Biology* 89:200–207.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity *Cell* 92:773-784.
- Andersson RA, Akita M, Pirhonen M, Gammelgård E, Valkonen JPT (2005) Moss-*Erwinia* pathosystem reveals possible similarities in pathogenesis and pathogen defense in vascular and nonvascular plants. *Journal of General Plant Pathology* 71:23–28.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Arazi T (2012) MicroRNAs in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol Biol.* 80(1):55-65.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977-980.
- Ashton NC, Cove DJ (1977) The isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet.* 154: 87-95.

- Austin MB, Noel JP (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* 20: 79-110.
- Bagnaresi P, Biselli C, Orrù L, Urso S, Crispino L, Abbruscato P, Piffanelli P, Lupotto E, Cattivelli L, Valè G. *PLoS One*. 2012;7(12):e51609.
- Bassler HA, Flood SJ, Livak KJ, Marmaro J, Knorr R y Batt CA (1995) Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Oct;61(10):3724-8.
- Bell JN, Ryder TB, Wingate VP, Bailey JA, Lamb CJ. 1986. Differential accumulation of plant defence gene transcripts in a compatible and an incompatible plant-pathogen interaction. *Molecular and Cellular Biology* 6:1615-1623.
- Beike AK, Decker EL, Frank W, Lang D, Vervliet-Scheebaum M, Zimmer AD, Reski R (2010) Applied Bryology—Bryotechnology. *Trop Bryol* 31:22–32.
- Bent AF, Mackey D (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* 45:399-436.
- Bezanilla, M. *et al.* (2003) RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol*. 133(2):470-4.
- Birch PR, Kamoun S (2000) Studying Interaction Transcriptomes: Coordinated Analyses of Gene Expression During Plant Microorganism Interactions. *Trends in Plant Pathology* 77-82.
- Boller T, He SY(2009) *Science* 8:24(5928):742-4.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379–406.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464:418-422.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- 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(9):1573-84.
- 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(12):1845-57.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248–254.
- Brooks, D. M., C. L. Bender and B. N. Kunkel (2005). "The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*." *Molecular Plant Pathology* 6, 629-639.
- Browse, J (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 183–205.

- Butt A, Mousley C, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, Buchanan-Wollaston V (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* 16:209-221
- Castro A, Oliver JP, 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.
- Chang TC, Yamashita A, Chen CY, Yamashita Y, Zhu W, Durdan S, Kahvejian A, Sonenberg N, Shyu AB. (2004) UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev.* 16:2010-23.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803-814.
- Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek KH, Hwang I (2010) The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 19:284–295.
- 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(4):557-69.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43.
- Costacurta A, Vanderleyden J (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* 21:1–18.
- Cove JL, Knight CD, Lamparter T (1997) Mosses as model systems. *Trends Plant Sci.* 2: 99–105.
- Dalmay T, Horsefield R., Braunstein TH, Baulcombe DC (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis* *EMBO J.* 20:2069.
- Dangl JL, Dietrich RA, Thomas H (2000) Senescence and programmed cell death. In Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.*, 1044–1100.
- Dangl JL Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Davey MW, Van Monatgu M, Sanmatin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J. (2000) Plant l-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric.* 80:825–860.
- Davin LB, Lewis NG (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* 123:453-461.
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell* 24:275-287.
- De Lorenzo G; Ferrari S (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* 5:295-299.
- de Wit P (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:2726-2732.

- De Ascensão A, Dubery IA (2003) Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cúbense*. *Phytochem*, 63:679-686.
- Del Pozo O, Lam E (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr.Biol.* 8:R896.
- Dellano E, Marmey P, Penel C, Nicole M (2004) Les peroxidases vegetales de classe III. *Acta Bot Gall.* 353-380.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon R, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-8.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13454-13459.
- Diatchenko L, Chenchik A y Siebert PD (1998) Suppression subtractive hybridization: a method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly(A+) or total RNA. In. *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. Eds. Siebert, P y Larrick, J (BioTechniques Books, MA) 213-239.
- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED y Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(12):6025-6030.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7):1085-1097.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C.-J, Reddy MS, Wang L (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defense: A genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3, 371-390.
- Dóczy R, Ökrész L, Romero AE, Paccanaro A, Bögre L (2012) Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in Plant Science* 17:503-562.
- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Science* 2:266-274.
- Durrant W, Dong X (2004) Systemic Acquired Resistance», *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209.
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185-209.
- Egan A, Schlueter J, Spooner D (2012) Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *American Journal of Botany* 99(2):175-185.
- Eichmann R, Schultheiss H, Kogel KH, Hüchelhoven R. (2004) The barley apoptosis suppressor homologue BAX inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17(5):484-90.
- Elbaz M, Avni A, Weil M (2002) Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Cell Death Differ.* 9:726-733.
- Ellis R, Yuan J, Horvitz H (1991) Mechanisms and function of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-98.
- Facchini PJ, Bohlmann J, Covello PS, De Luca V, Mahadevan R, *et al.* (2012) Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. *Trends Biotechnol* 30:127-131.

- Farrel JRE (1993) RNA Methodologies: A guide for isolation and characterization Academic Press, San Diego, CA.
- Fattash I, Voss B, Reski R, Hess WR, Frank W (2007) Evidence for the rapid expansion of microRNA-mediated regulation in early land plant evolution. BMC plant biology. 7-13.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. The Plant Journal 18:265-276.
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. Annu Rev Plant Biol 53:275-297.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E. (2005). *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. Plant Cell 17:2601–2613.
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296.
- Forchetti G., O. Masciarelli, S. Alemano, D. Alvarez, G. Abdala. 2010. Native bacteria from sunflower roots produce salicylic acid and improve seedling growth under water deficit stress. Curr Microbiol 61:485-493.
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini, F. (2010) Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. Biochemistry 49, 835–842.
- Frank W *et al.* (2005) *Physcomitrella* patens is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. Planta 220(3):384-94.
- Fritz-Laylin LK, Krishnamurthy N, Tör M, Sjölander KV, Jones JDG (2005) Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. Plant Physiology 138: 611-623.
- Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM (2008) Plant Defense Priming against Herbivores: Getting Ready for a Different Battle Plant Physiology 146, 818-824.
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. Curr. Biol. 15:2038–2043.
- Gabriels S, Takken F, Vossen J, de Jong C, Liu Q, Turk S, Wachowski L, Peters Y, Witsenboer H, de Wit P, Joosten M (2006) cDNAFLP Combined with Functional Analysis Reveals Novel Genes Involved in the Hypersensitive Response, Molecular Plant-Microbe Interactions 19:567-576.
- Gachon C, Saindrenan P (2004) Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. Plant Physiology and Biochemistry 42: 367-371.
- Gagne SJ, Stout JM, Liu E, Boubakir Z, Clark SM, Page JE (2012) Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. Proc Natl Acad Sci USA 109(31):12811-6.
- Garber M, Grabher M, Guttman M, Trapnell C (2011) Computational Methods for Transcriptome Annotation and Quantification Using RNAseq, Nature Methods 8:469-478.
- Gerrienne P, Genez P (2010): Early evolution of life cycles in embryophytes: A focus on the fossil evidence of gametophyte/sporophyte size and morphological complexity. Journal of Systematics and Evolution, 49: 1-16.

- Gibson UE, Heid CA y Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6(10):995-1001.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205-27.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, *et al* (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*, 40:D1178–D1186.
- Göhre V, Robatzek S (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46:189-215.
- Gonneau M, Pagant S, Brun F, Laloue M (2001) Photoaffinity labelling with the cytokinin agonist azido-PPU of a 34 kDa peptide of the intracellular pathogenesis-related protein family in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant. Mol. Biol.* 46:539–548.
- Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol.* 2000 Jun 29;10(13):751-7.
- Gulledge A, Roberts A, Vora H, Patel K, Loraine A (2012) Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-Seq Data with Integrated Genome Browser Reveals Stress-Induced Alternative Splicing of the Putative Splicing Regulator SR45A. *American Journal of Botany* 99 (2): 219-231.
- Gupta AS, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993) Overexpression of superoxide Dismutase protects plants from Oxidative stress. *Plant Physiology* 103: 1067-1073.
- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:347-369.
- Hauck P, Thilmony R, He SY (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8577–8582.
- Hauck P, Thilmony R, He SY (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defence in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8577-8582.
- He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, Nurnberger T, Sheen J. (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125:563–575.
- He P, Shan L, Sheen J (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cellular Microbiology* 9:1385-1396.
- Heath MC (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ y Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.
- Heil M, Ton J (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* 13, 264-272.
- Hématy K, Cherk C, Somerville S (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:406-413.
- Higashi Y1, Takechi K, Takano H, Takio S. (2013) Involvement of microRNA in copper deficiency-induced repression of chloroplastic CuZn-superoxide dismutase genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 54(8):1345-55.

- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: Nucleic Acids Research Vol.27 1:297-300.
- Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, Turner JN (2005) Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* 97:580–588.
- Hückelhoven R, Dechert C, Kogel KH (2003) Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces break down of Mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 00:5550–60.
- Hückelhoven R (2004) BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9:299–307.
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:101-127.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C. *et al.* (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7:301–308.
- Imani JI, Baltruschat H, Stein E, Jia G, Vogelsberg J, Kogel KH, Hückelhoven R. (2004) Expression of barley BAX Inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol.* 7(4):279-84.
- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, 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*. 2011 August; 23(8):2924–2938.
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB (2003) An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell* 15:2503-2513.
- Jameson PE (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions. *Plant Growth Regulation* 32:369-380.
- 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.* 2011 Oct;192(2):319-27.
- Jones DA, Takemoto D (2004) Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules *Current Opinion in Immunology* 16:48-62.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell* 14:787–799.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:19–53.
- Kamisugi Y, Schlink K, Rensing SA, Schween G, Stackelberg M von, Cuming AC, Reski R, Cove DJ (2006) The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucl. Acids Res.* 34:6205–6214.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7(5):193-195.

- Kawai M, Pan L, Reed JC, Uchimiya H (1999) Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.* 464:143–147.
- Kawai-Yamada M, Jin L, Yoshinaga K, Hirata A, Uchimiya H (2001) Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12295–12300.
- Kawai-Yamada M, Ohori Y, Uchimiya H. (2004) Dissection of *Arabidopsis* BAX Inhibitor-1 suppressing BAX, hydrogen peroxide, and salicylic acid induced cell death. *Plant Cell* 16:21–32.
- Khraiweh, B. (2008) Specific gene silencing by artificial MicroRNAs in *Physcomitrella patens*: an alternative to targeted gene knockouts. *Plant Physiol.* 148(2):684-93.
- Kim JG, Taylor KW, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA, Mudgett MB (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *The Plant Cell* 20:1915-1929.
- Kim KH, Kang YJ, Kim DH, Yoon MY, Moon JK, Kim MY, Van K, Lee SH. (2011) RNA-Seq Analysis of a Soybean Near-Isogenic Line Carrying Bacterial Leaf Pustule-Resistant and -Susceptible Alleles. *DNA Res.* 18(6):483-497.
- Knepper, C., Savory, E.A., and Day, B. (2011a). *Arabidopsis* NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall. *Plant Physiol* 156, 286–300.
- Knepper, C., Savory, E.A., and Day, B. (2011b). The role of NDR1 in pathogen perception and plant defense signaling. *Plant Signaling & Behavior* 6:1114–1116.
- Kortekamp A, Zyprian E (2003) Characterization of Plasmopara-Resistance in grapevine using in vitro plants. *J Plant Physiol.* 160: 1393-1400.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics.
- Krzaczkowski L, Wright M, Gairin JE (2008) Bryophytes, a potent source of drugs for tomorrow's medicine? *Med Sci* 24:947–953
- Lacomme C, Cruz SS (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7956–7961.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response *Nature* 411:848–853.
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Molec. Biol.* 48:251-275.
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Molec. Biol.*, 48:251-275.
- Lang D, Eisinger J, Reski R, Rensing SA (2005) Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism in mosses. *Plant Biol* 7:238–250.
- Larson RA (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 27:969 – 978.
- Lawton, M., Saidasan, H. (2009). Pathogenesis in mosses, *Annual Plant Reviews* 36: 298–339.

- Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee SH, Shong M, Kim JM, Kim J, *et al.* (2007) Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447:1017–1020.
- Lehtonen MT, Akita M, Frank W, Reski R, Valkonen JPT (2012) Involvement of a Class III Peroxidase and the Mitochondrial Protein TSPO in Oxidative Burst Upon Treatment of Moss Plants with a Fungal Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:363–371.
- Lehtonen MT, Akita M, Kalkkinen N, Ahola-Iivarinen E, Rönholm G, Somervuo P, Thelander M, Valkonen JPT (2009) Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders. *New Phytologist* 183:432–443.
- Li R, Li Y, Kristiansen K, Wang J (2008) SOAP: Short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* 24:713-714.
- Li Y, Zhang QQ, Zhou JM (2010) Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiol* 152(4):2222-2231.
- Libault M, Wan JR, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G. (2007) Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defence elicitor. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20: 900-911.
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity on bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology* 168:512-522.
- Lionetti V, Cervone F, Bellincampi D (2012) Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J Plant Physiol.* 169(16):1623-30.
- Lister R, Gregory B, Ecker J (2009) Next Is Now: New Technologies for Sequencing of Genomes, Transcriptomes and Beyond, *Current Opinion in Plant Biology* 12(2):107-118.
- Lopez, M. A., G. Bannenberg and C. Castresana (2008). "Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival." *Current Opinion in Plant Biology* 11, 420-427.
- Lorrain S, Vaillau F, Balagué C, Roby D (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* 8:263-271.
- Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, DeVera ME, Liang X, Tör M, Billiar T (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological Reviews* 220:60-81.
- Lucena MA, Romero-Aranda R, Mercado JA, Cuartero J, Valpuesta V, Quesada MA (2003) Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant.* 118: 422–429.
- Ludwig-Müller J, Jülke S, Bierfreund NM, Decker EL, Reski R. (2009), Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytologist*, 181: 323–338.
- Maksimov IV (2009) Abscisic acid in the plants–pathogen interaction. *Russ. J. Plant Physiol.* 56:742-752.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton K, Dangl J, Dietrich R (2000) The Transcriptome of *Arabidopsis thaliana* During Systemic Acquired Resistance. *Nature Genetics* 26:403-410.

- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., Vance, V.B. (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13:571–583.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad (2008) RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 18:1509-1517.
- Martinez M, Limones V, Cabrera JL (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter.* 22:63-70.
- Mattinen, L.; Tshuikina, M.; Mäe, A.; Pirhonen, M. (2004) Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1366–1375.
- McCleary JA, Sypherd PS, Walkington DL (1960) Mosses as possible sources of antibiotics. *Science* 131:108.
- Menand B *et al.* (2007) An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* 316(5830):1477-80.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW (2003) Genome-Wide Analysis of NBS-LRR- Encoding Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 809–834.
- Mitsuhara I, Malik KA, Miura M, Ohashi Y (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-xL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* 1999;15:775-778.
- Mogensen J, Wimmer ER, Larsen JN, Spangfort MD Otzen DE (2002) The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J. Biol. Chem.* 277:23684–23692.
- Moller I, Sørensen I, Bernal AJ, Blaukopf C, Lee K, Øbro J, Pettolino F, Roberts A, Mikkelsen JD, Knox JP, Bacic A, Willats WGT (2007) High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant J.* 50:1118–1128.
- Morel JB, Dangl JL (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* 4(8):671-83.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5:621-628.
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101:533–542.
- Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J Plant Physiol.* 165:41–51.
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraiishi, Ichinose T (2008) Amino Acid Sequence of Bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 Is Required for Virulence Molecular Plant-Microbe Interactions 21:1165-1174.
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael AJ, Tohge T, Yamazaki M, Saito K (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.* 2014 Feb;77(3):367-79.

- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* 33:887-898.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436–439.
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* 18: 650–655.
- Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* 142:1364-1379.
- Newbiggin E, Vierstra RD (2003) Plant reproduction: Sex and self-denial. *Nature* 423: 229-230.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 30: 369-389.
- Nishiyama T, Fujita T, Shin IT, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y, Hasebe M (2003) Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8007-12.
- Noel JP, Austin MB, Bomati EK (2005) Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 8: 249-253.
- Norman-Setterblad C, Vidal S, Palva ET (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact.* 3(4):430-8.
- Nykyri, J., Niemi O, Koskinen P, Nokso-Koivisto J. Pasanen M, Broberg M., Plyusnin I, Törönen P, Holm L, Pirhonen M, Palva ET (2012) Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS Pathog.* 8(11).
- 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.
- Ogasawara, Y., H. Kaya, G. Hiraoka, F. Yumoto, S. Kimura, Y. Kadota, H. Hishinuma, E. Senzaki, S. Yamagoe, K. Nagata, M. Nara, K. Suzuki, M. Tanokura and K. Kuchitsu (2008). "Synergistic Activation of the *Arabidopsis* NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 283:8885-8892.
- 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(45):44439-47.
- Palva TK, Holmström K-O, Heino P, Palva, ET (1993) Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* *Mol Plant-Microbe Interact* 6:190–196.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* 318:113-116.

- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army Knife. *Plant Cell Rep*, 24:255-265.
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, De Samlanx GW, Buchala A, Mètraux JP, Manners J, Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8:2309-2323.
- Perombelon MCM, Kelman A (1980) Ecology of the soft-rot erwinias. *Annu Rev Phytopathol* 18:361–387.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:45.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) *Nature Chemical Biology* 5:308 – 316.
- 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.* 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.
- Prestridge, D.S., 1991. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *CABIOS* 7: 203–206.
- Prigge MJ, Bezanilla M (2010) Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development.* 137(21):3535-43.
- Proctor MCF, Pence VC (2002) Vegetative tissues: bryophytes, vascular resurrection plants and vegetative propagules. In: Black M, Pritchard H, eds. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. Wallingford, UK: CAB International. 207-237.
- Qiao J, Mitsuhashi I, Yazaki Y, Sakano K, Gotoh Y, Miura M, Ohashi Y (2002) Enhanced resistance to salt, cold and wound stresses by overproduction of animal cell death suppressors Bcl-xL and Ced-9 in tobacco cells—their possible contribution through improved function of organelle. *Plant Cell Physiol.* 2002;43:992-1005.
- Ramonell KM, Zhang B, Ewing RM, Chen Y, Xu D, Stace G, Somerville S (2002) Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana* *Molecular Plant Pathology* 3:301-311.
- Rantakari A, O Virtaharju, S Vähämäki, S Taira, ET Palva, HT Saarilahti, Romantschuk M (2001) Type III secretion contributes to the pathogenesis of the softrot 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, *et al.* (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 4:64-69.
- Reski R, Frank W (2005) Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics-Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4(1):48-57.
- Richter H, Pezet R, Viret O, Gindro K (2006) Characterization of 3 new partial stilbene synthase genes out of over 20 expressed in *Vitis vinifera* during the interaction with *Plasmopara viticola* *Physiological and molecular Plant Pathology* 67: 248-260.

- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49:317-343.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 2011;49:317-343.
- Robinson SA , Wasley J, Tobin AK (2003) Living on the edge-plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Global Change Biol.*9:1681-1717.
- 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.* 9:1897-906.
- Rojo E, Solano R, Sanchez-Serrano JJ (2003) Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J Plant Growth Regu.* 22:82-98.
- Ron M, Avni A (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylen e-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell* 16: 1604-1615.
- Ross AF (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-358.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8:1809-19.
- Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S (2006) A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.* 45(2):237-49.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-25.
- Sakakibara K, Nishiyama T, Sumikawa N, Kofuji R, Murata T, Hasebe M. (2003) Involvement of auxin and a homeodomain-leucine zipper I gene in rhizoid development of the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 130, 4835-4846.
- Sakai K, Ichikawa T, Yamada K, Yamashita M, Tanimoto M, Hikita A, Ijuin Y, Kondo K (1988) Antitumor principles in mosses: the first isolation and identification of maytansinoids, including a novel 15-methoxyansamitocin P-3. *J Nat Prod* 51:845-850.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis, T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanchez P, Zabala MT, Grant M (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J.* 21: 393-399.
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res,* 38(7) 995-1014.
- 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.* 4:143-50.
- Schaefer DG (2002) A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol* 53:477-501.

- Schaefer DG, Zryd JP (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. The plant Journal. 11(6): 1195-1206.
- Scherp P, Grotha R, Kutschera U (2001) Occurrence and phylogenetic significance of cytokinesis-related callose in green algae, bryophytes, ferns and seed plants. Plant Cell Rep. 20:143–149.
- Schuetz S, Wood AJ, Geisler M, Geisler-Lee J, Ligrone R, Renzaglia KS (2009) Novel localization of callose in the spores of *Physcomitrella patens* and phylogenomics of the callose synthase gene family. Ann. Bot. 103:749–756.
- Schwessinger B, Zipfel C (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. Current Opinion in Plant Biology 11:389-395.
- Scorrano L, Korsmeyer SJ (2003) Mechanism of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochem Biophys Res Commun 304:437–44.
- Segonzac C, Zipfel C (2011) Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria." Current Opinion in Microbiology 14:54-61.
- Segonzac C, Zipfel C (2011) Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria Current Opinion in Microbiology 14:54-61.
- Shah J (2009) Plants under attack: systemic signals in defence. Current Opinion in Plant Biology. 12:459-464.
- Shah J, Zeier J (2013) Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. Front Plant Sci 4, 30.
- Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F. (1999). The *Arabidopsis* ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. Plant Cell 11, 191-206.
- Shannon L, Kay E, Lewj Y (1966) Peroxidase isozymes from horseradish roots. Isolation and Physical Properties. J. Biol Chem. 241: 2166–2172.
- Shigeoka, S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta, Y, *et al.* (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes . J. Exp. Bot. 53:1305.
- Shirasu, K. (2009). The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. Annual Review of Plant Biology 60:139–164.
- Shiu S-H, Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y-H, Mayer KFX, Li W-H (2004). Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in *Arabidopsis* and Rice. Plant Cell 16:1220–1234.
- Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. Curr Opin Plant Biol. 2000a;3:229–235.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Levine A (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in programmed cell death in plants. Plant Cell 11:431–443.
- Speth EB, Lee YN, He SY (2007) Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. Current Opinion in Plant Biology 10:580-586.
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR (2003) ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. Plant Cell 15:885-898.

- Stumpe M, Göbel C, Faltin B, Beike AK, Hause B, Himmelsbach K, Bode J, Kramell R, Wasternack C, Frank W, *et al.* (2010) The moss *Physcomitrella patens* contains cyclopentenones but no jasmonates: mutations in allene oxide cyclase lead to reduced fertility and altered sporophyte morphology. *New Phytologist* 188:740–749.
- Subramanian S, Graham MY, Yu O, Graham TL (2005) RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol* 137 1–9.
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM. (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* 21(4):212-218.
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris pv campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* 18:764–779.
- Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A (2010) MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav.* 5(11):1370-8.
- Takken, F. L. W., M. Albrecht and W. I. L. Tameling (2006). "Resistance proteins: molecular switches of plant defence." *Current Opinion in Plant Biology* 9:383-390.
- Tang C-TC (2007) The Wound Response in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. Ph.D.dissertation, Rutgers University.
- Theologis A, Ecker JR, Palm CJ, Federspiel NA, Kaul S, White O, Alonso J, Altafi H, Araujo R, Bowman, CL, *et al.* (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:816-820.
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135:530-538.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876–4882.
- Ton J, Mauch-Mani B (2004) Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38:119–130.
- Torres MA (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138: 414–429.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141(2):373-8.
- Trapnell C., Williams B. A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., Van Baren M. J., *et al.* (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* 28 511–515.
- Trujillo M, Kogel KH, Huckelhoven R. (2004) Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17(3):304-12.
- Tuomi T, Laakso, S. Rosenqvist, H (1995), Plant hormones in fungi and bacteria from malting barley. *Jnl Institute Brewing*, 101: 351–357.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14:153-164.

- van der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* 23:454-456.
- Van der Does D., Leon-Reyes A., Koornneef A., Van Verk M. C., Rodenburg N., Pauwels L., *et al.* (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* 25:744–761.
- van Loon L (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119:243-254.
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inze D, Van Breusegem F (2003) A Comprehensive Analysis of Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression in Tobacco, *PNAS* 26:16113-16118.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B y Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.
- Vellosillo T, Vicente J, Kulasekaran S, Hamberg M, Castresana C (2010) Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens. *Plant Physiol.* 154:444–448.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance, but is required in signal transduction. *The Plant Cell* 6:959-965.
- Vidal S, Eriksson ARB, Montesano M, Denecke J, Palva ET (1998) Cell walldegrading 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, Tapio Palva (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes by antagonistic pathways *Plant Journal*, 11 (1):115-123.
- Vij S, Giri J, Dansana PK, Kapoor S, Tyagi AK (2008) The Receptor-Like Cytoplasmic Kinase (OsRLCK) Gene Family in Rice: Organization, Phylogenetic Relationship, and Expression during Development and Stress. *Mol. Plant* 1:732–750.
- Vlot AC, Klessig DF, Park SW (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11:436-442.
- Walters DR, McRoberts N (2006) Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci.* 11(12):581-6.
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2007) Plant responses todrought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10:57-63.
- Ward J, Ponnala L, Weber C (2012) Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany* 99
- Wu H, Cheung AY (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol. Biol.* 44: 267-281. (2):267-276.

- Xiang-yong L1, Yang-chao C, Ke-yuan Z, Mei-hong Z, Hai-qing L, Hsiang-fu K, Xin Z. (2010) Overexpression of Bax inhibitor-1 (BI-1) induces cell transformation in NIH3T3 cells. *Cell Biol Int.* 34(11):1099-104.
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou JM (2008). *Pseudomonas syringae* Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology* 18:74-80.
- Xu Q, Reed JC (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* 1: 337–346.
- Xue J-Y, Wang Y, Wu P, Wang Q, Yang L-T, Pan X-H, Wang B, Chen J-Q (2012) A Primary Survey on Bryophyte Species Reveals Two Novel Classes of Nucleotide-Binding Site (NBS) Genes. *PLoS ONE* 7, e36700.
- Yang Y, Shah J, Klessig DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* 11:1621-39.
- Young TE, Gallie DR (2000) Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* 44: 283-301.
- Yu CK, Springob K, Schmidt J, Nicholson RL, Chu IK, Yip WK, Lo Clive (2005) A stilbene synthase gene (SbSTS1) is involved in host and nonhost defence responses in sorghum. *Plant Physiology* 138:393-401.
- Yu, J.; Wang, J.; Lin, W.; Li, S.; Li, H.; Zhou, J.; Ni, P.; Dong, W.; Hu, S.; Zeng, C.; *et al.* The Genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, E38.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G., K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L., Yang, H. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296:79-92.
- Zhu QH, Stephen S, Kazan K, Jin G, Fan L, Taylor J, Dennis ES, Helliwell CA, Wang MB. *Gene*. (2013) Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. 2:259-66.
- Zimmer AD, Lang D, Buchta K, Rombauts S, Nishiyama T, Hasebe M, Van de Peer Y, Rensing SA, Reski R (2013) Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genomics* 14:498–517.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) *Plant Physiology*. 136:2621–26.
- Zipfel C (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767.
- Zipfel C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 20:10-16.
- Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity." *Current Opinion in Plant Biology* 12:414-420.

- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* 125:749–760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764–767.

8. ANEXO

8.1 Figuras suplementarias

Phypa_104998	-----ATGGCTTCTGCTCGGGATGTTACAA	25
Phypa_101257	ATGGCACCGCGAGCCGAGAGCTTGACGTCCGCCCTCCGATGAGCAGGTTCGCGCCGCCCCCTCGTGA	70
Phypa_149692	ATGGCACCAAG---CGGAGAAGTCGACGTT-----CAGGGTGTCTGCCAC-----A	42
Phypa_104998	GGGT-CGCGC-----TCCCAGGGGTGAGCCCGCGCTGAAGGCCAGCCCTGCGTGTAGGCATCGGCAC	89
Phypa_101257	GGATGCATGCGCCAAATCCCAGGGGTGAGCCCGCTGCGGAGGGTCCCGCTGCGTGTTCGGCATCGGCAC	140
Phypa_149692	AGGAGCGCGC-----TCCCAGAGGCCAGCCCTCGCGCTGAGGGAACAGCATGTGTGTTCGGCCTCGGCAC	107
Phypa_104998	TGCGGTGCCTCCCGCGGAGTTTCTGCAGAGTGAGTACCCCGACTTCTTCTTCAACATCACCAACTGCGGC	159
Phypa_101257	TGCTTGTGCTCCACCGAGTTCCTGCAGAGCGAGTACCCCGACTTCTTCTTCAACATCACCACACCGC	210
Phypa_149692	TGCGGTGCCTCCCGCGGAGTTCTCTGCAGAGCGAGTACCCCGACTTCTTCTTCAACATCACCAACTGCGGC	177
Phypa_104998	GAGAAGGAAGCCCTCAAGGCCAAATTC AAGCGCATCTGTGACAAGTCGGGCATCCGGAAGCGCCACATGT	229
Phypa_101257	GAGAAGGAGGCCCTGCAAGGCCAAATTC AAGCGCATCTGCAGCAAGTCGGCATCAGGAAGCGCCACATGT	280
Phypa_149692	GAGAAGGACGCCCTGAAGGCCAAATTC AAGCGCATCTGTGACAAGTCGGGATCCGCAAGCGCCACATGT	247
Phypa_104998	TCTCACGGAGGAGGTGCTCAAGGCCAACCCAGGCATCTGCACGTACATGGAGCCCTCCCTGAACGTCCG	299
Phypa_101257	TCCTCACGGAGGAGGTGCTCAAGGCCAACCCAGCATCTGCACGTACATGGAGCCCTCCCTGAACGTCCG	350
Phypa_149692	TCCTCACGGAGGAGGTGCTCAAGGCCAACCCGGCATCTGCACGTACATGGAGCCCTCCCTGAACGTCCG	317
Phypa_104998	CCATGACATCGTCTGCTCCAGGTCCCAAGCTCGCCCGGAGGCCCGCCAGAAGGCCATCAAGGAATGG	369
Phypa_101257	CCACGACATCGTCTGCTCCAGGTGCCAAGCTGCGCGCCAGGCCCGCCAGAAGGCCATCAAGGAGTGG	420
Phypa_149692	CCACGACATCGTCTGCTCCAGGTCCCAAGCTCGCCCGGAGGCCAGCCAGAGGCCATCAAGGAGTGG	387
Phypa_104998	GGCGGCCGCAAGTCCGACATACCCACATCGTCTTCCGCCACCACCTCGGGTGTCAACATGCCCGGAGCCG	439
Phypa_101257	GGCGGCCGCAAGTCCGACATCACACATCGTGTTCGCCACCACCAGCGGGCTGAACATGCCCGGAGCCG	490
Phypa_149692	GGCGGCCGCAAGTCTGACATCACCCACATCGTGTTCGCCACCACCAGCGGGCTGAACATGCCCGGAGCCG	457
Phypa_104998	ATCACGCCCTGGCCAAGCTGCTCGGCCTGAAGCCACCTGTGAAGCGTGTCAATGATGTACCAACACCGGGTG	509
Phypa_101257	ACCACGCCCTGGCCAAGCTGCTGGGCTTGAAGCCACCTGTGAAGCGGTGATGATGTACCAGACCGGGTG	560
Phypa_149692	ACCACGCCCTGGCCAAGCTGCTGGGCTTGAAGCCACCTGTGAAGCGGTGATGATGTACCAGACCGGGTG	527
Phypa_104998	TTTCGGCGGTGCATCCGTGCTCAGATGGCCAAAGGATCTAGCCGAACAACAAGGGCGCCCAAGTGTG	579
Phypa_101257	CTTCGGCGGTGCCTCCGTGCTCCGGTGGCCAAAGGATCTGGCCGAGAACAAACAAGGGCGCCAGGTTGTG	630
Phypa_149692	CTTTGGCGGTGCTTCCGTGCTCAGGTGGCCAAAGGATCTGGCGAGAACAAACAAGGGCGCCAGGTTGTG	597
Phypa_104998	GCAGTCCGAGCGAGGTGACCGCAGTCACATACCGAGCCCGAGCGAGAACCACCTTGGACGGCTTGTGG	649
Phypa_101257	GCGGTTCGAGCGAGGTGACCGCCGTACCTTACCGGCCCGAGCGAGAACCACCTTGGACGGCTTGTGG	700
Phypa_149692	GCGGTGGCCAGCGAGGTGACCGCCGTACATACCGCCACCAGCGAGAACCACCTTGGACGGCTTGTGG	667
Phypa_104998	GCTCACTCTGTTCCGGCATGGCGCCGGCGTACGTGGTGGATCCGACCCCAAGCCGAGGTAGAGAA	719
Phypa_101257	GATCCGGCCTGTTCCGGCATGGCGCCGGCGTACGTGGTGGGATCCGACCCCAAGCCGAGGCGGAGAA	770
Phypa_149692	GCTCCGCCCTGTTCCGGCATGGCGCCGGAGTGTACGTGGTGGGATCCGATCCCAAGCCGAGGTGGAGAA	737
Phypa_104998	GCCATTGTTTGAAGTGCAGTGGGCTGGAGAGACCATCTTACAGAGAGTGACGGCGCCATCGATGGAAT	789
Phypa_101257	GCGTGTGTTTGAAGTGCAGTGGGCGGGCGAGTCCATCTTGCCTGAGAGCGACGGCCCATCGAGGGCAC	840
Phypa_149692	AGCACTGTTTGAAGTGCAGTGGGCGGGCGAGACGATCTTCCAGAGAGTGAAGGACCATTCATGGGCAT	807
Phypa_104998	CTCACGGAAGCAAGGCTCATCTTCCACCTCATGAAGGATGTAACCGGGCTCATCTCCAAGAACATCGAGA	859
Phypa_101257	CTCACGGAGGCGGGGCTCATCTTCCACCTCATGAAGGACGTGCCAGGGCTGATCTCCAAGAACATCGAGA	910
Phypa_149692	CTGACGGAGGCGGGGCTCATCTTCCACCTCATGAAGGACGTGCCAGGGCTGATCTCCAAGAACATCGAGA	877
Phypa_104998	AGTTTGTGAACGAGGCCAGGAAGCCAAGTGGATCACCGGCATGGAACGAGATGTTCTGGCGGTGCAATCC	929
Phypa_101257	AGTTTGTGAACGAGGCCAGGAAGTCCGTTGGCTCCGGCAGTGGAAACGAAATGTTCTGGGCTGTGACCCC	980
Phypa_149692	AGTTTGTGAACGAGGCCAGGAAGTCCGTTGGCTCCGGCAGTGGAAACGAGATGTTCTGGCGGTGACCCC	947
Phypa_104998	CGGAGTCCAGCCATTCTCGATCAGGTGAGGCCAAGCTGAAGCTGACCAAGGACAAGATGCAAGGGAGC	999


```

Phypa_101257  A G G A G C C C G G C C A T C T G G A C C A G G T C G A G G C G A A C T G A A G C T G A C C A A G G A C A A G A T G C A G G G G A G C 1050
Phypa_149692  G G G A G C C C G G C C A T T C T G G A C C A G G T G G A G G C G A A G C T G A A G C T G A C C A A G G A C A A G A T G C A G G G G A G C 1017

Phypa_104998  A G G G A C A T A T G T C C G A G T T T G G C A A C A T G T C T A G C C G T C T T G T G T T G T T G T G T T G G A T C A G A T T C G G C 1069
Phypa_101257  A G G G A C A T C C T G T C G G A G T A C G G C A A C A T G T C G A G C T C G T C G G T G T T G T T C G T G C T G G A T C A G A T T C G G C 1120
Phypa_149692  A G G G A C A T A C T G T C G G A G T A C G G C A A C A T G T C G T C C G C G T C G G T G T T G T T C G T G C T G G A T C A G A T T C G C C 1087

Phypa_104998  A C A G G T C T G T G A A G A T G G G T G C G T C C A C T T T G G G C G A G G G C A G C G A G T T C G G A T T C T T C A T T G G C T T C G G 1139
Phypa_101257  A G A G G T C G G T G A A G A T G G G G G C G T C C A C G T G G G A G A G G G C A G C G A C T T C G G C T T C T T C A T C G G C T T C G G 1190
Phypa_149692  A G A G G T C G G T C A A G A T G G G G G C G T C A C G C T G G G A G A G G G C A G C G A G T T T G C T T C T T C A T T G G A T T C G G 1157

Phypa_104998  A C C A G G A C T G A C A C T A G A A G T G C T T G T G C T C C G T G C C G C T C C A A C T C C G C T T A G 1194
Phypa_101257  G C C G G G C T G A C G T T G G A C G T G C T G T G C T T C G C G C C G C C G A A C --- G T C T A A 1242
Phypa_149692  T C C G G G C T C A C C T G G A A G T G C T G G T C C T C C G G C C G C C A C C --- G T T T G A 1209

```

Figura 1. Alineamiento de tres secuencias codificantes de genes identificados con alta homología a CHS en *Physcomitrella*. Se utilizó el software Mega versión 5.0. Los guiones indican ausencia de nucleótido en esa posición.



Figura 2. Inducción del esporofito. Gametóforos de tipo salvaje y sobre-expresantes *OEPKC1* *OEPKC3* crecidos durante seis semanas en condiciones estándar, y luego transferidos a condiciones de 15°C y día cortopara inducir la formación de esporofitos. Las flechas negras señalan los esporofitos formados en la línea *OEPKC1*. La barra de escala representa 3 mm.

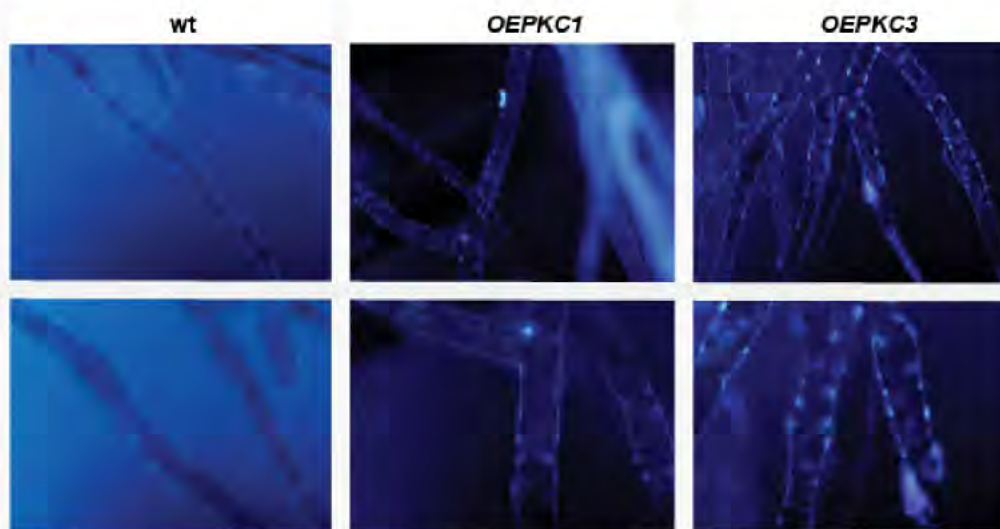


Figura 3. Acumulación de compuestos fenólicos. Tinción con solofenil de protonemas de plantas salvajes y sobre-expresantes *OEPKC1* y *OEPKC3*.

8.2 Abreviaturas

ABA	Ácido Abscisico
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARNi	ARN de interferencia
ARNi	ARN de interferencia
AsA	Ácido Ascórbico
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BI-1	Bax Inhibitor
BI-1	Bax inhibitor 1
BR	Brasinosteroides
CAT	catalasa
CDPK	proteína quinasa dependiente de calcio
CF	Filtrado de cultivo
CHS	chalcona sintasa
CK	citoquininas
COR	coronatina
DAMPs	Damage Associated Molecular Pattern
DIR	dirigente
EF-Tu	Factor de elongación Tu
ET	Etileno
ETI	Effector Triggered Immunity
ETS	Effector Triggered Susceptibility
GA	Giberelinas
GFP	Green fluorescent protein
GSH	glutación
HR	Respuesta de Hipersensibilidad
hrp	hypersensitive response and pathogenicity
Hyg	Higromicina
ISR	Induced Systemic Resistance
JA	Ácido Jasmónico
Km	Kanamicina
LOX	lipoxigenasas
LRR	Región rica en Leucina
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
NB	Unión a nucleótido
NDR1	non-race specific disease resistance
<i>P. debaryanum</i>	<i>Pythium debaryanum</i>
<i>P. irregulare</i>	<i>Pythium irregulare</i>
PAL	fenil-amonioliasa
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCD	Muerte celular programada
PCWDE	Plant Cell Wall Degrading Enzymes
<i>Pectobacterium carotovorum</i> sp. <i>carotovorum</i>	<i>P.c. carotovorum</i>
PEG	Polietilenglicol
<i>Physcomitrella</i>	<i>Physcomitrella patens</i> (Gransden 2004)
PKC	policétido ciclasa
PKC	Policétido ciclasa
PKS	policétido sintasa
PME	Pectina metil esterasas
PR	Patogenesis related
PTI	PAMP Triggered Immunity
RLK	Receptor tipo quinasa
RLP	Receptor tipo proteína
ROS	Especies reactivas de oxígeno

SA
SAR
SOD
TIR-NB-LRR
TTSS
TUNEL

wt

Ácido Salicílico
Respuesta Sistemica Adquirida
superóxido dismutasa
Toll Interleukin 1 Receptor
Sistema de secreción de tipo III
Terminal deoxynucleotidyl Transferase-
mediated dUTP Nick End Labeling
wild type