RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Boccardo, Noelia A.

Desarrollo de nuevos vectores para la obtención de plantas transplastómicas resistentes a patógenos

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Boccardo, N. A. (2018). Desarrollo de nuevos vectores para la obtención de plantas transplastómicas resistentes a patógenos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2025

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Noelia A. Boccardo, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Marzo de 2018, 158 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Desarrollo de nuevos vectores para la obtención de plantas transplastómicas resistentes a patógenos

TESIS DOCTORAL

Noelia A. Boccardo

noeliaboccardo@gmail.com

Resumen

En el marco de este trabajo de tesis doctoral, se encaró el desarrollo de un novedoso sistema de expresión de proteínas heterólogas mediante transformación del genoma plastídico, para ser utilizado con diferentes aplicaciones, entre ellas obtener plantas resistentes a patógenos. Por un lado, nos propusimos obtener un sistema inducible de expresión de proteínas heterólogas en el cloroplasto, que incluye elementos de Quorum sensing (QS) bacterianos. Esta estrategia nos permitiría obtener plantas resistentes a patógenos mediante la expresión de proteínas con actividad antimicrobiana, inducidas por las homoserin lactonas (AHLs) producidas por los patógenos que infectan la planta. Además, se evaluó la posibilidad de expresar en los plástidos proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) como estrategia para obtener plantas resistentes a diversos patógenos y finalmente decidimos transformar el genoma plastídico de N. benthamiana, para ser utilizada como planta modelo en estudios con patógenos para los cuáles N. tabacum es no hospedante.

Se diseñaron y desarrollaron los vectores del sistema inducible por AHLs, señales químicas involucradas en el mecanismo de QS bacteriano. En los vectores desarrollados la activación de la expresión génica está bajo el control del promotor del gen LasB, que responde a los reguladores transcripcionales LasR y RhlR cuando estos se encuentran en presencia de las AHLs correspondientes, y permitiendo la expresión de la secuencia codificante uid-A (codifica la proteína reportera β-glucuronidasa). Se comprobó la integración de la construcción genética y la correcta expresión de los reguladores LasR y RhlR en las plantas transplastómicas.

Mediante la aplicación exógena de AHLs sintéticas a plantas transplastómicas se visualizó la inducción del sistema, sin embargo, no se pudo reproducir este resultado.

Desafortunadamente no se pudo visualizar actividad β-glucuronidasa en las plantas transgenicas que expresan los reguladores transcripcionales LasR y RhlR.

Se caracterizaron molecularmente, y se evaluó la efectividad frente a patógenos, de las plantas transplastómicas de tabaco transformadas con construcciones diseñadas para acumular las proteínas PR AP24 y β-1,3-glucanasa en el estroma de los plástidos (utrAP24-Gluc). Se demostró que estas plantas poseen una alta resistencia frente al ataque de hongos y oomicetes en condiciones de invernadero y de campo. Con estos resultados alentadores, actualmente estamos realizando experimentos de bombardeo con el plaásmido utrAP24-Gluc para la transformación del genoma plastídico de papa.

Finalmente se estableció la metodología para la transformación de cloroplastos de N. benthamiana con el vector pBSW-utrGUS diseñado para transformar N. tabacum. Se obtuvieron las primeras plantas transplastómicas que expresan la proteína reportera GUS que están siendo analizadas. En la actualidad, se están realizando ensayos de transformación del genoma plastídico de N. benthamiana con el plásmido utrAP24-Gluc, con el objetivo de generar una nueva herramienta para evaluar estrategias de resistencia a patógenos para los cuáles el tabaco no es un modelo adecuado.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Universidad Nacional de Quilmes

INGEBI-CONICET

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres"

"Desarrollo de nuevos vectores para la obtención de plantas transplastómicas resistentes a patógenos"

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes

con mención en Ciencia y Tecnología.

Lic. Noelia A. Boccardo

Director de tesis: Dr. Fernando Félix Bravo-Almonacid

Co-Directora: Dra. María Eugenia Segretin

Consejero de estudios: Dr. Claudio Valverde

Buenos Aires, Marzo 2018

Agradecimientos

En primer lugar, debo agradecerles a Fernando y Eugenia, sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. Gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, por ser tan generosos conmigo y por enseñarme como se hace buena ciencia.

A los bravisimos (Euge, Vero, Cata, Caro, Mauricio, Fede, Junior y Mauro) excelentes compañeros y personas, mi nueva familia durante estos 5 años.

A todo el 201 (Sofi, Ana, Denise, Luciana, Mariana y Diego) y muchas otras personas del instituto que hacen que el INGEBI sea un gran lugar para trabajar.

A Marina y Vero por ayudarnos a que las tareas del día a día sean menores.

A mis amigos (Romi, Eli, Nestor, Ana, Andre, Sole, Romi y Roco), especialmente a las chicas de la facultad por acompañarme en esta etapa y compartir las frustraciones del doctorado.

A mi novio y su familia, por dejarme formar parte de ella y yo así sentirlo. A mi novio, gracias por apoyar cada una de mis iniciativas y decisiones, y por los incontables viajes entre Quilmes y Belgrano.

A mi familia (mis papas, mi hermana y mis perros), por ser lo más importante de mi vida, por siempre creer en mí y alentarme a que con esfuerzo nada es imposible.

INDICE

Introducción General **9**

1. Factores que afectan la producción agrícola **10**

1.1 Enfermedades que afectan al cultivo de papa y otras solanáceas 11

2. Desarrollo de las enfermedades y mecanismos de defensa de las plantas **13**

2.1 Defensas preformadas de las plantas 13

2.2 Defensas inducidas por la presencia del patógeno en las plantas 14

2.2.1 Inmunidad activada por PAMPs 14

2.2.2 Inmunidad desencadenada por efectores 15

2.2.3 Resistencia Sistémica Adquirida 16

3. Obtención de resistencia a patógenos mediante mejoramiento **17**

4. Transformación del genoma de cloroplastos por biobalística **18**

Parte A .- Desarrollo de un sistema de expresión inducible basado en el mecanismo de *quorum sensing* **23**

Introducción **23**

1. Sistemas de Quorum sensing **24**

1.1 Proteínas R 25

1.2 Proteínas I 26

2. Sistema de Quorum sensing en Pseudomonas aeruginosa **26**

3. Sistemas de expresión inducible en plantas **27**

3.1 Expresión inducible de transgenes integrados en el genoma nuclear 27

3.2 Expresión inducible de transgenes integrados en el genoma plastídico 28

3.3 *Quorum sensing* y biotecnología en plantas 29

Objetivo general **31**

Resultados **32**

1. Desarrollo de los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR para la transformación plastídica de tabaco **33**

2. Clonado de los distintos elementos para la construcción de los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR **35**

2.1 Construcción del vector utrQS-RhlR 37

2.2 Construcción del vector utrQS-LasR 38

2.3 Construcción del vector utrQS-LasR+RhlR 38

3. Evaluación de las construcciones en un sistema procariota **42**

4. Transformación de cloroplastos de *N. tabacum* con las construcciones utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR 43

5. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas transplastómicas 45

5.1 Análisis fenotípico de plantas transplastómicas 45

5.2. Análisis del estado homoplástico 48

5.3. Caracterización de los transcriptos en las plantas transplastómicas 50

5.4 Expresión de LasR y RhlR en plantas transplastómicas 52

6. Ensayos funcionales de las líneas transplastómicas 55

6.1 Evaluación preliminar de la inducibilidad por AHLs en plantas transplastómicas 55

6.2 Análisis de la inducibilidad del sistema utilizando AHLs sintéticas 57

7. Desarrollo de vectores para la producción de AHLs en cloroplastos 60

7.1 Antecedentes previos 60

7.2 Construcción de los vectores pEAQ-PT 61

7.2.1 Clonado de los distintos elementos para la construcción de los vectores pEAQ-PT 64

7.2.2 Construcción de los vectores pEAQ-PT:LasI y pEAQ-PT:RhlI 64

7.2.3 Construcción de los vectores pEAQ-PT:LasI-His y pEAQ-PT:RhlI-His 65

7.3 Análisis de la funcionalidad de los vectores mediante expresión transitoria y *western blot* . 67

7.4 Obtención de plantas transgénicas nucleares con los genes de sintasas de AHLs (LasI y RhlI) 68

7.5 Evaluación funcional de las plantas transgénicas obtenidas mediante el uso de cepas indicadoras 69

7.6 Evaluación de la expresión de las proteínas LasR y RhlR en presencia de AHLs 71

Parte B - Obtención de cultivos resistentes a patógenos 74

Introducción 74

1. Estrategias para el control de enfermedades 75

2. Mejoramiento de cultivos mediante la expresión de péptidos antimicrobianos . 77

Objetivo general 79

Resultados 80

1. Resultados previos al inicio de la tesis 81

2. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas de *N. tabacum* obtenidas con la construcción utrAP24-Gluc. 82

2.1. Analisis de la integración del transgen 82

2.2. Análisis del estado homoplástico 83

2.3. Caracterización de los transcriptos que contienen las secuencias de glucanasa y AP24 en las plantas transplastómicas 85

2.4. Análisis fenotípico de plantas transplastómicas con la construcción utrAP24-Gluc. 86

3. Ensayos de resistencia a hongos y oomicetes de las plantas transplastómicas 87

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.1 Evaluación de la resistencia de las plantas transplastómicas de tabaco a *Rhizoctonia solani* en condiciones de invernadero ... 88

3.2. Evaluación de la resistencia de las plantas transplastómicas de tabaco frente a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* en condiciones de campo ... 89

Introducción ... 92

1. *N. benthamiana* como modelo de estudio ... 93

OBJETIVOS GENERALES ... 94

Parte C - Establecimiento de la transformación de plástidos de *N. benthamiana* ... 95

Resultados ... 95

1. Antecedentes previos al inicio de la tesis ... 96

2. Comparación de secuencias de los genomas plastídicos de *N. benthamiana* y *N. tabacum* ... 96

3. Determinación de los parámetros óptimos para la transformación por biobalística de hojas de *N. benthamiana* ... 97

4. Comparación de medios de regeneración ... 99

5. Transformación del genoma plastídico de *N. benthamiana* con el vector pBSW-utrGus ... 100

6. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas de *N. benthamiana* transformadas ... 101

7. Evaluación de la expresión de *uidA* en las plantas transplastómicas ... 103

Discusión General ... 106

1. Desarrollo de un sistema de expresión inducible basado en el mecanismo de quorum sensing ... 107

2. Obtención de cultivos resistentes a patógenos ... 111

3. Establecimiento de la transformación de plástidos de *N. benthamiana* ... 114

Conclusión ... 115

Materiales y Métodos ... 116

1. Cepas bacterianas ... 117

1.1 Escherichia coli ... 117

1.2 Agrobacterium tumefaciens ... 118

1.3 Bacterias para ensayos de cepas indicadoras ... 119

2. Líneas de plantas ... 119

3. Plásmidos ... 120

3.1 Comerciales ... 120

3.2 No comerciales ... 120

4. Secuencias ... 121

5. Oligonucleótidos iniciadores 124
6. Metodología del ADN recombinante 126
6.1 Aislamiento de ADN plasmídico 126
6.2 Preparación de plásmidos e insertos 126
7. Ensayos de actividad enzimática 128
7.1 Ensayo histoquímico para detectar actividad β-glucuronidasa 128
7.2 Ensayo fluorométrico para detectar activividad β-glucuronidasa 129
7.3 Ensayos para detectar AHLs 129
8. Ensayos de expresión transitoria en plantas de tabaco 130
8.1 Agroinfiltración con A. tumefaciens 130
8.2 Bombardeo con micropartículas 131
9. Transformación de plantas de tabaco 131
9.1 Transformación de plantas de tabaco mediada por *A. tumefaciens* 131
9.2 Transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística. 132
9.3 Transformación de cloroplastos de papa por biobalística. 134
10. Análisis de ADN 136
10.1 Aislamiento del ADN de plantas de tabaco. 136
10.2 PCR para chequeo de plantas transgénicas. 137
10.3 PCR para chequeo de plantas transplastómicas. 137
10.4 Ensayo de Southern blot. 138
11. Análisis de ARN 140
11,1 Extracción del ARN total de plantas de tabaco. 140
11.2 Ensayo de *northern blot.* 141
12. Análisis de proteínas 143
12.1 Extracción de proteínas. 143
12.2 Electroforesis de proteínas. 144
12.3 Ensayo de *Western blot.* 144
13. Ensayos de inducción del sistema de QS 145
13.1 Inducción del sistema de QS en plantas transplastómicas 145
13.2 Induccion *in vitro* de machacado de hojas 145
14. Ensayos de infección de plantas transplastómicas de tabaco 146

Introducción General

1. Factores que afectan la producción agrícola

Desde los comienzos de la agricultura, hace unos 10.000 años, los productores han tenido que contener el ataque de organismos nocivos a los cultivos: plagas animales (insectos, ácaros, nematodos, roedores, babosas y caracoles, aves), patógenos de plantas (virus, bacterias, hongos, oomicetes), y malezas. Por otro lado, los factores abióticos pueden ocasionar pérdidas importantes en el rendimiento de los cultivos, especialmente la falta o exceso de agua en la estación de crecimiento, temperaturas extremas, irradiación alta o baja, alta salinidad y deficiencia de nutrientes. Estos diferentes tipos de estreses pueden reducir sustancialmente la productividad (pre y/o post-cosecha) y para su control se utilizan métodos físicos (desmalezado mecánico, etc.), biológicos (elección del cultivar, uso de cultivos libres de patógenos, rotación de cultivos, control de depredadores, etc.) y químicos (fertilizantes y pesticidas).

Las tecnologías agrícolas actuales requieren grandes insumos de energía para la preparación del suelo, el riego y la aplicación de fertilizantes y pesticidas; siendo algunos de estos procesos productores de gases de efecto invernadero. A pesar de un claro aumento en el uso de pesticidas, las pérdidas en el rendimiento de los cultivos no han disminuido significativamente durante los últimos 40 años [1].

Se estima que para el año 2050, debido al crecimiento de la población, la producción agrícola deberá aumentar aproximadamente un 70%. La intensificación de la agricultura de manera sustentable conlleva un número de desafíos paralelos para mantener la seguridad alimentaria, minimizar el impacto ambiental y optimizar el uso del agua [2, 3]. Sin embargo, los desafíos por obtener mayores rendimientos en la producción no son nuevos. El vínculo entre la producción eficiente y el uso de insumos impulsó la Revolución Verde de la década de 1960 y continúa motivando la innovación y la integración de nuevas tecnologías para abordar el problema [4, 5]. Lo que ha cambiado es la mayor tasa de crecimiento de la población y el cambio climático que empujará a la agricultura a sus límites en las próximas décadas, pero las herramientas disponibles para enfrentar estos problemas también se han expandido. Desde que se completó la secuenciación del primer genoma de planta en el año 2000, el aumento en la cantidad de datos y el desarrollo de nuevas tecnologías capaces de conectar la información de genomas, fenotipos y el medio ambiente, han acelerado el ciclo de descubrimiento y evaluación de nuevas estrategias para el mejoramiento vegetal.

1.1 Enfermedades que afectan al cultivo de papa y otras solanáceas

La producción agrícola de los cultivos están sujetos al ataque por diversos patógenos, y se estima que al menos el 10% de la producción de los cultivos se pierde a causa de plagas y patógenos [6].

La agricultura actual se basa en el uso de cultivos comerciales con una base genética estrecha que son sembrados lejos de sus centros de origen y, por ende, lejos de los patógenos con los que han coevolucionado. Debido a ello, es probable que en dichos cultivos no se hayan seleccionado mecanismos de resistencia contra nuevas razas de patógenos que puedan haber surgido en los centros de origen. Por otro lado, el cambio climático podría alterar la fase de las etapas del ciclo de vida y tasas de desarrollo de plagas y patógenos y organismos antagonistas asociados [7]. Si estas nuevas variantes de patógenos llegaran a contactar al cultivo, este probablemente resultaría susceptible. De la misma forma, los cultivos introducidos en nuevas áreas geográficas serán más vulnerables al ataque por patógenos locales [6].

Dentro de los cultivos de relevancia agronómica cuya productividad se ve severamente afectada a causa de enfermedades se encuentra la papa, perteneciente a la familia *Solanaceae.* La familia de las solanáceas comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2500 especies de plantas esparcidas en una gran variedad de hábitats, encontrándose la mayor diversidad de especies en América del Sur y América Central. Muchas de sus especies tienen un gran valor para el hombre por sus propiedades alimentarias (papa, tomate, pimiento, etc.), por sus propiedades como productoras de alcaloides (tabaco, belladona, estramonio, beleño, mandrágora, etc.) y como plantas ornamentales (Petunia, Schizanthus, Salpiglossis y Datura). Además, las solanáceas incluyen muchos organismos modelos para investigar cuestiones biológicas fundamentales a nivel celular, molecular y genético, tales como el tabaco y la petunia.

La papa (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* y otras) es la especie cultivada de mayor importancia entre las solanáceas y se incluye dentro de los 14 cultivos de mayor consumo en la alimentación mundial, siendo el segundo cultivo más importante luego de los cereales [8]. Su importancia nutricional radica en su elevado contenido de agua y en su alto contenido de almidón (18-20% de su peso seco) y sustancias minerales. Originaria de los Andes peruanos, la papa está mejor adaptada a los climas templado-fríos, sin embargo, se ha expandido a áreas de cultivo tropicales y subtropicales. Esta expansión del cultivo genera una mayor susceptibilidad a enfermedades que afectan severamente la productividad.

En la Argentina se cultivan principalmente 15 variedades de papa, siendo Spunta la de mayor importancia en cuanto a su comercialización, con más del 70% del mercado. Con un

promedio de 2 millones de toneladas anuales, la Argentina se ubica como el tercer productor de papa de América latina, luego de Perú y Brasil [8, 9]. Este cultivo se ve severamente afectado por diversos patógenos filamentosos, grupo que comprende a numerosos patógenos eucariotas causantes de las enfermedades más destructivas que afectan a las especies vegetales (ocasionan pérdidas de billones de dólares anuales a nivel mundial) y que ponen en riesgo la seguridad alimentaria. Se incluyen en este grupo a hongos y oomicetes. En nuestro país, ubicado entre los principales productores de alimentos con 32 millones de hectáreas cultivables, la incidencia de patógenos filamentosos se ha incrementado durante las últimas décadas, situación que se espera empeore a causa de alteraciones en el clima y una alta homogeneidad genética de los cultivos. El cultivo de papa se ve severamente afectado por diversos patógenos, especialmente *Phytophtora infestans* ("tizón tardío"), *Rhizoctonia solani* ("cancro del tallo") y *Alternaria solani* ("tizón temprano") [10]. *P. infestans,* oomicete responsable de la Gran Hambruna Irlandesa a mediados del 1800, es una de las amenazas más importantes para la producción de alimentos a nivel mundial, ocasionando pérdidas económicas que exceden los 5 billones de dólares anuales. El tizón tardío de la papa es la enfermedad más grave de las distintas zonas productoras de papa de la Argentina. Bajo condiciones de temperatura templada y de alta humedad ambiente o de abundantes lluvias, puede causar grandes pérdidas económicas, de hasta el 50% del rendimiento [11]. En particular, el problema empeora dado que los dos cultivares de papa más extendidos en Argentina (Spunta y Kennebec, abarcando más del 80% de la superficie sembrada), son susceptibles a *P. infestans* [8, 12].

El tabaco (*Nicotiana tabacum*) es una especie modelo que presenta numerosas ventajas dentro de la familia de las solanáceas, y puede utilizarse para realizar pruebas de concepto con el objetivo de evaluar diferentes estrategias de resistencia a patógenos. Además, es el cultivo no alimenticio más importante del planeta y contribuye a la economía de más de 150 países. Su producción está limitada por patógenos filamentosos (*Peronospora hyoscyami* f. sp *tabacina*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *R. solani*) y plagas (especialmente *Heliothis virescens* y *M. persicae*).

En estos cultivos, el control de muchos patógenos suele realizarse mediante la aplicación de fungicidas. El uso extensivo de fungicidas puede generar efectos perjudiciales a nivel del ecosistema, así como también puede afectar a operarios y consumidores. Es necesario entonces desarrollar nuevas metodologías de control de enfermedades que tengan menor impacto en el ecosistema y mayor eficiencia.

2. Desarrollo de las enfermedades y mecanismos de defensa de las plantas

Entre las plantas y los microorganismos patógenos han evolucionado complejas interacciones que reflejan tanto las estrategias de adquisición de nutrientes por parte de los patógenos como las estrategias de defensa por parte de la planta.

Los patógenos, una vez que lograron ingresar, pueden manipular el metabolismo del hospedante para lograr condiciones nutricionales favorables. En base a esto, se puede clasificar a los patógenos en función de las estrategias desarrolladas para usar a la planta como sustrato. Aquellos patógenos que obtienen los nutrientes de los tejidos vivos del hospedante se denominan biótrofos. Los biótrofos causan un daño relativamente menor en la pared de la célula hospedante y mantienen la viabilidad del hospedante para adquirir nutrientes. Por el contrario, los necrótrofos obtienen el alimento de células muertas o dañadas, y para ello liberan durante la infección una serie de enzimas y toxinas que degradan las paredes celulares y maceran los tejidos del hospedante. Además, existen patógenos denominados hemibiótrofos, dado que pueden comportarse como biótrofos o necrótrofos dependiendo del estadío del ciclo de vida en que se encuentren. Inicialmente, mantienen vivas a las células del hospedante, pero en determinado momento de la infección liberan compuestos que culminan con la muerte de la célula vegetal [13].

Por el otro lado, las plantas son capaces de censar la presencia de los patógenos y desencadenan respuestas de defensa complejas que con frecuencia les posibilitan recuperarse de la infección o, incluso evitarla. En un ecosistema natural, sólo una pequeña proporción de las infecciones ocasionadas por los patógenos resulta en una planta enferma.

El resultado de la interacción planta-patógeno dependerá, en parte, de las respuestas defensivas que en el hospedante se generen. Las plantas cuentan con distintos tipos de defensas: las constitutivas (preformadas) y/o las defensas inducidas por la presencia del patógeno [14, 15].

2.1 Defensas preformadas de las plantas

Las defensas preformadas pueden ser de tipo mecánicas o bioquímicas.

Dentro de las defensas preformadas mecánicas, se pueden enumerar el grosor de la epidermis, la calidad de la cutícula y la forma, tamaño y localización de los estomas.

Entre las defensas preformadas del tipo bioquímicas, se pueden encontrar tres grandes grupos de compuestos, incluyendo: péptidos y proteínas, metabolitos secundarios e inhibidores

de proteasas. En general, estos compuestos inhibidores preformados se encuentran almacenados en vacuolas u otras organelas de las capas celulares externas de la planta. Así, dependiendo de la estrategia del patógeno, éste se enfrentará a diferentes concentraciones del compuesto inhibitorio. Por ejemplo, si se trata de un necrótrofo, al destruir las células vegetales se liberarán los inhibidores con los que entrará en contacto; sin embargo, la estrategia frente a los patógenos biótrofos deberá ser diferente.

2.2 Defensas inducidas por la presencia del patógeno en las plantas

2.2.1 Inmunidad activada por PAMPs

Siendo sésiles y fotoautótrofos, las plantas necesitan desencadenar respuestas de defensa inmediatas y efectivas para evitar las constantes amenazas de diversos patógenos. Las plantas también necesitan coordinar con precisión la defensa con el crecimiento y el desarrollo para optimizar la aptitud ecológica. Por lo tanto, las plantas poseen un sistema inmune innato que requiere de la presencia de moléculas receptoras presentes en la membrana plasmática, denominadas Receptores de Reconocimiento de Patrones Moleculares (siendo su sigla en inglés PRRs) [16], cuya función es detectar la presencia de microorganismos patógenos y desencadenar cascadas de transducción de señales que culminen en respuestas defensivas por parte de la planta. Este sistema de vigilancia es capaz de reconocer estructuras específicas de los microorganismos denominadas Patrones Asociados a Microbios (MAMPs su sigla en inglés), en particular aquellas derivadas de patógenos como son los lipopolisacáridos (LPS), la flagelina y la quitina, moléculas que se clasifican como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Las plantas además pueden percibir Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) [17, 18]. La percepción de PAMPs/MAMPs por los receptores PRRs de la planta induce una reprogramación transcripcional rápida, robusta y selectiva, que es fundamental para dar inicio a la Inmunidad Desencadenada por PAMPs (PTI).

Dentro de las respuestas de defensa inducidas en la planta por la presencia del patógeno, se pueden distinguir (Figura 1B):

- Refuerzo de la pared celular (deposición de callosa)
- Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)
- Acumulación de fitoalexinas
- Acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR)

- Silenciamiento génico post-transcripcional (mecanismo de defensa antiviral)
- Inducción de cascadas de señalización mediadas por MAPK y otras

Sin embargo, un sistema inmune más específico ha evolucionado en las plantas en el cual las proteínas denominadas de Resistencia (R) reconocen proteínas efectoras del patógeno (Avr), activando así una respuesta de defensa denominada Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI).

2.2.2 Inmunidad desencadenada por efectores

La percepción de las señales extracelulares requiere de receptores PRRs en la membrana plasmática de las células, mientras que el reconocimiento de moléculas del patógeno liberadas en el espacio citoplasmático depende de proteínas receptoras producto de los genes *R,* hoy denominadas receptores NB-LRR o NLR por referencia a los dominios que la componen: dominio de unión a nucleótidos NBS (*nucleotide binding site*), dominio LRR (*leucine-rich repeat*) y un dominio N-terminal adicional que puede ser CC (*coil-coil*) o TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) [19-21].

El reconocimiento de efectores del patógeno por parte de las proteínas R implica la activación de las mismas defensas involucradas en la respuesta tipo PTI pero la respuesta difiere cuantitativa y cinéticamente [22]. La respuesta a los efectores típicamente da como resultado una respuesta hipersensible, mientras que los PAMPs o DAMPs normalmente no causan la muerte celular. Sin embargo, esto no es una regla general porque algunos PAMP podrían inducir una respuesta hipersensible [23, 24], mientras que algunos genes de resistencia proporcionan protección sin desencadenar una respuesta hipersensible [25].

En general, una respuesta tipo PTI contribuye a la resistencia basal de la planta a diversos microorganismos adaptados y no adaptados, mientras que ETI juega un papel central en la defensa contra patógenos adaptados al hospedante. Además, una infección primaria localizada puede inducir el desarrollo de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), que se manifiesta como una resistencia mejorada en los tejidos distales [26].

Uno de los modelos actuales más aceptados para representar los procesos vinculados a inmunidad que ocurren durante la interacción planta-patógeno es el propuesto por Jones y Dangl, (2006) denominado "*zig-zag*" el cual tiene en cuenta la co-evolución de los patosistemas (Figura 1A)[22].

2.2.3 Resistencia Sistémica Adquirida

Por lo expuesto anteriormente, sabemos que una respuesta defensiva rápida y localizada por parte de la planta resulta en la generación de un ambiente desfavorable para el crecimiento y la reproducción del patógeno. Sin embargo, posteriormente, se inicia una respuesta sistémica de más larga duración que alerta a otras zonas de la planta de posibles ataques subsiguientes del mismo u otro patógeno [27]. Durante esta respuesta, se inician mecanismos de defensa en partes de la planta distales al lugar de infección, con el objetivo de proteger los tejidos no dañados contra la invasión subsiguiente del patógeno [28]. La resistencia sistémica adquirida requiere de la acumulación endógena de ácido salicílico (SA), dando como resultado una reprogramación transcripcional de una batería de genes que codifican proteínas PR [29, 30]. El SA producido en el tejido infectado se desplaza de célula a célula a través de los plasmodesmos y a través del floema hacia el resto de la planta como metil-SA (MeSA) [31]. Una vez dentro de la célula, éste favorece la supervivencia celular y la expresión de los genes relacionados con la inmunidad sistémica [32].

En la página siguiente:

Figura 1. Principios de la inmunidad en plantas. A) Modelo del *zig-zag*, representativo de la amplitud de defensa en respuesta a elicitores por varias estrategias de infección. P/MAMP: patrones moleculares asociados a patógenos/microorganismos; Avr-R: interaccion del efector (gen de avirulencia o avr) y el gen de resistencia (gen R); HR: respuesta hipersensible; PTI: inmunidad desencadenada por PAMPs; ETS: susceptibilidad desencadenada por efectores; ETI: inmunidad desencadenada por efectores. **B)** Activacion de defensas tempranas PTI y ETI. Reconocimiento de la infección bacteriana mediada por la detección de P/MAMPS por parte de receptores de reconocimientos de patrones moleculares (PRR) y detección de efectores bacterianos en el citoplasma de las células vegetales por las proteínas de resistencia (R). Estos reconocimientos dan como resultado la activación rápida de un número de respuestas en las plantas, tales como: alteraciones en el flujo ionico en la memabrana plastídica, aumento de las concentraciones locales de calcio libre en el citoplasma, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la superficie celular, inducción de la cascada de señalización de MAP quinasas y quinasas dependientes de calcio (CDPK) en el citoplasma, fosforilacion de proteínas (P), inducción de la expresión de genes que codifican reguladores y proteínas de señalización, y deposición de calosa para fortalecer la pared celular. En conjunto, estas respuestas por parte de la planta crean un entorno local para desfavorecer el crecimiento y multiplicación del patógeno. Adaptado de Buchanan, 2015.

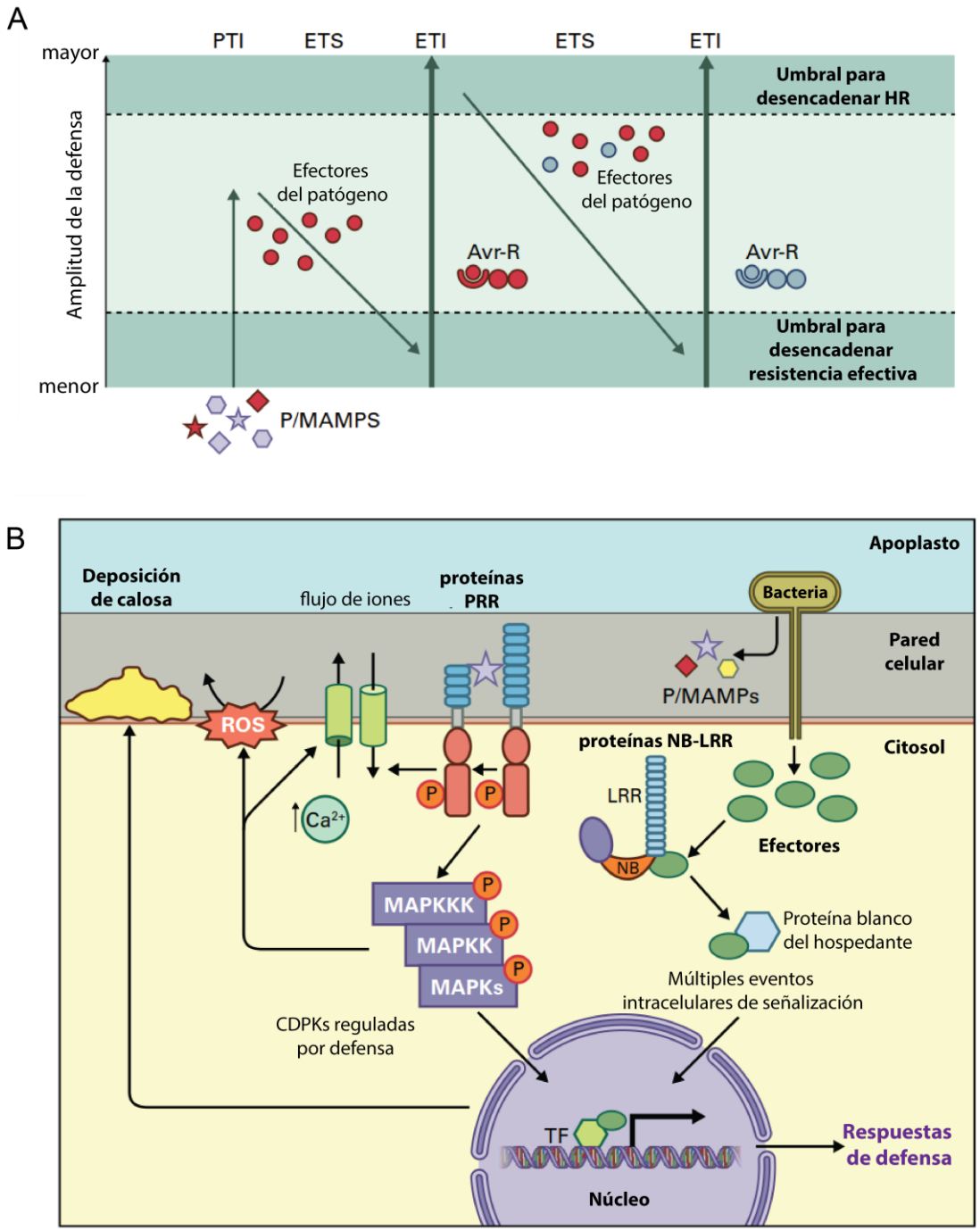

Figura 1. Principios de la inmunidad en plantas. Ver página anterior

3. Obtención de resistencia a patógenos mediante mejoramiento

La ingeniería genética y la transformación vegetal se han convertido en herramientas claves para el desarrollo de nuevas variedades con resistencia a patógenos. Estas metodologías han permitido introducir en las plantas diversos genes, individuales o combinados, superando así el

problema asociado al ligamiento genético y a la barrera interespecífica [33]. Las estrategias para obtener resistencia a patógenos fúngicos y bacterianos pueden agruparse en distintas categorías:

- La expresión de uno o varios productos que son directamente tóxicos para el patógeno, causándoles la muerte o reduciendo su crecimiento. En esta categoría se incluyen las proteínas PR, tales como enzimas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas), proteínas antifúngicas (tipo osmotinas y taumatinas), péptidos antimicrobianos (tioninas, defensinas, lectinas), proteínas inactivadoras del ribosoma (RIP) y fitoalexinas. La combinación de varias de estas proteínas en el mismo evento (apilamiento) ha resultado en mejores niveles de protección, debido a un efecto sinérgico de las mismas [33-35].

- La expresión de productos génicos que destruyen o neutralizan componentes del arsenal del patógeno, tales como la poligalacturonasa, el ácido oxálico y las lipasas.

- La expresión de productos génicos que pueden aumentar las defensas estructurales de la planta, elevando los niveles de peroxidasa y lignina, por ejemplo.

- La expresión de productos génicos que activan o modulan las vías de defensa de la planta, entre ellos algunos elicitores específicos, y enzimas que aumentan los niveles de peróxido de hidrógeno, ácido salicílico y etileno.

- La expresión de genes de resistencia *R* involucrados en la interacción con los factores de avirulencia (Avr) y en la inducción de la respuesta hipersensible (HR).

En muchas de estas estrategias se ha visto que es necesario alcanzar altos niveles de expresión de las proteínas en las plantas transgénicas para lograr fenotipos resistentes. La transformación nuclear difícilmente permite conseguir estos altos niveles de expresión, ya que por lo general los mismos oscilan entre 0,1% a 0,001 % del total de las proteínas solubles. Sin embargo, esta limitación podría sortearse utilizando la metodología de transformación de organelas (cloroplastos).

4. Transformación del genoma de cloroplastos por biobalística

Los plástidos varían en tamaño, forma, contenido y función, y poseen una gran capacidad de diferenciación, desdiferenciación y rediferenciación [36]. En consecuencia, a partir de la transformación de un tipo de plástido se puede conseguir la expresión del gen foráneo en distintos tejidos de la planta (hoja, tubérculo, fruto).

La biobalística es la técnica más utilizada para la trasformación del genoma plástidico (plastoma). Esta técnica consiste en acelerar, utilizando un cañón de bombardeo y mediante la inyección de helio a alta presión, micropartículas de oro (o alternativamente tungsteno) recubiertas con el ADN plasmídico apropiado, que impactarán en las células de la hoja (Figura 2A). Una vez que el vector logra ingresar al cloroplasto, ocurre la integración de la construcción genética de interés por recombinación homóloga entre el plastoma y las secuencias flanqueantes que se encuentran a ambos lados de los transgenes del vector. Uno de estos transgenes corresponde al agente selector, el cual es importante para seleccionar aquellas pocas copias del genoma de cloroplasto que resultan transformadas. El tipo celular que alcancen las partículas dependerá del tipo de partícula y su tamaño, así como de los parámetros utilizados para el disparo (Figura 2B).

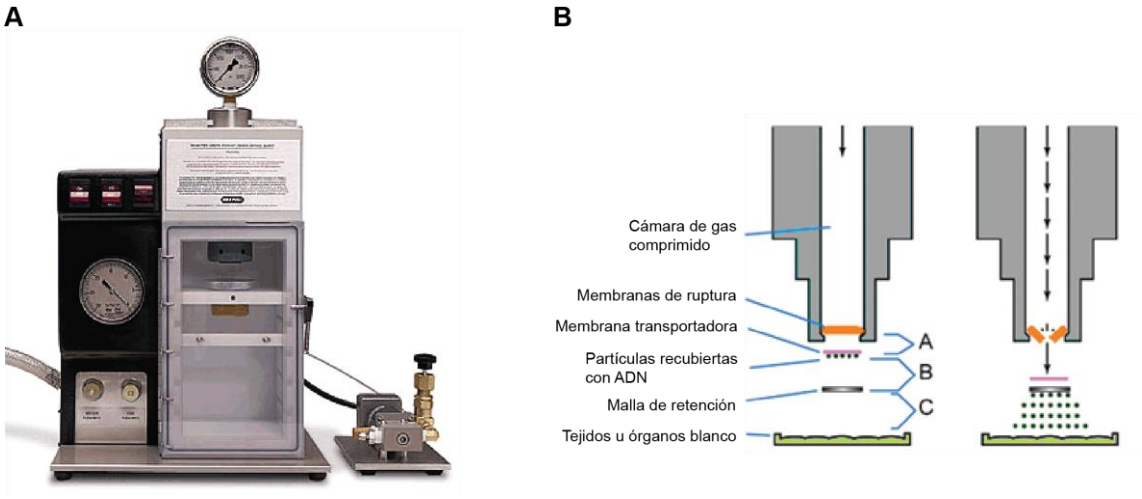

Figura 2. **Transformación del genoma plastídico mediante biobalística**. **A)** se observa el dispositivo empleado en biobalística PDS-1000/He (BioRad). **B)** Se esquematiza el cañón génico empleado en biobalística. A una presión determinada la membrana de ruptura se rompe y permite la aceleración de la membrana transportadora con las micropartículas recubiertas con el ADN. La membrana es retenida por una malla que permite el paso de las partículas para que están impacten en el tejido a transformar. La presión y las distancias A, B y C pueden ser variadas en función del tejido a transformar.

En nuestro laboratorio, la transformación de plástidos se llevó a cabo por primera vez en la especie vegetal *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana*. El genoma plastídico de esta especie de tabaco está compuesto de una única molécula circular de ADN doble cadena relativamente pequeño (155 kb) que codifica 112 genes [37], y está presente en hasta 10,000 copias por célula fotosintética [38]. Estos 112 genes se pueden ordenar en dos grandes grupos según su función: genes involucrados en la fotosíntesis y genes involucrados en los procesos de replicación, transcripción y traducción. Sin embargo, la mayoría de las proteínas presentes

dentro del cloroplasto son codificadas a nivel del genoma nuclear [39]. A diferencia de lo que ocurre en la organización del genoma nuclear donde cada gen se transcribe independientemente de los otros, en el genoma de los plástidos muchos genes se encuentran asociados en operones y se transcriben conjuntamente.

En el genoma plastídico de la mayoría de las plantas estudiadas, se pueden reconocer cuatro regiones: una región mayor que contiene genes en simple copia (LSC), una región menor que contiene genes en simple copia (SSC), y dos copias de regiones invertidas que separan las regiones de simple copia (IRA e IRB respectivamente). La distribución de las regiones, el orden de los genes y sus secuencias están altamente conservados entre las distintas especies vegetales. A modo de ejemplo se esquematiza en la figura 3 el genoma plastídico de tres solanáceas: tabaco, papa y tomate [36, 37].

Existen varios motivos por los que *N. tabacum* es ampliamente utilizada como planta modelo para la trasformación plastídica. Esta especie vegetal posee un ciclo de vida relativamente corto (3-4 meses), y una rápida velocidad de regeneración de brotes a partir de explantos de hojas (2-3 semanas). El vector desarrollado en nuestro laboratorio permite la integración del gen de interés en la región intergénica ubicada entre los genes plastídicos *16S* y *trnI*, ambos pertenecientes al operón *rrn* [38-42]. Este vector permite altos niveles de expresión de los transgenes.

En 1990 Daniell y col., y Svab y col., mostraron por primera vez la posibilidad de introducir genes en el genoma de cloroplastos de tabaco [43, 44]. A partir de entonces, se han expresado con éxito en plástidos numerosas proteínas con diferentes objetivos. Los niveles de expresión obtenidos varían dentro de un rango muy amplio, siendo los valores máximos reportados del 45% para la proteína Cry2Aa2 [45], del 51% para la proteína de fusión derivada del virus de aftosa P1-GUS [41] y superiores al 70% para una proteína lítica viral [46]. Para la mayoría de las proteínas expresadas, los valores obtenidos superan ampliamente a los alcanzados mediante la transformación nuclear. La transformación nuclear difícilmente permite conseguir estos altos niveles de expresión, ya que por lo general los mismos oscilan entre 0,1% a 0,001 % del total de las proteínas solubles. Entre los factores más importantes de los cuales depende el nivel de expresión de un determinado transgén se encuentran la fuerza del promotor que dirige su transcripción, y la estabilidad tanto del ARNm como de la proteína resultante. Sin embargo, por ser el proceso de integración al genoma nuclear un proceso esencialmente aleatorio, también influye sobre el nivel de transcripción el entorno génico que rodea al sitio de inserción. Los esfuerzos dirigidos a incrementar el número de copias, y con ello el nivel de expresión, han sido dificultados por la acción de los mecanismos de silenciamiento génico [47].

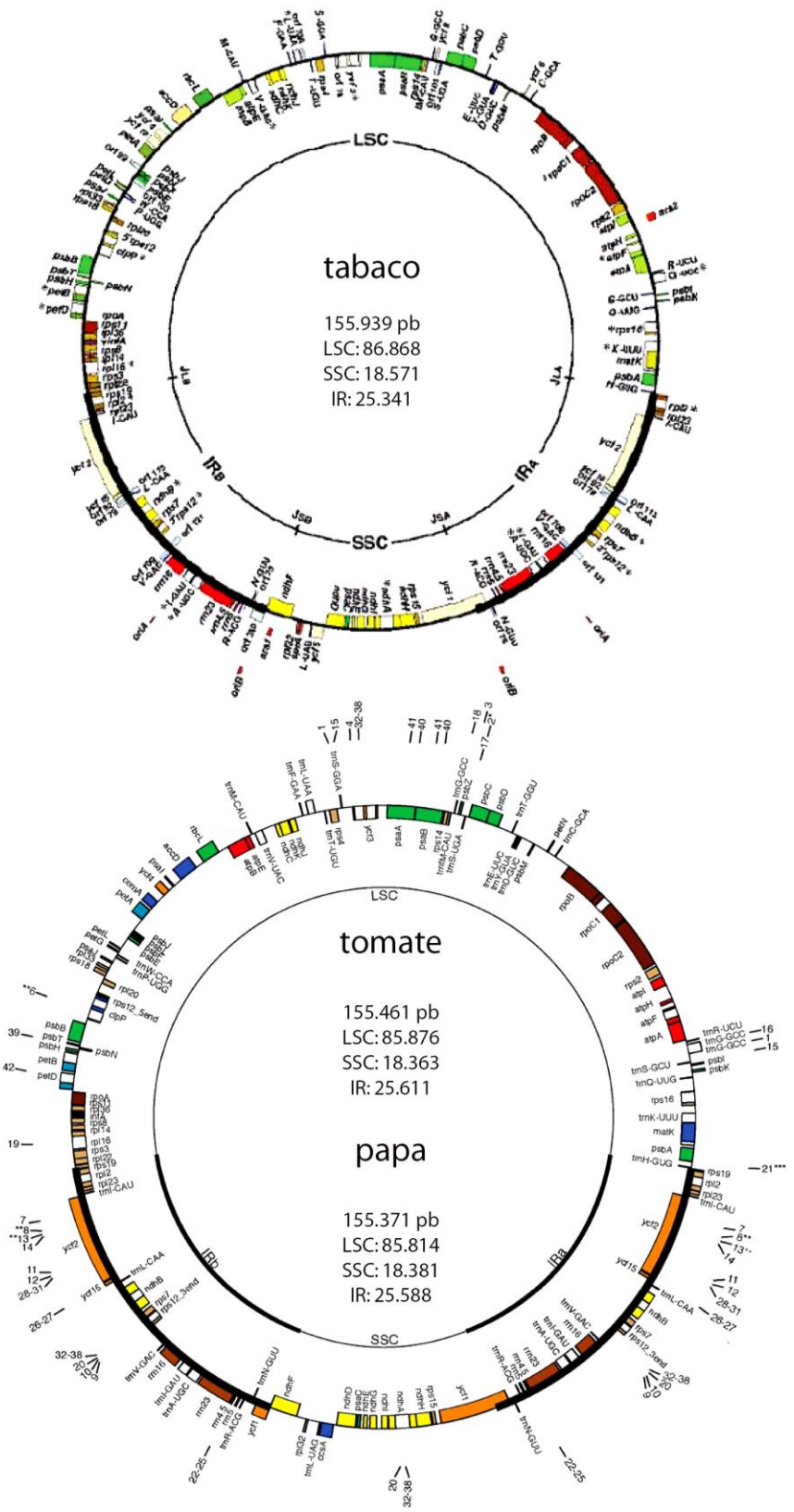

Figura 3. Estructura del genoma plastídico en tres especies de solanáceas: *N. tabacum, S. tuberosum* y *Solanum lycopersicum*. LSC: región de simple copia larga, SSC: región de simple copia corta, IR: regiones invertidas repetidas. Adaptado de Daniell y col, 2006; Buchanan y col., 2000.

En numerosos casos, se ha comprobado que la sobreexpresión de un determinado transgén puede provocar la supresión de su propia expresión y/o la de genes endógenos homólogos [48]. Debido a la presencia de los efectos de entorno genómico y a la acción de los mecanismos de silenciamiento, en la práctica es necesario analizar un número considerable de plantas transgénicas nucleares para seleccionar aquellas que posean los mejores niveles de expresión. Algunas de las limitaciones que se presentan en las plantas transgénicas nucleares (bajos niveles de expresión) podrían sortearse utilizando la metodología de transformación de organelas (cloroplastos).

Los altos niveles de expresión que permite alcanzar la transformación plastídica constituyen una de las principales ventajas de la técnica en comparación con la trasformación nuclear. Además, el hecho de que muchos genes plastídicos se encuentran agrupados en operones permite la construcción de policistrones para ser expresados en plantas. Esto es una gran ventaja cuando se intenta expresar más de un gen, ya que la construcción es sencilla de realizar y se evita la duplicación de promotores (que en el caso de transformaciones nucleares favorece los mecanismos de silenciamiento). Otra característica interesante de la metodología, desde el punto de vista de la bioseguridad, es que, al ser los genes plastídicos de herencia materna en gran parte de las especies de interés agronómico, se dificulta la transferencia horizontal de transgenes [49]. Una limitación se presenta en el caso de proteínas que requieran glicosilación, ya que esta modificación postraduccional no ocurre en dichas organelas.

En cuanto al desarrollo de plantas transplastómicas resistentes a estrés biótico, se obtuvieron resultados alentadores ya que la acción de muchos péptidos antimicrobianos es dependiente de la concentración. La expresión del péptido antimicrobiano MSI-99 (análogo de la magainina-2, secretada por la piel de *Xenopus laevis*) protegió a las plantas de tabaco de patógenos fúngicos y bacterianos, en ensayos *in vitro* y en hojas aisladas [50].

Sin embargo, el desarrollo de plantas transgénicas para obtener resistencia a patógenos se ve limitado dado que la expresión constitutiva de numerosas proteínas de defensa puede tener en la planta efectos deletéreos, incluyendo la obtención de fenotipos conocidos como *lesion-mimic* [51]. Este hecho nos plantea la necesidad de desarrollar sistemas de expresión inducibles que permitan generar altos niveles de expresión del transgén en respuesta a la interacción con determinados microorganismos, disminuyendo así los posibles costos metabólicos relacionados a la expresión constitutiva de altos niveles de proteínas heterólogas.

Parte A

Desarrollo de un sistema de expresión inducible basado en el mecanismo de *quorum sensing*

Introducción

1. Sistemas de *Quorum sensing*

El sistema de *quorum sensing* (QS) fue descubierto y descrito, por primera vez, hace más de 50 años. Dos publicaciones llegaron a la misma conclusión: las bacterias son capaces de producir señales químicas para comunicarse y coordinar actividades grupales. Una indicaba que la bacteria gram positiva *Streptococcus pneumoniae* en alta densidad poblacional produce una sustancia química llamada factor de competencia [52]. La otra publicación describía el control de luminiscencia en la bacteria gram negativa *Vibrio fischeri* [53].

Tanto las bacterias Gram+ como las Gram- utilizan este mecanismo de comunicación para regular distintos procesos. Independientemente de la naturaleza química de la señal, la comunicación mediante *quorum sensing* permite a las bacterias coordinar procesos importantes y diversos incluyendo bioluminiscencia, simbiosis, virulencia, conjugación, producción de antibióticos, movilidad, esporulación, formación de biofilms y la colonización de un hospedante [54]. En general, las bacterias Gram- producen *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) como molécula señal de *quorum sensing*, mientras que las Gram+ liberan y responden a oligo-péptidos [54, 55]. Si bien este fenómeno se ha descrito principalmente en bacterias, comienzan a aparecer en la bibliografía ejemplos de mecanismos relacionados en hongos y oomicetes [56, 57].

En bacterias gram negativas, el modelo básico, para la regulación de genes mediada por AHL implica la existencia de un regulador transcripcional (proteína R) y una AHL sintasa (proteína I). La proteína R puede reconocer un promotor específico y promueve la expresión génica sólo cuando se forma el complejo con la molécula señal (AHL). Típicamente, la proteína I se expresa en niveles bajos cuando hay baja densidad celular, entonces hay baja concentración de AHL intracelular, insuficiente para activar a la proteína R. A medida que aumenta la población bacteriana, las AHL se acumulan hasta que hay una concentración suficiente de AHL intracelular para ser reconocida por la proteína R; este complejo proteína R-AHL es capaz de unirse a las secuencias promotoras dianas (Figura 4).

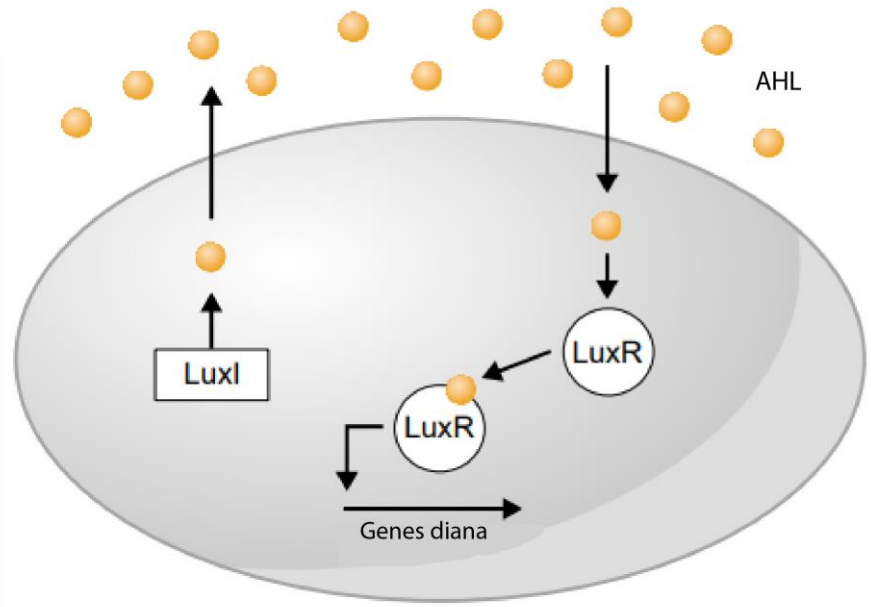

Figura 4. Circuito de *quorum sensing* mediado por AHLs. En la mayoría de las bacterias Gram-, enzimas del tipo LuxI catalizan la formación de AHLs especie-específicas, que son detectadas por reguladores transcripcionales del tipo LuxR. Tomado de Xavier y Bassler, 2003.[58]

1.1 Proteínas R

Existen dos clases de reguladores transcripcionales conocidos como proteínas R. Una de ellas requiere formar un complejo con la AHL correspondiente para unirse al ADN, mientras que la otra sólo se une al ADN en ausencia de la señal AHL. El único ejemplo conocido de esta última clase es EsaR de *Erwinia stewartii* [59].

La región carboxi-terminal de todas las proteínas R conocidas contienen un motivo conservado hélice-bucle-hélice que se requiere para la unión a una secuencia de ADN palindrómica de 20 pares de bases tipo caja lux (“lux”), que se encuentra aproximadamente 40 bases rio arriba del sitio de inicio de la transcripción. El extremo carboxi-terminal contiene también un segundo dominio que está involucrado en la multimerización de la proteína R, proceso necesario para la unión del complejo al ADN. La mayoría de las proteínas R se unen al ADN como dímeros. Sin embargo, CarR de *Erwinia carotovora* forma multímeros de orden superior cuando se une a la molécula señal [60]. Actualmente se cree que, una vez unidas a la caja tipo Lux, las proteínas R estimulan la transcripción mediante la interacción con el extremo carboxilo de la subunidad α de la ARN polimerasa[61]. La región amino-terminal de la proteína R está involucrada en dos aspectos que son críticos para la función de las mismas. En primer lugar, en ausencia de AHL, inhibe la unión al “lux" En segundo lugar, contiene al sitio de unión

a AHL que se ha demostrado que se requiere para el plegado adecuado de TraR en *Agrobacterium tumefaciens* y su resistencia a la degradación proteolítica [60].

1.2 Proteínas I

La proteína I es responsable de la síntesis de AHL. Se han identificado múltiples clases de AHL-sintasas. La clase que contiene proteínas I del tipo LuxI, utiliza los metabolitos celulares S-adenosil-metionina (SAM) y proteína transportadora de acilos (ACPs) para sintetizar las homoserina lactonas. La segunda clase de enzimas que sintetizan AHL, e incluye a las sintasas AinS y LuxLM en la bacteria *Vibrio harveyi*, utiliza SAM más ACPs acilados o Acil-CoAs como sustratos. También se ha descripto un sistema presente en *P. fluorescens* F113, que utiliza una enzima acil-transferasa HdtS para sintetizar AHL [62]. Las estructuras de las AHLs están altamente conservadas, poseen un grupo acilo de 4 a 14 átomos de carbono unido por un enlace amida a un anillo de homoserina lactona. En el tercer carbono del grupo acilo puede haber un grupo cetona o un grupo hidroxilo. Se cree que la mayoría de las AHL difunden a través de la pared celular, con la excepción de las AHL de cadena larga (como C12-AHL producidas por *P. aeruginosa*) que utilizan un bomba de flujo para la translocación a través de la pared celular [63].

2. Sistema de *Quorum sensing* en *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que posee dos sistemas del tipo LuxI/LuxR: LasI/LasR [64] y RhlI/RhlR [65] que regulan la detección del *quórum*. Tanto LasI como RhlI son las AHL sintasas que catalizan la formación de los autoinductores *N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserín lactona (3O-C12-HSL) y *N*-(butiril)-L-homoserín lactona (C4-HSL) [66, 67], respectivamente. Los dos circuitos reguladores actúan en tándem para controlar la expresión de una serie de factores de virulencia.

En alta densidad celular, LasR se une a su correspondiente autoinductor, y juntos se unen al promotor que precede inmediatamente a los genes que codifican una serie de factores de virulencia secretados, los cuales son responsables del inicio del proceso de infección. Estos determinantes de la patogenicidad incluyen la elastasa, codificada por el gen *lasB*; una proteasa codificada por el gen *lasA*; una exotoxina A, codificada por el gen *toxA*; y una fosfatasa alcalina, que está codificada por el gen *aprA* [64, 68-70]. Análogamente al circuito de LuxI/LuxR de *V. fischeri*, LasR unido al autoinductor activa la expresión de lasI, que establece una retroalimentación positiva [71]. El complejo LasR-autoinductor también activa la expresión

del segundo sistema de detección RhlI/RhlR de *quórum* de *P. aeruginosa* [72]. RhlR se une al autoinductor producido por RhlI; el complejo así formado induce la expresión de dos genes que también están bajo el control del sistema LasI/LasR: *LasB* y *aprA*. Además, el complejo RhlR-autoindutor activa una segunda clase de genes diana específicos. Estos genes incluyen *rpoS*, que codifica el factor sigma σs de fase estacionaria; *RhlAB*, que codifica una ramnosil transferasa implicada en la síntesis del biosurfactante hemolisina y ramnolípidos, genes implicados en la síntesis del antibiótico piocianina, el gen *lecA*, que codifica una lectina citotóxica; y el gen *RhlI* [70, 72-76]. De forma similar a LasI/LasR y LuxI/LuxR, la activación de RhlI establece un bucle de autorregulación.

3. Sistemas de expresión inducible en plantas

3.1 Expresión inducible de transgenes integrados en el genoma nuclear

Se han descrito varios sistemas inducibles para la expresión de transgenes en plantas, principalmente en tabaco, arroz, Arabidopsis, tomate y maíz. Este tipo de sistemas tienen la posibilidad de regular los niveles de expresión génica en etapas particulares del desarrollo de la planta y en tejidos de interés. Se encuentran reportados una gran cantidad de sistemas inducibles en plantas transformadas a nivel del genoma nuclear. [77].

Dentro de promotores inducibles en respuesta a patógenos, se destacan WGA/PGA y. VP16:TraR. Ming y col. generaron promotores quimera utilizando los promotores correspondientes a los genes *wheat GstA1* y *potato Gst1,* inducibles por algunos patógenos, fusionados a la secuencia promotora mínima del gen de actina de arroz (*Act1*), para dirigir la expresión del gen reportero *uidA.* Las plantas de arroz transgénicas transformadas con ambos promotores quiméricos (WGA y PGA) mostraron que ambos son inducibles por elicitores de *Pyricularia oryzae* [78].

Por su parte, You y col., 2006 describieron un sistema inducible basado en componentes del mecanismo de sensado de densidad poblacional *quórum sensing* de *Agrobacterium tumefaciens,* capaz de regular la expresión génica en plantas. Para desarrollar el sistema, generaron una proteína de fusión que contenía el dominio de activación VP16 y la secuencia correspondiente a la proteína TraR de *A. tumefaciens*. En presencia de 3-oxooctanil-l-homoserin lactona (OOHL), el regulador transcripcional quimérico VP16:TraR induce la expresión del gen reportero en células de musgo (*Physcomitrella patens*), cebada (*Hordeum vulgare*) y zanahoria (*Daucus carota*), así como en plántulas transgénicas de Arabidopsis [79].

3.2 Expresión inducible de transgenes integrados en el genoma plastídico

La expresión constitutiva de transgenes insertados en el genoma plastídico ocasionalmente puede generar fenotipos aberrantes. Los sistemas de expresión inducibles pueden usarse como una herramienta para controlar la expresión del transgén y permitir la producción de altos niveles de proteínas heterólogas en cualquier etapa de desarrollo. Se han descrito diferentes sistemas inducibles en cloroplastos, que se resumen a continuación.

Por primera vez, en 2005 el grupo de Lössl y col. demostró la expresión exitosa de un sistema inducible en plástidos [80]. En un intento de expresar el operón *phb* constitutivamente en plástidos de tabaco, observaron una reducción del crecimiento de las plantas y gametos masculinos estériles [81]. Para evitar este problema, desarrollaron un sistema de trans-activación en el que la expresión del operón *phb* es regulada por una T7RNA polimerasa (T7RNAP) dirigida a plástidos y controlada por un promotor inducible. El mecanismo de control génico se basó en el promotor *alcA* y en el factor de transcripción ALCR inducible por etanol [82]. La pulverización de etanol en plantas transformadas indujo la expresión de T7RNAP en el núcleo, que al llegar a los plástidos, fue capaz de activar la transcripción del operón *phb* generando ácido polihidroxibutírico en las plantas transplastómicas. Sin la inducción del etanol, las plantas transformadas crecieron normalmente y pudieron producir flores fértiles. Sin embargo, este sistema, así como otros sistemas inducibles, requieren de la expresión de un transgén desde el núcleo para desencadenar la expresión en plástidos [83].

Actualmente, existen sistemas inducibles cuyos componentes se encuentran en su totalidad en los plástidos. El primero fue reportado por Mühlbauer y Koop, este sistema se basó en la represión constitutiva del transgén de interés por la proteína represora lac (regulador del operón lactosa en bacterias), y la expresión fue inducida por el isopropil-β-d-galactopiranosido (IPTG) [84]. Este sistema es atractivo ya que permite la inducción post-cosecha del transgén. Sin embargo, se observó una expresión basal no deseada en el estado no inducido.

Buhot y col. crearon un sistema híbrido de transcripción en el que el transgén se colocó bajo el control transcripcional de un promotor eubacteriano que no existe en el genoma plastídico y por lo tanto no se reconoce por la maquinaria de transcripción endógena de los plástidos. La activación del sistema se logra mediante el suministro de un factor de transcripción quimérico que interacciona con la ARN polimerasa plastídica (PEP) y la dirige específicamente al promotor inducible eubacteriano [85].

Otro sistema propuesto, se basó en un *riboswitch* sintético que funciona como un regulador traduccional eficiente para la expresión génica en plástidos, en respuesta al ligando teofilina

aplicado exógenamente. Sin embargo, luego de la inducción por teofilina, la expresión de GFP en plástidos de tabaco fue muy baja (0,01-0,02% de proteína total soluble) [86].

Si bien existen sistemas de transformación de cloroplastos que han sido desarrollados para lograr la expresión inducible de transgenes, todavía hay ciertas limitaciones. En primer lugar, algunos métodos inducibles necesitan la transformación de dos genomas, el nuclear y el plastídico, eliminando la bioseguridad de la transferencia horizontal de transgenes, propia de la herencia materna plastídica. En segundo lugar, todos los estudios reportados que se han basado en transformación únicamente del genoma plastídico no permitieron alcanzar, luego de la inducción, los altos niveles de expresión asociados a la transformación de cloroplastos. En tercer lugar, no se han reportado hasta la fecha sistemas inducibles por patógenos mediante transformación del genoma plastídico.

3.3 *Quorum sensing* y biotecnología en plantas

Las características de este mecanismo de comunicación celular, permitió utilizar los complejos de *quorum sensing* para el desarrollo de un bioensayo de detección de AHLs bacterianas [87]. El mismo se basó en la generación de un plásmido conteniendo al gen reportero LacZ río abajo del promotor del gen *lasB*, cuya transcripción es activada tras la unión al promotor de los complejos AHL-proteína activadora, descriptos previamente. Más aún, se demostró que este sistema de expresión inducible para la detección de AHLs es funcional en *E. coli*, aun cuando los elementos de *quorum sensing* utilizados son propios de *P. aeruginosa*, y que permite la detección de un amplio rango de AHLs.

Una estrategia desarrollada por You y col. (mencionada anteriormente) se basó en la a expresión inducible por AHLs de proteínas heterólogas en plantas transformadas a nivel del genoma nuclear. Estos autores utilizaron los componentes de sistema de *quorum sensing* TraR/3-oxooctanil-L-homoserin lactona de *Agrobacterium tumefaciens* para regular la expresión de un gen reportero [79].

Por otro lado, se han reportado plantas transgénicas nucleares que expresan genes para la síntesis de homoserin lactonas sintasas a las que se incluyó un péptido de tránsito para direccionamiento al plástido, y que en consecuencia sintetizan AHLs. Además, los autores observaron que estas moléculas sintetizadas en el cloroplasto difunden libremente a través de las membranas de la organela y la célula para pasar a ser parte de la rizosfera [88-90].

Estos antecedentes nos inspiraron para plantear el desarrollo de un sistema de expresión génica en plástidos, inducible por la presencia de AHLs, que permita obtener altos niveles de

acumulación de proteínas de defensa (u otras proteínas heterólogas de interés), en respuesta a determinadas AHLs y/o ante la presencia de determinados microorganismos patógenos. Muchas bacterias fitopatógenas pertenecen al grupo de las Gram-, como por ejemplo *Xanthomonas spp., patovares de Pseudomonas syringae, Erwinia spp., Ralstonia spp*., y *Agrobacterium spp*. En varios de estos géneros los mecanismos de *quorum sensing* mediados por AHLs han sido bien estudiados [91].

Objetivo general

El Objetivo General de esta primera parte del trabajo de Tesis fue desarrollar un sistema de expresión de proteínas heterólogas, inducible por acil homoserin lactonas (AHLs), mediante la transformación del genoma plastídico.

Para lograrlo nos hemos planteado los siguientes **objetivos específicos:**

a) Desarrollar los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR.

b) Transformar el genoma de cloroplastos de *N. tabacum* con los vectores mencionados.

c) Caracterizar molecularmente las plantas transplastómicas.

d) Analizar la funcionalidad del sistema inducible planteado en un sistema procariota y en las plantas transplastómicas.

Parte A

Desarrollo de un sistema de expresión inducible basado en el mecanismo de *quorum sensing*

Resultados

1. Desarrollo de los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR para la transformación plastídica de tabaco

Con el objetivo de generar plantas transplastómicas capaces de censar moléculas señales del tipo homoserin lactonas, primero se desarrollaron los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR. Para llevarlo a cabo, utilizamos como vector de partida el pBSW-utrGus previamente desarrollado en el grupo. El mismo permite la integración del gen de interés en la región intergénica ubicada entre los genes plastídicos *16S* y *trnI*, ambos pertenecientes al operón *rrn* [39].

El vector pBSW-utrGus posee los siguientes elementos genéticos (Figura 5):

- El promotor del operón de genes para ARNs ribosomales plastídicos Prrn. Este es un promotor de expresión constitutivo y fuerte; es reconocido por las dos ARN polimerasas presentes en el plástido, una de origen plastídico y la otra nuclear, PEP y NEP respectivamente.
- Terminador del gen *rps16* (Trps16) cuyo producto es la proteína ribosomal rps16.
- Gen selector *aadA*, (aminoglicosido-3-adenililtransferasa) que otorga resistencia al antibiótico espectinomicina.
- Sitio de clonado para el gen de interés entre dos sitios de restricción (NdeI y XbaI). Entre estos sitios contiene las secuencias del gen indicador *uidA* que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS).
- Río arriba del sitio de clonado, contiene el promotor y la secuencia 5' no traducible (utr) del gen plastídico *psbA*, que codifica para la proteína D1 del fotosistema II. Este elemento permite alcanzar altos niveles de expresión del transgén [92-94].

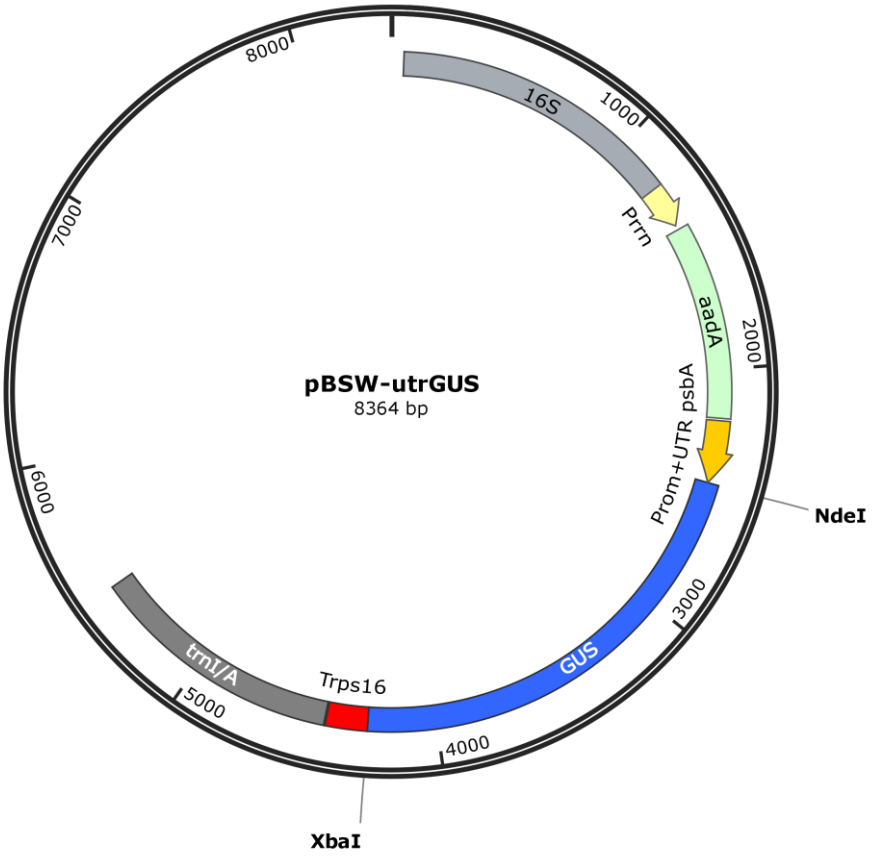

Figura 5. Esqueleto del vector pBSW-utrGUS

Los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR fueron diseñados en base al plásmido capaz detectar N-acil homoserina lactonas desarrollado por Ling y Pesci 2009 inspirado en el sistema de *Quorum sensing* de *Pseudomonas aeroginosa* [87].

Nuestros vectores incluyen los siguientes elementos (Figura 6):

- Promotor del gen *lasB* (*P. aeruginosa*) dirigiendo la expresión del gen reportero *uidA*. Este promotor posee las secuencias operadoras para la unión de los complejos LasR:AHL y RhlR:AHL. Además, posee las secuencias características para el reconocimiento por la ARN polimerasa plastídica (PEP), según predicciones bioinformáticas. La elección del promotor del gen *lasB* se basó en la funcionalidad del promotor en bacterias [87], la presencia de las secuencias características para el reconocimiento por la polimerasa PEP, y la utilización previa de promotores bacterianos para la expresión de proteínas en el genoma de cloroplastos [95].

- Gen reportero *uidA*: a fin de evaluar la funcionalidad de la construcción.

- Terminador de la transcripción del gen *psbA* (TpsbA).
- Genes correspondientes a las proteínas activadoras de la transcripción LasR y RhlR de *P. aeruginosa*, subclonados solos o combinados río abajo del promotor y secuencia 5´UTR del gen *psbA* para permitir su expresión. En el caso del vector utrQS-LasR+RhlR para poder expresar ambos genes combinados, se clonaron de forma tal de generar un policistrón. Con el objetivo de facilitar la expresión de ARNs monocistrónicos estables y traducibles a partir del mensajero policistrónico, se incluyeron entre las secuencias correspondientes a LasR y RhlR un nuevo terminador (*TrbcL*, terminador transcripcional del gen correspondiente a la subunidad grande de RuBisCO), un elemento de expresión intercistrónico (IEE), y una región Shine-Dalgarno (SD) [96].

2. Clonado de los distintos elementos para la construcción de los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR

a) RhlR y LasR

Mediante la técnica de PCR se amplificaron las secuencias correspondientes a las proteínas RhlR y LasR utilizando los oligonucleótidos iniciadores RhlR-Fw y RhlR-Rv y LasR-Fw y LasR-Rv, respectivamente. En este caso, los iniciadores utilizados incorporan los sitios NdeI y XbaI. Para la amplificación se utilizó ADN genómico purificado de *P. aeruginosa.* Los productos de amplificación se subclonaron en el vector pZErO-2 previamente digerido con EcoRV, generando los plásmidos pZErO-RhlR y pZErO-LasR. El vector pZErO-RhlR se cortó con las enzimas NdeI y XbaI, para obtener un fragmento conteniendo la secuencia RhlR, que fue ligado al vector pBSW-utrGUS tratado previamente con las mismas enzimas, obteniéndose así el vector utr-RhlR. Para generar el vector utr-LasR, como la secuencia nucleotídica correspondiente a LasR posee un sitio de restricción NdeI interno, se llevó a cabo otra estrategia de clonado. El vector pZEro-LasR se procesó con las enzimas NdeI, EcoRV y XbaI, generándose dos fragmentos (NdeI-EcoRV y EcoRV-XbaI) que se ligaron al vector pBSW-utrGus, previamente cortado con las enzimas NdeI y XbaI.

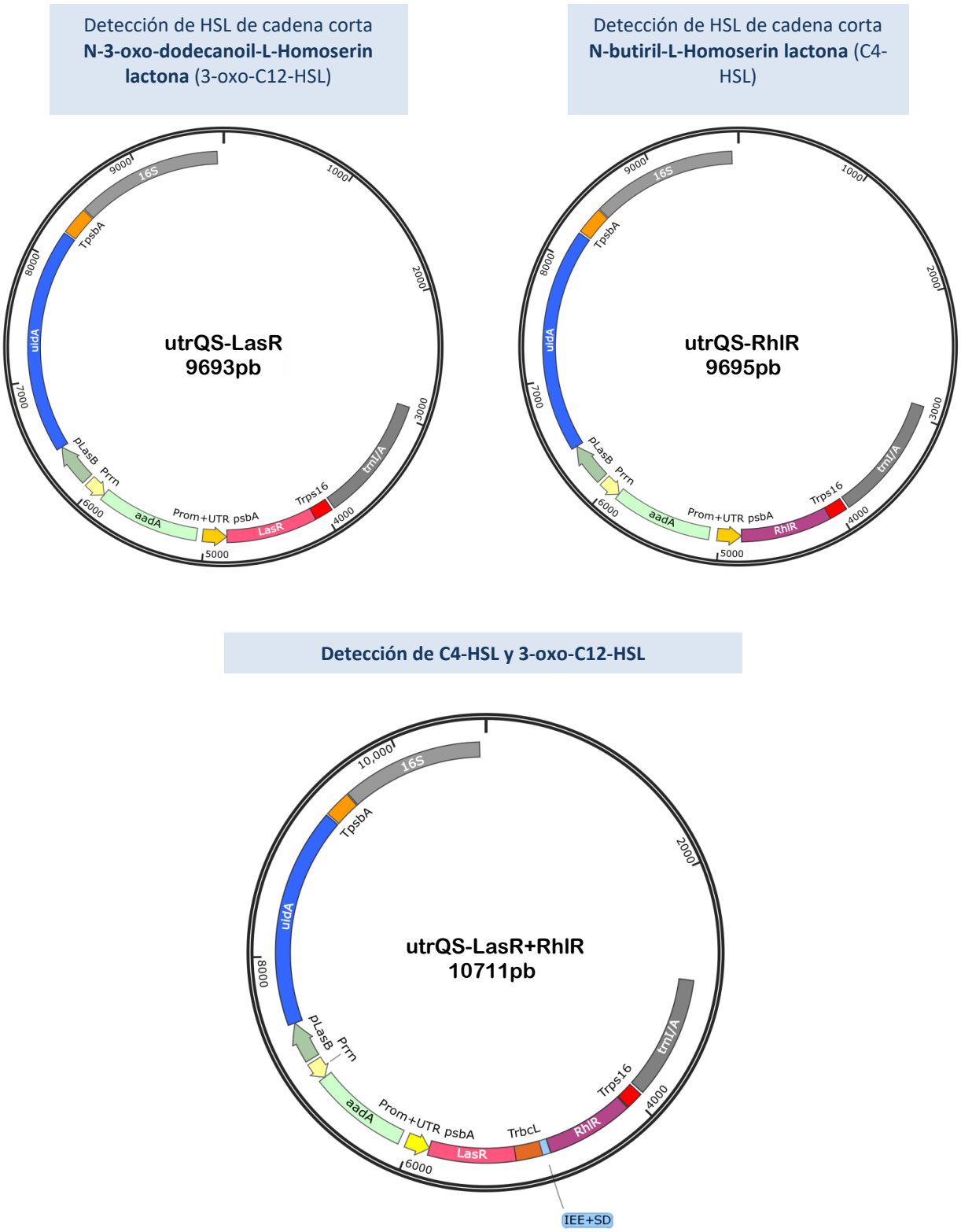

Figura 6. Esquema de los vectores utrQS utilizado para la transformación de plástidos. El vector utrQS-LasR se diseño y posee los elementos necesarios para detectar la AHL de cadena larga N-(3-oxododecanoil)-L-Homoserín lactona (3O-C12-HSL), el vector utrQS-RhlR es capaz de detectar la AHL

de cadena corta denominada N-(butiril)-L-Homoserin lactona (C4-HSL) y, por último, la construcción utrQS-LasR+RhlR detecta ambas AHL mencionadas anteriormente.

b) Elementos IEE y SD

Se han reportado pequeñas secuencias, denominados elementos de expresión intercistrónica (IEE), que median el correcto procesamiento de ARNm policistrónicos en transcriptos monocistrónicos estables [96].

Las secuencias de IEE y SD se obtuvieron mediante síntesis (GeneScript) y fueron clonadas en el vector Puc57, dando lugar al vector denominado Puc57-IES. A estas secuencias se le adicionaron los sitios HindIII y NdeI para poder llevar a cabo el diseño de clonado planteado.

c) Promotor LasB

El promotor del gen de elastasa *LasB*, el cual es controlado transcripcionalmente y de forma positiva por los sistemas de *Quorum sensing* Las y Rhl de *P. aeruginosa*, fue amplificado mediante la técnica de PCR. Para ello se utilizó como molde ADN genómico de *P. aeruginosa* y los oligonucleótidos iniciadores pLasB-Fw y pLasB-Rv que adicionan los sitios SpeI y NdeI, respectivamente.

d) Terminadores TpsbA y TrbcL

La secuencia del terminador del gen *psbA*, región 3' UTR, se amplificó utilizando los iniciadores TpsbA-Fw y TpsbA-Rv que incorporan los sitios XbaI y NotI, respectivamente.

Para la amplificación de la región 3´ UTR del gen plastídico *rbcL* se utilizaron los iniciadores TrbcL_Fw (que adiciona los sitios de restricción HindIII y XbaI) y TrbcL_Rv, que contiene un sitio de reconocimiento para la enzima HindIII. En ambos casos, se utilizó como molde, ADN plastídico de tabaco. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector comercial pZeRO-2.

2.1 Construcción del vector utrQS-RhlR

Para la construcción del vector utrQS-RhlR (Figura 7), el fragmento amplificado correspondiente al promotor LasB fue cortado con las enzimas de restricción SpeI y NdeI y se ligó al vector pZErO-Gus que había sido digerido previamente con las mismas enzimas; se obtuvo entonces el vector pZErO_pLasB-gus. Luego, se cortó este plásmido con las enzimas SpeI y NotI para liberar el fragmento pLasB-gus. En simultáneo, se cortó el vector pZErO-PA con las enzimas SpeI y NotI y se ligó con el fragmento SpeI-NotI obtenido del pZErO-PA-pLasBGus. El vector pZErO-PA-pLasBGus y el vector pZErO-psbA se cortaron con las enzimas

XbaI y NotI y se ligaron formando el vector denominado pZErO-PA-pLasBGusTrpsA. A partir del plásmido pGEM16S-trnA se obtuvo la región flanqueante del gen 16S mediante corte con las enzimas NotI y AvrII para ligarlo al vector pZErO-PA-16S-pLasBGusTrpsA cortado con las enzimas mencionadas anteriormente. En este paso se generó el vector pZErO-PA-16S-pLasBGusTrpsA del cual se va a obtener el fragmento flanqueado por las secuencias de corte de NotI y KpnI para ser subclonado en el vector utr-RhlR.

2.2 Construcción del vector utrQS-LasR

Para generar el vector utrQS-LasR, se obtuvo el fragmento flanqueado por los sitios de restricción NotI y KpnI del vector intermediario pZErO-PA-16S-pLasBGusTrpsA. Luego este fragmento se clonó en el vector utr-LasR digerido con las enzimas mencionadas anteriormente, obteniendo de esta forma el vector final utrQS-LasR que será utilizado para la transformación de cloroplastos (Figura 8).

2.3 Construcción del vector utrQS-LasR+RhlR

Para generar el vector que posee las secuencias codificantes correspondientes a LasR y RhlR en una misma construcción, se requiere de una secuencia de procesamiento como es la secuencia de IEE y el elemento SD para la traducción del segundo cistrón. Estas secuencias se obtuvieron del vector Puc57-IES utilizando las enzimas HindIII y KpnI y se subclonaron en el vector comercial pZErO-2, obteniendo el plásmido pZErO-IES. Este vector se cortó con NdeI y XbaI y en él se subclonó el fragmento RhlR cortado con las mismas enzimas. El vector generado, pZErO-IES-RhlR se cortó luego con la enzima de restricción HindIII y se ligó al fragmento del terminador *rbcL*, dando lugar al vector intermediario pZErO-IES-RhlR-TrbcL. Al vector utr-LasR se le insertó un fragmento proveniente de pZErO-IES-RhlR-TrbcL mediante la digestión con la enzima XbaI de ambos. El vector generado, denominado utr-LasR-IES-RhlR-TrbcL, fue cortado en los sitios NotI y KpnI, para permitir la introducción por ligación de un fragmento flanqueado por estos mismos sitios de restricción proveniente del vector pZErO-PA-16S-pLasBGusTrpsA. Este último paso de clonado origina al vector final denominado utrQS-LasR+RhlR (Figura 9).

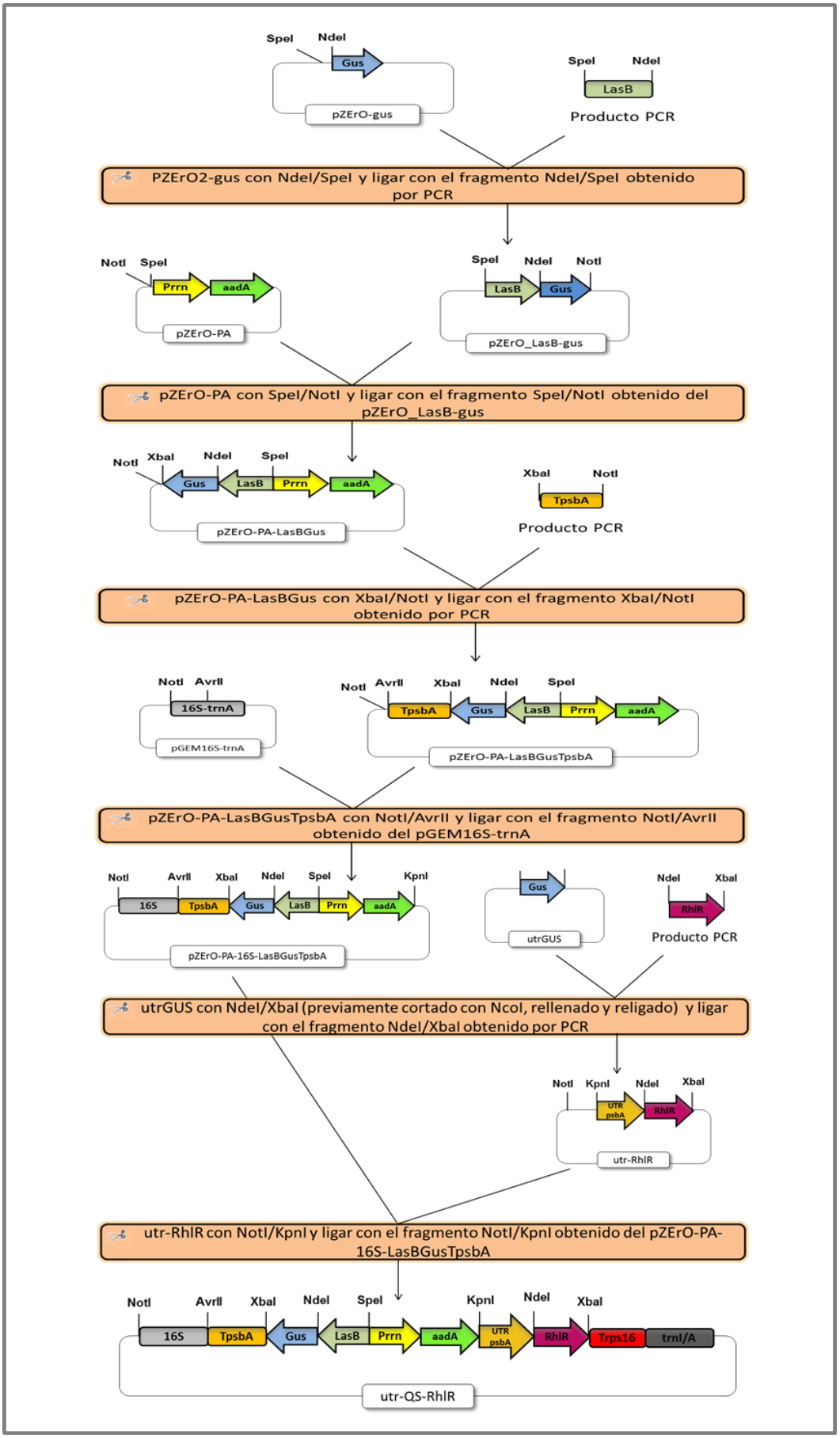

Figura 7. Estrategia de clonado para el desarrollo del vector utrQS-RhlR.

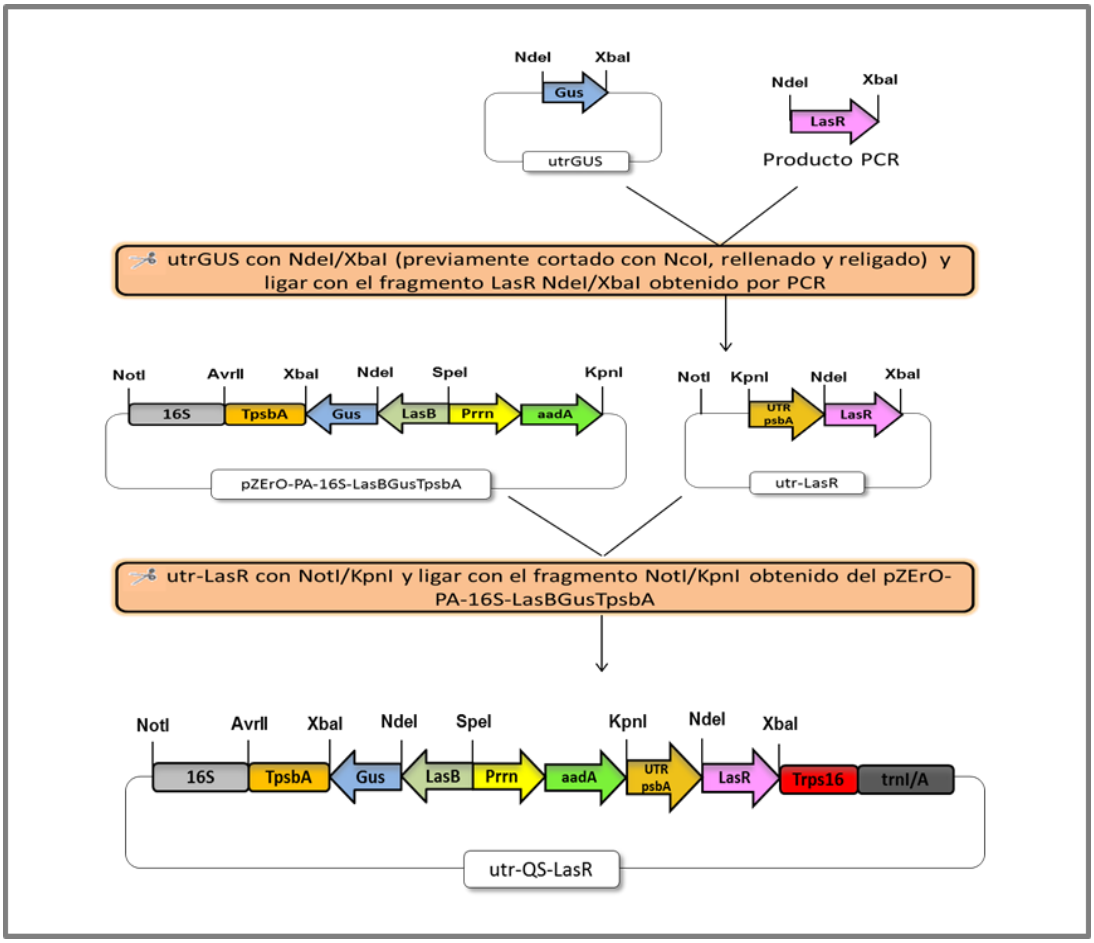

Figura 8. Estrategia de clonado para el desarrollo del vector utrQS-LasR.

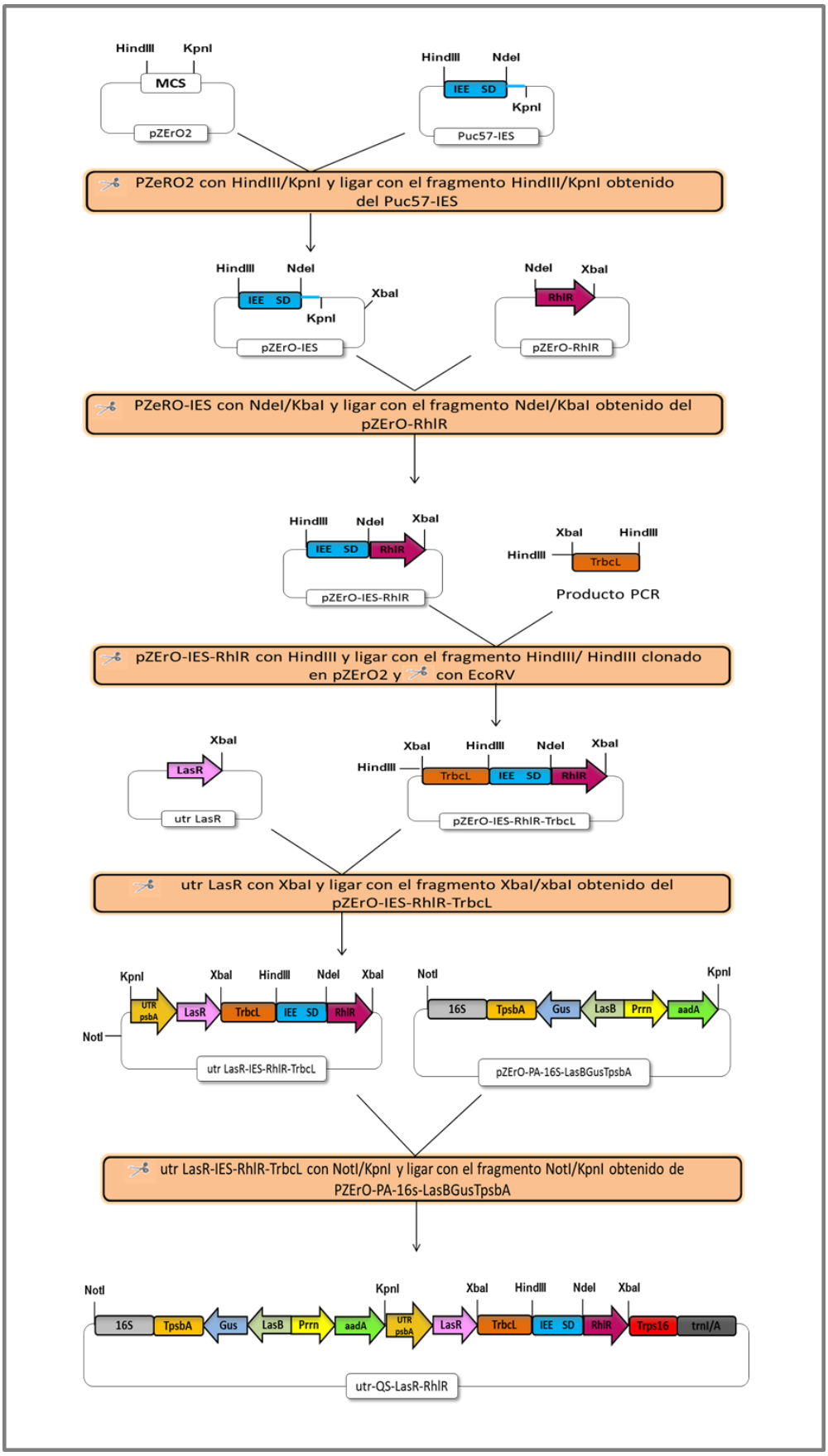

Figura 9. Estrategia de clonado para el desarrollo del vector utrQS-LasR+RhlR.

3. Evaluación de las construcciones en un sistema procariota

Con el fin de realizar una evaluación preliminar de la integridad de las construcciones obtenidas, se analizó la funcionalidad de los vectores en *Escherichia coli*.

La transcripción de muchos genes fotosintéticos de los cloroplastos está regulada por la ARN polimerasa codificada en el genoma plastídico (PEP), conteniendo los promotores de estos genes regiones conservadas en las posiciones -35 y -10 desde el sitio de inicio de la transcripción. Esta estructura es equivalente a la de los promotores del tipo procariota σ70 de *E. coli* [95]. Por este motivo, es posible evaluar la funcionalidad de los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR en *E. coli*, ya que poseen regiones regulatorias de origen procariota.

Se diseñó un ensayo con el objetivo de evaluar si los elementos incluídos en el vector permiten la detección de AHLs, y en consecuencia, la activación de la transcripción del promotor *pLasB* y expresión del gen reportero. Dado que las cepas DH10B y DH5α poseen actividad β-glucuronidasa basal, los vectores generados se introdujeron por transformación en la cepa BW27343 (CGSC#7924) que no posee actividad β-glucuronidasa. El ensayo se realizó en placas de Petri armadas con un *top* agar conteniendo el sustrato X-Gluc (para evaluar actividad β-glucuronidasa) y las bacterias *P. aeruginosa* PAO1 (cepa productora de *N*-3-oxo-dodecanoil-L-Homoserin lactona, y *N*-butiril-DL-Homoserin lactona) o *E. coli* (utilizada como control no inductor). Sobre el *top* agar se depositaron alícuotas obtenidas de cultivos crecidos en medio líquido de las bacterias recombinantes a ensayar (transformadas con los plásmidos utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR). Se incluyó como control positivo *E. coli* cepa BW27343 transformada con el plásmido pBSW-utrGus, y no transformada como control negativo.

Como se observa en la Figura 10A, la presencia de AHLs indujo la expresión de la proteína reportera β-glucuronidasa, indicando la funcionalidad de los vectores desarrollados en un sistema procariota. Como control de la producción de AHLs se realizó un ensayo haciendo una estría vertical de la cepa bacteriana indicadora *Chromobacterium violaceum* cepa CV026/12E1B (esta bacteria produce violeceína en presencia de AHLs de largo de cadena variable), y estrías horizontales con las bacterias *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo) y *E. coli* (control negativo) (Figura 10B) (se amplia información de cepas indicadoras en la sección 6.2). Si bien estos resultados no pueden extrapolarse a lo que sucederá en la planta, nos permitieron verificar la integridad de las construcciones diseñadas y su funcionalidad en un sistema procariota.

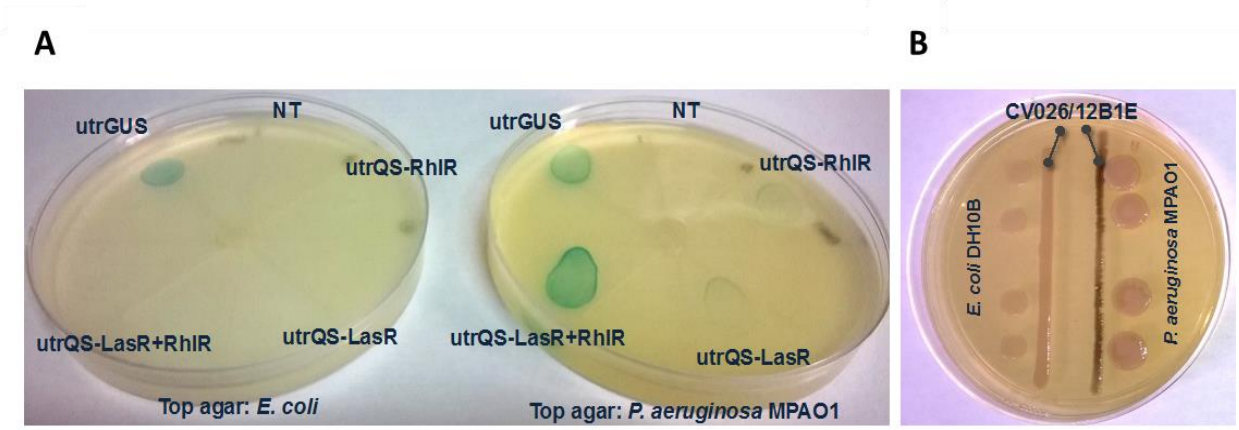

Figura 10. Expresión inducible del gen reportero *uidA* en bacterias. **A)** ensayo histoquímico realizado sobre bacterias en placas conteniendo X-Gluc. **B)** control de producción de AHLs por *P. aeruginosa* PAO1 mediante la bacteria indicadora *Chromobacterium violaceum* cepa CV026/12E1B.

4. Transformación de cloroplastos de *N. tabacum* con las construcciones utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR

Luego de evaluar la funcionalidad de las construcciones diseñadas en un sistema procariota, se realizó la transformación de cloroplastos de tabaco utilizando la técnica de biobalística. Se utilizaron las construcciones diseñadas utr-QS-LasR, utr-QS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR para bombardear explantos foliares de *Nicotiana tabacum cv*. Petit Havana y obtener las plantas transplastómicas. Los fragmentos de hojas bombardeadas se colocaron en medio RMOP en presencia de 500 mg/l de espectinomicina utilizada como agente selector. Se incluyó un control de selección (explantos no bombardeados en presencia de espectinomicina) y un control de regeneración (explantos bombardeados en ausencia del agente selector). Al cabo de un mes se obtuvieron los primeros brotes (Figura 11).

Figura 11. Transformación del genoma de cloroplastos de *N. tabacum* var. Petit Havana. Luego de aproximadamente 4 semanas después del bombardeo regeneran los primeros brotes resistentes al antibiótico, las flechas señalan los brotes regenerados **(izquierda)**. En paralelo se realizaron controles de regeneración (discos de hojas de *N. tabacum* cv *Petit Havana* no transformados, colocados en medio RMOP sin agente selector) **(Medio)**, y controles de selección (discos de hojas de *N. tabacum cv Petit Havana* no transformados, colocados en medio RMOP con 500mg/L de espectinomicina) **(Derecha)**.

Los brotes regenerados en cada experimento de transformación enraizaron en medio selectivo y su naturaleza transplastómica se evaluó mediante un ensayo de PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores diseñados para demostrar integración de la construcción genética en la región deseada del plastoma (región intergénica ubicada entre los genes plastídicos *16S* y *trnI)* (Figura 12A). El tamaño del producto de amplificación esperado para aquellas plantas transplastómicas que integraron correctamente la construcción en su genoma es de 1514 pb. Para todas las construcciones se obtuvieron al menos 3 líneas independientes, cuya naturaleza transplastómica confirmamos por PCR (Figura 12B). Luego de sucesivas rondas de regeneración *in vitro* en medio selectivo para alcanzar la homoplastía (situación en la cual todos los genomas plastídicos tienen incorporada la construcción de interés), las plantas obtenidas se pasaron a tierra para obtener semillas y poder generar material para caracterizaciones más exhaustivas.

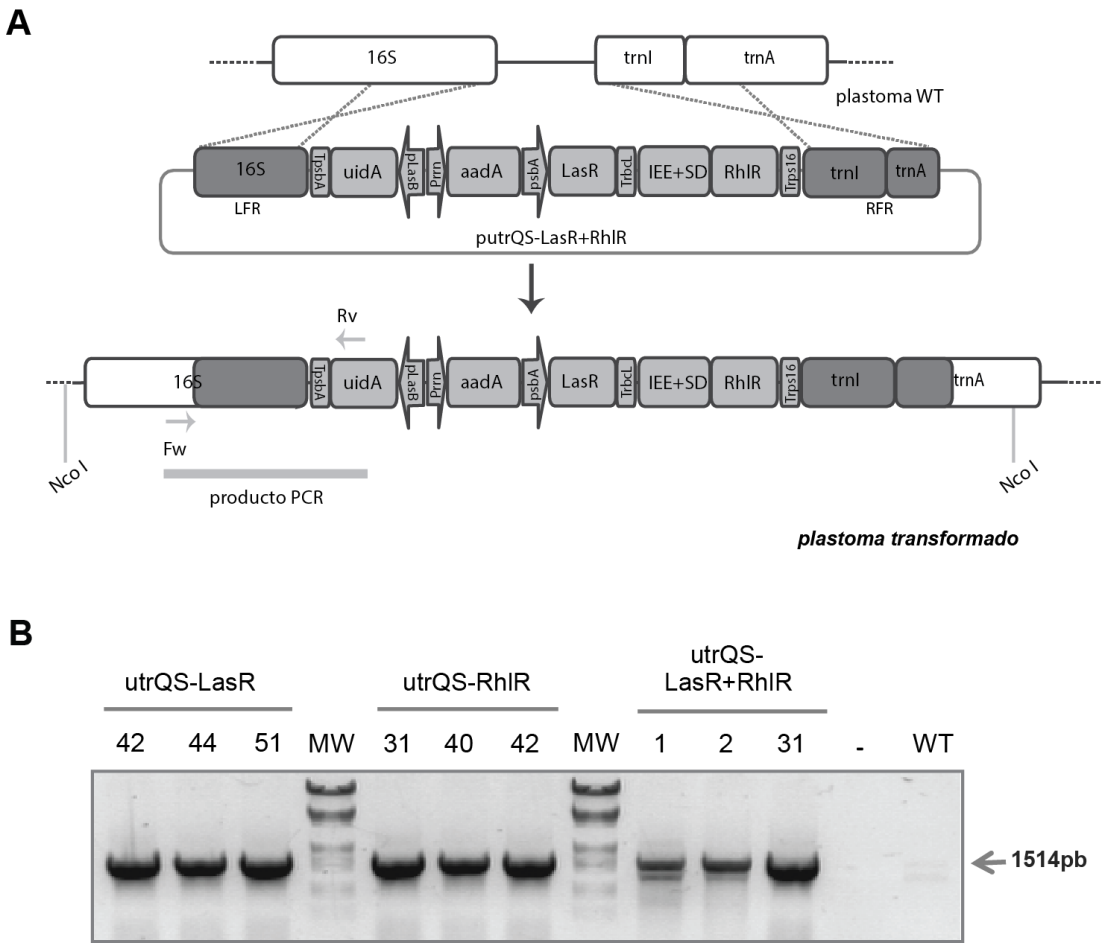

Figura 12. Evaluación de la naturaleza transplastómicas de las plantas obtenidas. **A)** Se esquematiza el vector utilizado para la transformación y el resultado de la integración por recombinación homóloga de la construcción genética de interés. Se muestran también los iniciadores Fw y Rv utilizados en la reacción de PCR **B)** identificación de las líneas transplastómicas por ensayo de PCR con los inciadores Fw y Rv. MW: lambda EcoRI+HindIII, PB-L.

5. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas transplastómicas

5.1 Análisis fenotípico de plantas transplastómicas

En la Figura 13 se muestran los ensayos de germinación en presencia de 500mg/L de espectinomicina, utilizando semillas de las líneas transplastómicas obtenidas de las primeras rondas de regenaración y de plantas controles no transformadas. Todas las plántulas germinadas a partir de semillas de las líneas transplastómicas crecen en presencia del selector, mientras que las plántulas germinadas a partir de semillas no transformadas son blancas y no desarrollan. *In vitro*, estas plántulas transplastómicas mostraron un fenotipo normal.

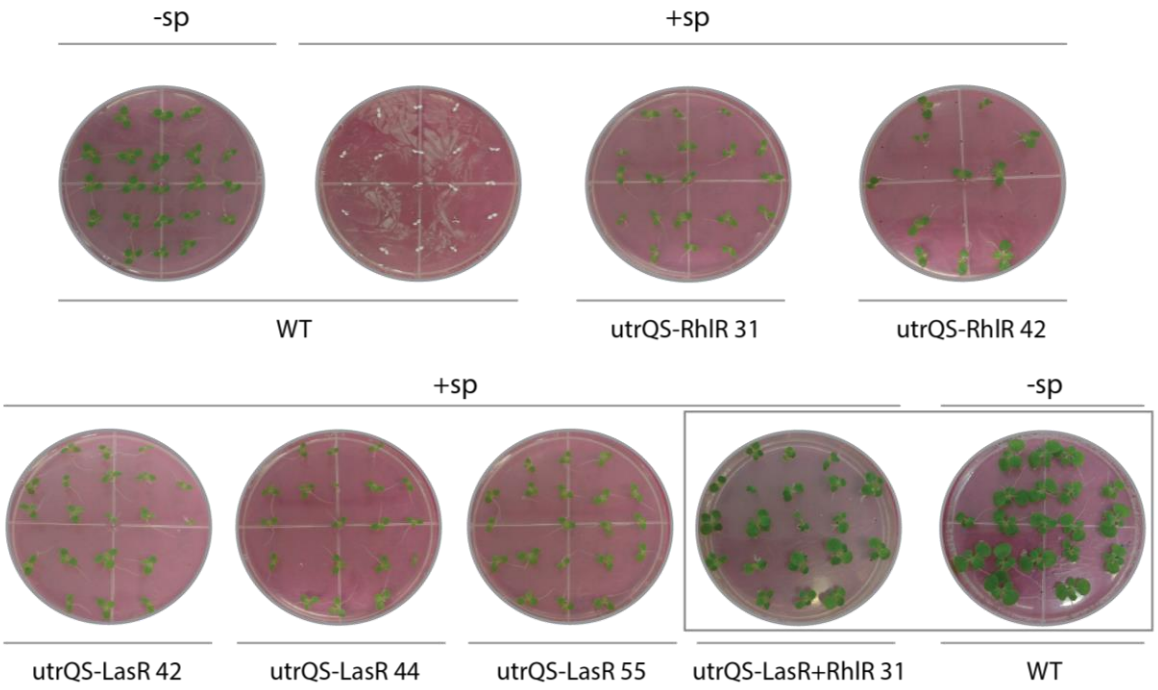

Figura 13. **Ensayo de germinación de semillas de plantas transplastómicas de tabaco.** Semillas generadas por autofecundación de plantas control de *N. tabacum* cv. Petit havana y plantas transformadas con el vector utrQS-RhlR, utrQS-LasR y utrQS-LasR+RhlR se esterilizaron superficialmente y se colocaron en placas conteniendo MS solo o adicionado con 500mg/L de espectinomicina. La línea utrQS-LasR+RhlR 31 esta desfasada en el tiempo con respecto al resto de las líneas transplastomicas por lo tanto posee su propio control WT.

Las plantas transplastómicas fueron sujetas a distintas rondas de regeneración con el objetivo de alcanzar un estado homoplástico, colectándose semillas a partir de cada ronda. Cuando las semillas provenientes de plantas transplastómicas de primera ronda de regeneración (T1 R1) germinaron en presencia de espectinomicina, las plántulas obtenidas mostraron un fenotipo de hojas indistinguible de las plantas controles (Figura 14A). Sin embargo, plántulas *in vitro* germinadas a partir de semillas provenientes de plantas de segunda y/o tercera ronda de regeneración (T1 R2 y T1 R3 respectivamente) dependiendo de la línea transplastómica, mostraron un fenotipo variegado en las hojas y un crecimiento más lento de las plantas en tierra (Figura 14B). Este fenotipo variegado, definido como varios sectores de la hoja de color verde claro, se conservo en las plantas aclimatadas a condiciones de invernadero (Figura 15).

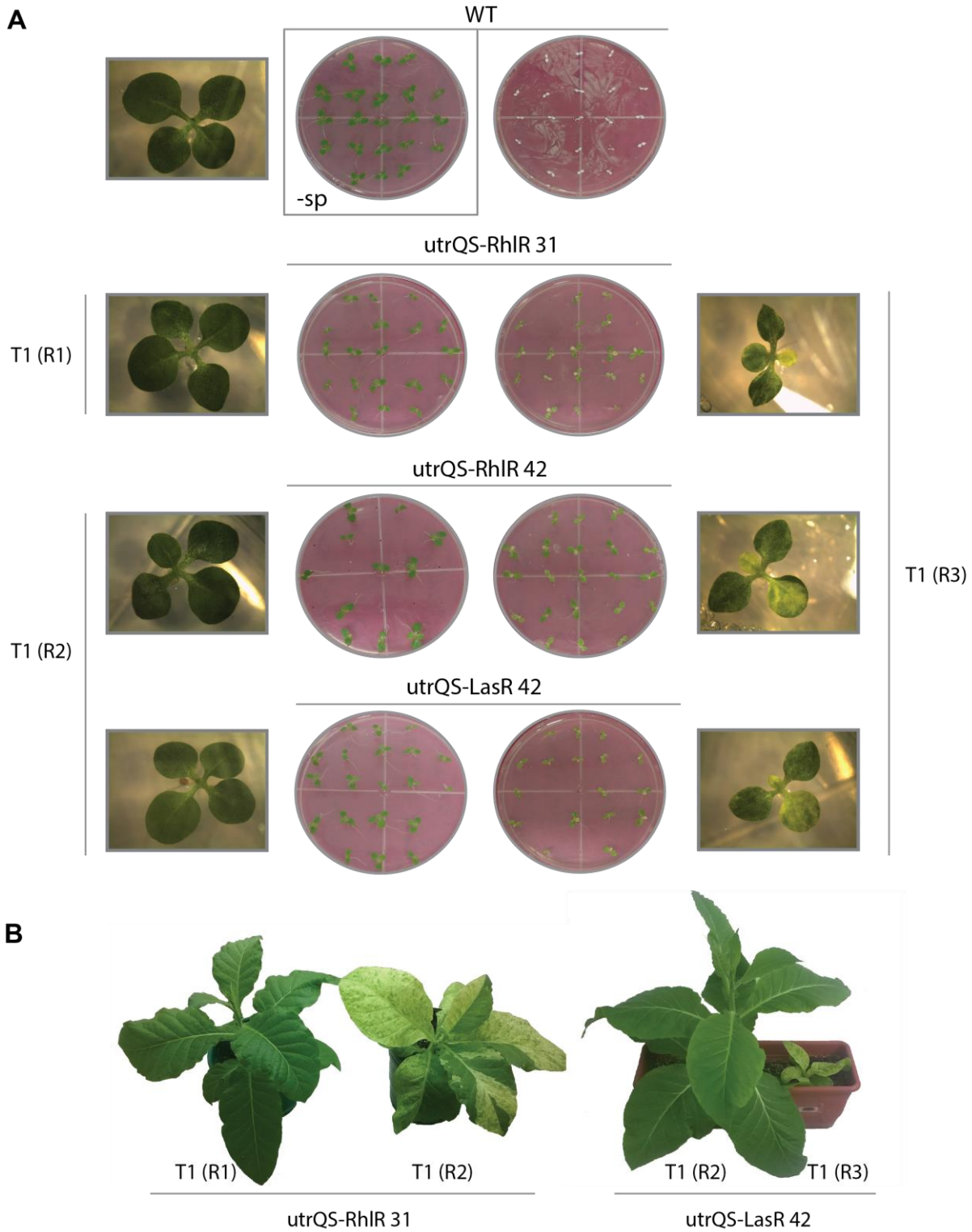

Figura 14. Fenotipo de hojas variegadas en plantas transplastómicas *in vitro* y en tierra. A) Derecha: Se muestra el fenotipo de hojas variegadas en plantas de las líneas utrQS-RhlR 31 y 42 y utrQS-LasR 42 provenientes de semillas de plantas de tercera ronda de regeneración (T1 R3). En comparación (izquierda), se muestra el fenotipo normal de la linea utrQS-RhlR 31 proveniente de semillas de plantas de primera ronda de regeneración (T1 R1) y, las líneas utrQS-RhlR 42 y utrQS-LasR 42 proveniente de semillas de plantas de segunda ronda de regeneración (T1 R2). **B)** El fenotipo que se observa en las plantas en condiciones *in vitro* se mantiene al ser pasadas a tierra.

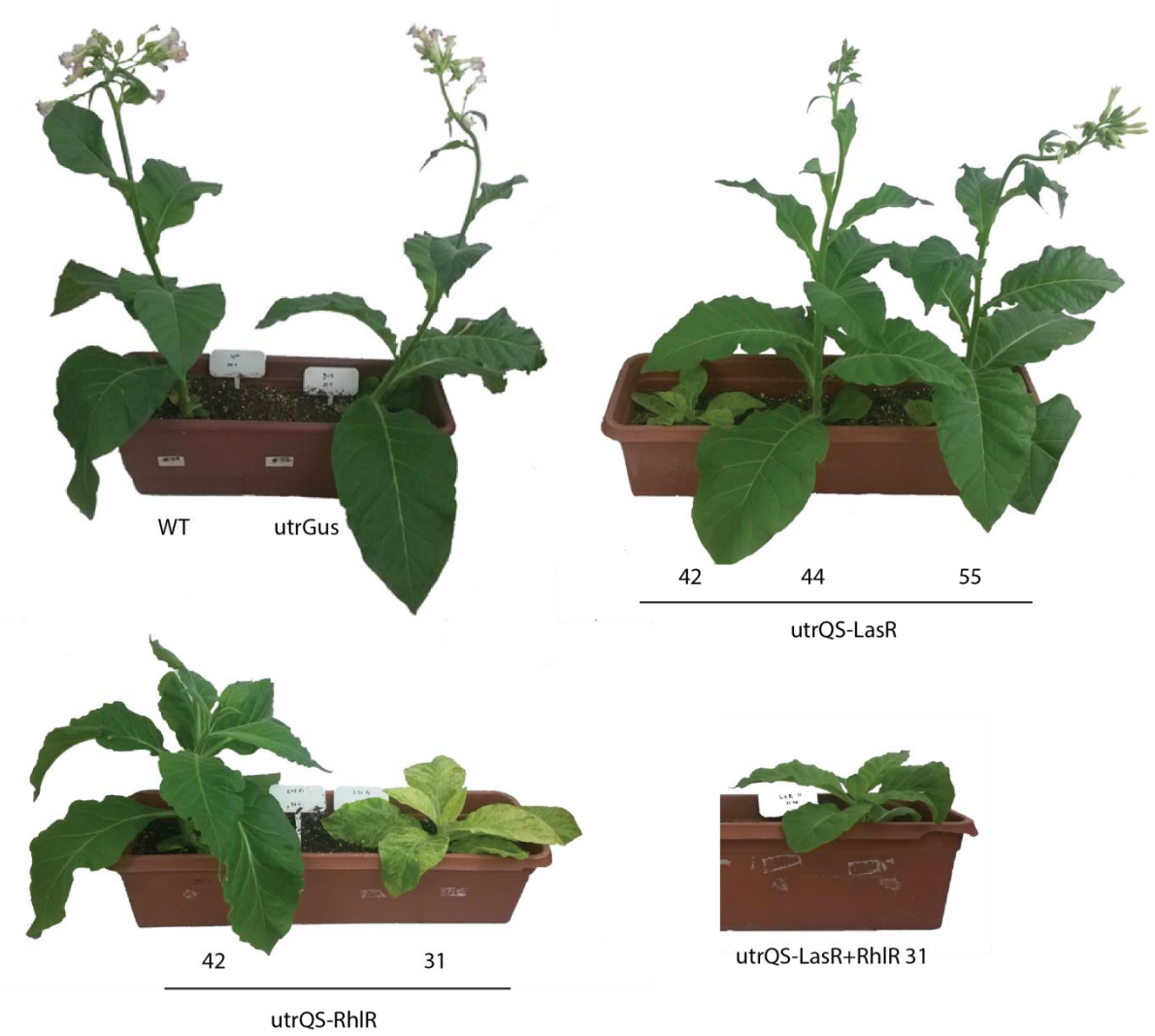

Figura 15. Fenotipo de las plantas transplastómicas en tierra. Se muestran plantas adultas de cada línea transplastomica utrQS-RhlR, utrQS-LasR y utrQS-LasR+RhlR de aproximadamente 12 semanas, crecidas en invernadero.

5.2. Análisis del estado homoplástico

Para el análisis de la integración del transgén y para determinar si se alcanzó el estado homoplástico, se realizó un ensayo de *Southern blot*. Para ello, se digirió el ADN total obtenido de hojas de las plantas transplastómicas con la enzima de restricción NcoI, se separó electroforéticamente, y luego de la transferencia se realizó una hibridación utilizando como sonda un fragmento del gen *trnI*. La enzima corta río arriba y río abajo del sitio de integración en el genoma plastídico, además la secuencia correspondiente a RhlR posee un sitio interno de corte para la enzima, por lo tanto, las plantas que poseen esta secuencia generaran una banda de menor peso molecular (Figura 16A).

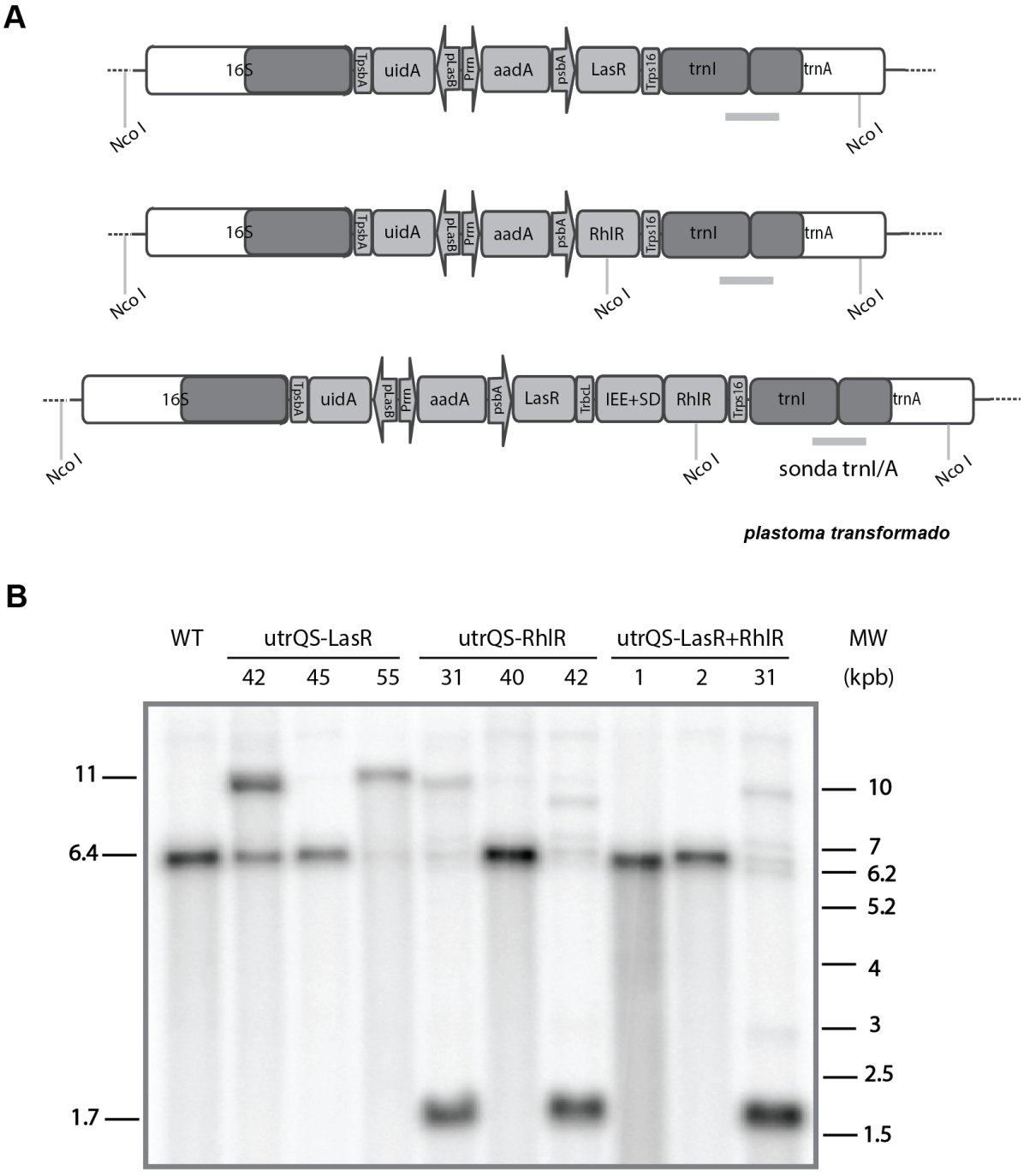

Figura 16. Análisis de las plantas transplastómicas por *Southern blot*. A) Mapa físico de la región de recombinación de los genomas transformados con las distintas construcciones, mostrando el sitio de hibridación de la sonda trnI/A y los sitios de corte de la enzima NcoI. **B)** *Southern blot* empleando la sonda trnI/A para confirmar la integración y homoplastía. Se indica en el margen derecho la posición del marcador de peso molecular (PM, 1 KB, Invitrogen) y a la izquierda los tamaños esperados para las bandas en kpb.

Se pudo establecer el estado homoplástico al detectar bandas de 11.000 pb (utrQS-LasR) y 1.700 pb (utrQS-LasR+RhlR y utrQS-RhlR) en relación con una banda de 6.425 pb en las

plantas no transformadas. El análisis de *Southern blot* confirmó la integración del transgén en las líneas utrQS-LasR 42 y 55, utrQS-LasR+RhlR 31, y utrQS-RhlR 31 y 42 (Figura 16B). Sin embargo, en estas líneas pudo observarse una tenue banda de alrededor de 6.4 Kpb, sugiriendo que en estas plantas no fue posible alcanzar la homoplastia; y otras bandas no esperadas que podrían estar sugiriendo algún tipo de rearreglo. Tambien se confirmó la integración del transgen en la posición deseada de la línea utrQS-LasR 44 (dato no mostrado). Las líneas utrQS-LasR 45, utrQS-LasR+RhlR 1 y 2, y utrQS-RhlR 40, fueron positivas en el análisis mediante PCR; sin embargo, no lo fueron en el análisis por *Southern blot*. Esto puedo explicarse ya que las PCR se realizaron a tiempos tempranos a partir de los brotes regenerados luego de los bombardeos y el transgén se pudo haber perdido durante el desarrollo en la generación de las semillas.

5.3. Caracterización de los transcriptos en las plantas transplastómicas

Mediante un ensayo de *northern blot* se evaluó, en las distintas líneas de plantas transplastómicas obtenidas, la presencia y abundancia de los transcriptos originados a partir de las secuencias promotoras (*Prrn* endógeno y, *Prrn* y *psbA* de la construcción). En las líneas transformadas con los diferentes vectores, el promotor *rrn* endógeno genera el transcripto de mayor tamaño. Este transcripto posiblemente no se encuentre presente ya que debe superar varios sitios de terminación por lo que no se muestra en la Figura 17A. Para las plantas transformadas con los vestores utrQS-LasR y utrQS-RhlR se esperan observar transcriptos provenientes de los diferentes promotores de los mismos tamaños, ya que LasR y RhlR poseen la misma longitud de secuencia. El promotor fuerte *psbA* produce el transcripto de menor tamaño de 0,88 kb (B) para las líneas transformadas con los vectores utrQS-LasR y utrQS-RhlR. El promotor *rrn* proveniente de la construcción controla la transcripción de los genes *aadA*, LasR y RhlR, generando un transcripto bicistrónico de 2 kb (A). Para el vector utrQS-LasR+RhlR el transcripto esperado a partir del promotor *psbA* es de 0,95 kb para los monocistrónes procesados RhlR y LasR (D.2 y D.1, respectivamente). Sin embargo, si el procesamiento no es efectivo en un 100% se espera un transcripto de 1,9 kb a partir del promotor *psbA* (D). Por otro lado, el promotor *rrn* genera un transcripto de 2,9 kb cuando el procesamiento en el sitio IEE no es completo (C). Si el procesamiento se produce se generan un transcripto de 0,95 Kb (C.2) y otro de 2 Kb (C.1) (Figura 17A).

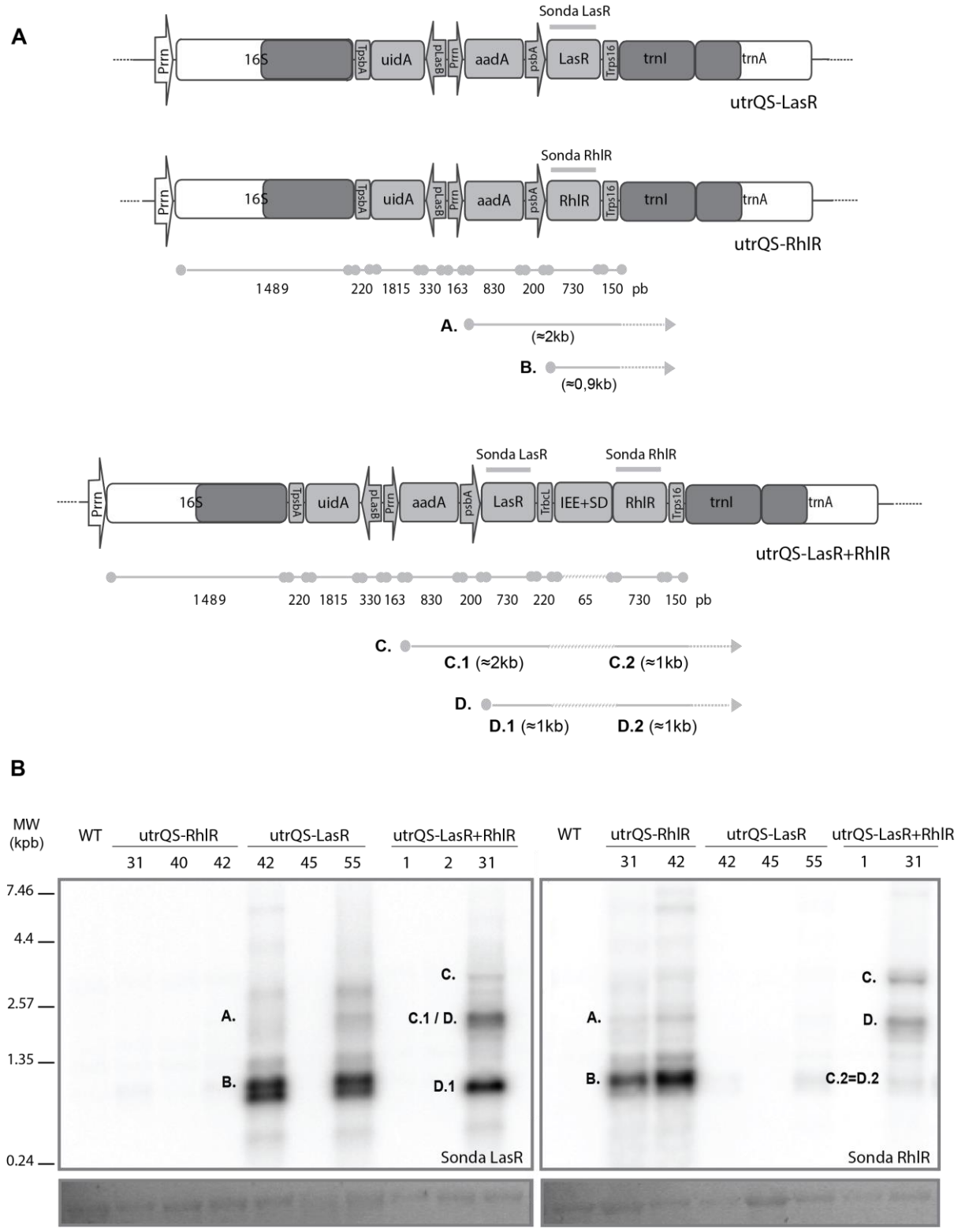

Figura 17. Análisis por *northern blot* de las plantas transplastómicas utrQS. A) Mapa físico mostrando los tamaños esperados para los distintos transcriptos. **B)** *Northern blot* empleando las sondas que hibridan con LasR y RhlR mostrando los transcriptos esperados. Al pie de la figura se muestra la banda correspondiente al ARN ribosomal 25S del gel teñido con bromuro de etidio antes de ser transferido como control de carga de las diferentes calles.

Como se observa en la Figura 17B, se detectan los transcriptos esperados a partir de cada uno de los promotores mencionados previamente confirmando que el procesamiento se esta produciendo auque no es del todo eficiente. Las líneas transplastómicas obtenidas con el vector utrQS-LasR producen un transcripto adicional de menor peso molecular al esperado para el transcripto originado a partir del promotor *psbA*. Mediante un análisis bioinformático de la secuencia correspondiente (utilizando el programa *ARNold finds rho-independent terminators http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/*) pudimos predecir un potencial sitio de terminación de la transcripción en la secuencia del transcripto correspondiente a LasR, que podría explicar el menor tamaño de este transcripto adicional observado.

Luego de la caracterización molecular de las plantas por PCR, *Southern* y *northern blot* se siguió trabajando solo con las plantas en la cuales se confirmó la integración del transgén al plastoma, utrQS-LasR 42, 44 y 55, utrQS-RhlR 31 y 42 y utrQS-LasR+RhlR 31.

5.4 Expresión de LasR y RhlR en plantas transplastómicas

Por último, se analizó la expresión de las proteínas LasR y RhlR mediante un ensayo de SDS-PAGE y *western blot* (WB) utilizando extractos de proteínas totales de hojas. En el gel teñido con *Coomassie brilliant blue* no se pudo observar una banda diferencial del tamaño esperado entre las plantas transplastómicas y la planta no transformada (Figura 18A). Por otro lado, se procedió al análisis de la expresión de las proteínas por la técnica de *western blot,* utilizando para ello, anticuerpos policlonales específicos que detectan LasR y RhlR. Mediante esta técnica se pudo confirmar la presencia de una banda especifica de 25 kDa, aproximadamente, para las líneas transplastómicas utrQS-LasR 42, 44 y 55, utrQS-RhlR 31 y 42 y utrQS-LasR+RhlR 31 con ambos anticuerpos (Figura 18B). Si bien en la figura parecería que la línea transplastómica utrQS-LasR 55 no presenta expresión de la proteína LasR, esto se debe a que en este ensayo de WB particular se sembró menos masa de esta muestra. En otros ensayos posteriores se pudo determinar que la línea utrQS-LasR 55 presenta acumulación detectable de la proteína LasR (dato no mostrado).

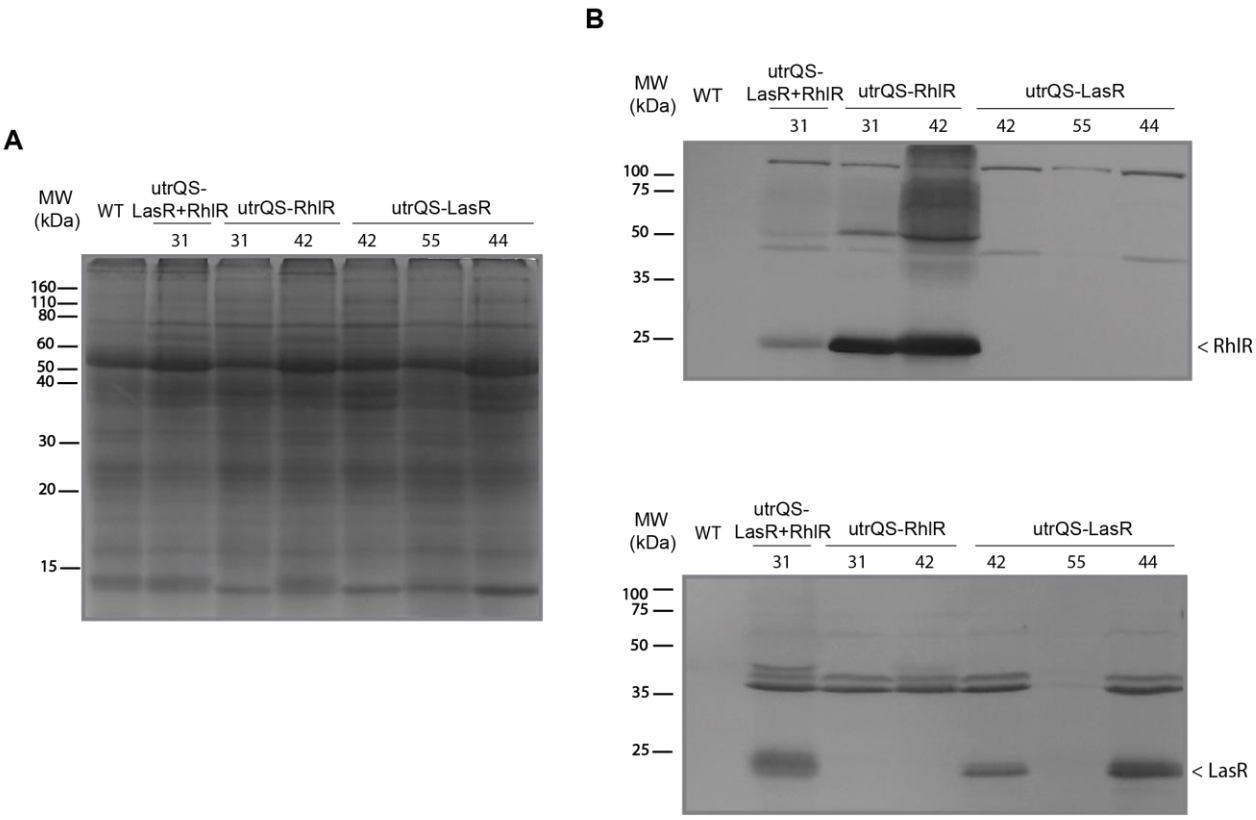

Figura 18. Expresión de LasR y RhlR en las diferentes líneas transplastómicas. Extractos de proteinas totales purificadas de las distintas líneas transplastomicas fueron separadas en un gel de poliacrilamida 15% **A)** Gel SDS-PAGE teñido con *Coomassie brilliant blue* **B)** *Western blot* revelado con anticuerpos anti-RhlR **(arriba)** y anti-LasR **(abajo)**. Se utilizó como control negativo extracto de hojas de una planta sin transformar. Se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad), los valores del marcador se encuentran expresados en kDa.

Además, se decidió analizar la acumulación y estabilidad de las proteínas a lo largo del desarrollo de las plantas transplastómicas. El objetivo de este análisis es estimar la acumulación de las proteínas LasR y RhlR en las hojas de diferentes edades y evaluar qué hojas podrían ser las mejores candidatas para futuros ensayos funcionales (inducción del sistema). El *western blot* reveló que las proteínas se acumularon en hojas jóvenes y también en hojas maduras en niveles muy similares (Figura 19). Lo que indica que son proteínas estables en el estroma de los cloroplastos.

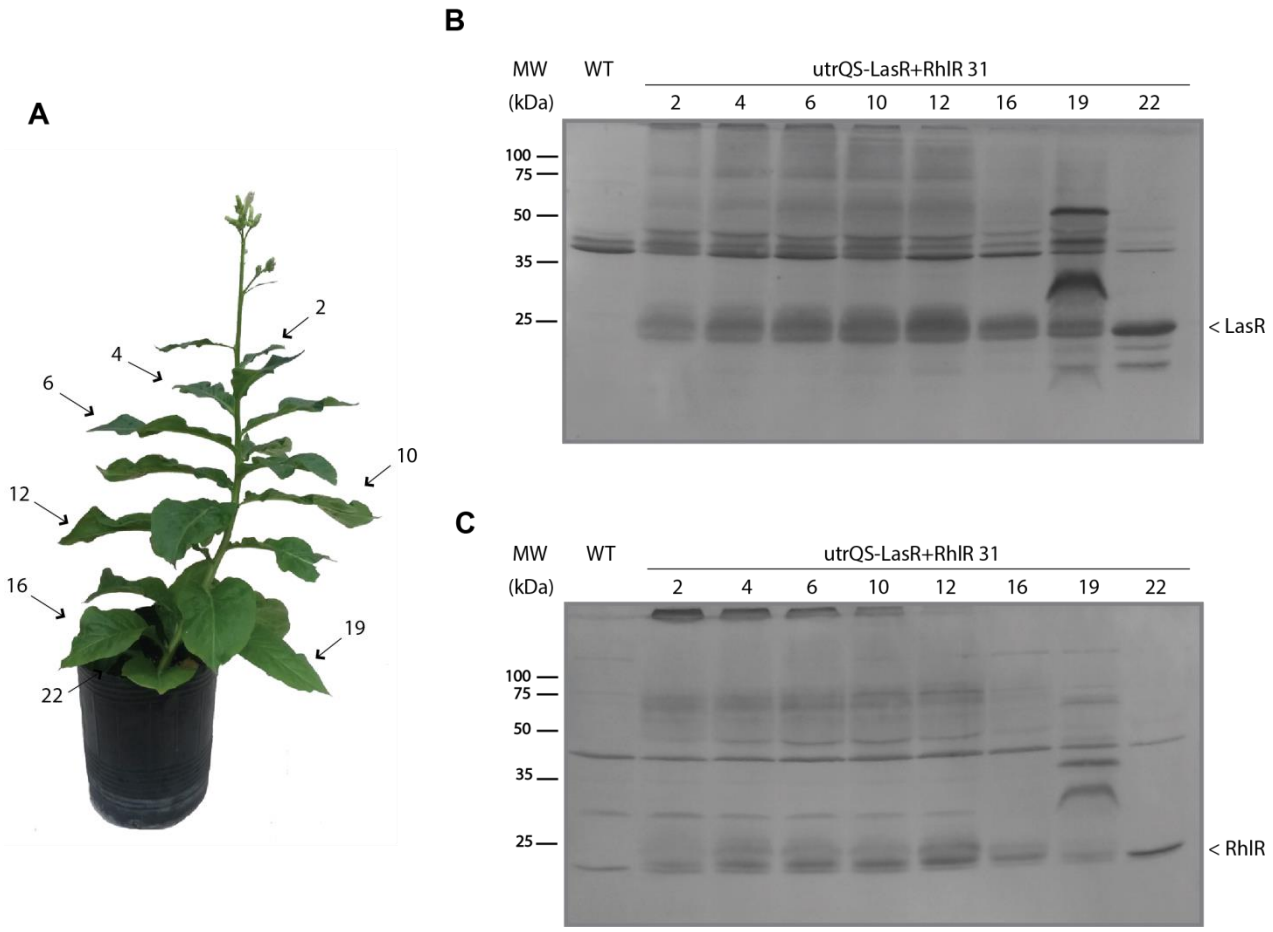

Figura 19. Caracterización de la acumulación de LasR y RhlR a lo largo del desarrollo de una planta transplastómica. A) Planta utrQS LasR+RhlR 31 utilizada en el estudio. Las hojas fueron numeradas de acuerdo a su edad desde el ápice hacia la base, considerando como la hoja numero 1 la primera hoja completamente expandida y la hoja 22 como la más vieja en estado aún no totalmente senescente. *Western blot* revelado con anticuerpos anti-LasR **(B)** y anti-RhlR **(C)**. Al margen se indica la posición esperada para las proteínas LasR y RhlR y el marcador de peso molecular expresado en kDa (*Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards*, Bio-Rad). Se utilizó extracto total de hojas *wild-type* como control.

Para evaluar la solubilidad de las proteínas, se realizó un ensayo de fraccionamiento en extractos totales de hojas de las plantas utrQS-LasR+RhlR 31. Se encontró que las proteínas LasR y RhlR se encuentran de manera mayoritaria en la fracción soluble (Figura 20).

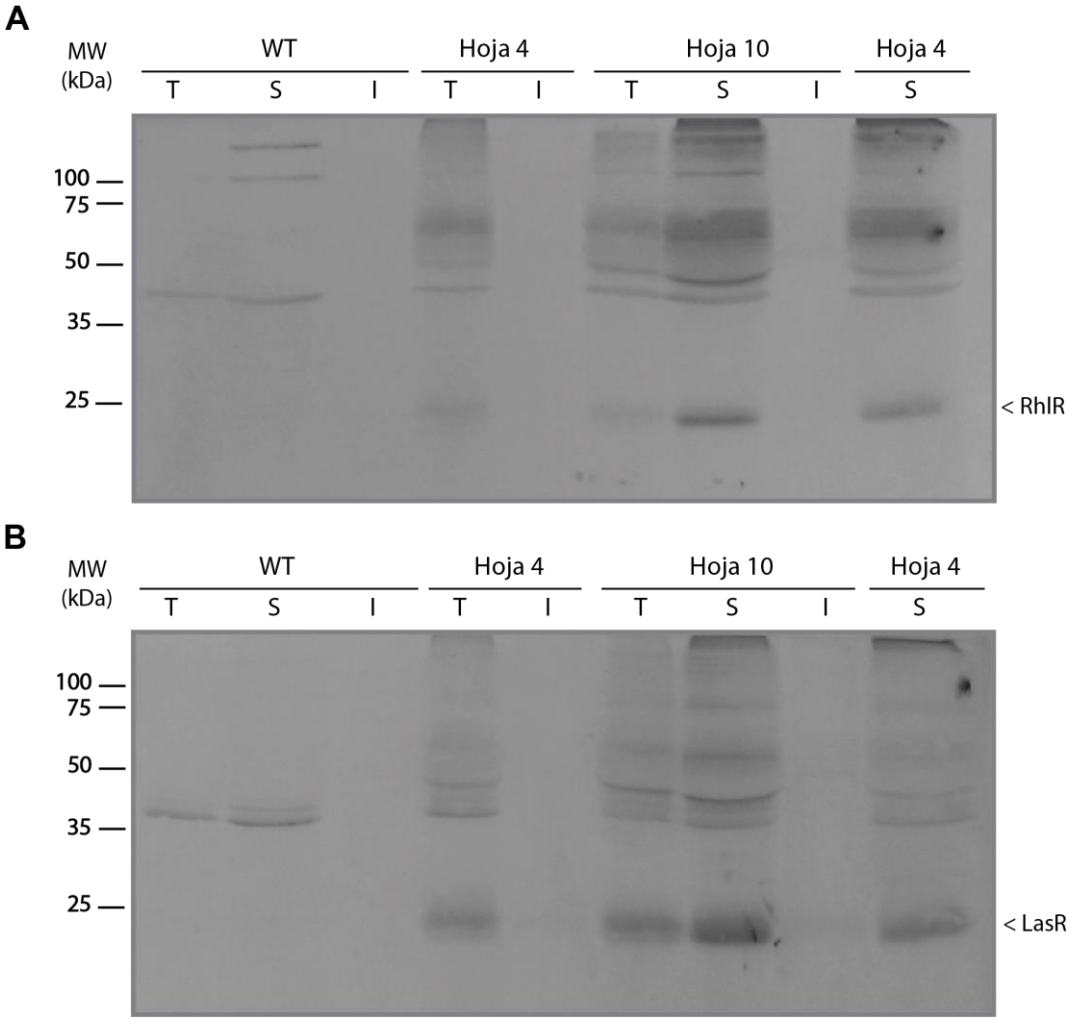

Figura 20. Análisis de la solubilidad de las proteínas LasR y RhlR expresadas en plantas transplastómicas. *Western blot* revelado con anticuerpos anti-RhlR **(A)** y con anticuerpos anti-LasR **(B)**. Se incluyeron extractos *wild-type* como controles. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente, de hojas de diferentes estadios (hoja 4 y 10) de plantas utrQS-LasR+RhlR 31. Se indican las posiciones esperadas para las proteínas LasR y RhlR y el marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards*, Bio-Rad) en los márgenes.

6. Ensayos funcionales de las líneas transplastómicas

6.1 Evaluación preliminar de la inducibilidad por AHLs en plantas transplastómicas

Para evaluar la ausencia de actividad β-glucuronidasa en las plantas transformadas en condiciones de no inducción, se germinaron semillas en presencia del agente selector para realizar posteriormente un ensayo histoquímico. Como se observa en la Figura 22, no se detectó actividad β-glucuronidasa en ninguna de las líneas transplastómicas evaluadas (Figura 21). Como control positivo del ensayo se utilizaron plantas transplastómicas utrGus que expresan de forma constitutiva el gen reportero *uidA,* y como control negativo plantas *wild type*.

De esta forma se demostró la ausencia de actividad β-glucuronidasa en las plantas transformadas con las construcciones en condiciones de no inducción.

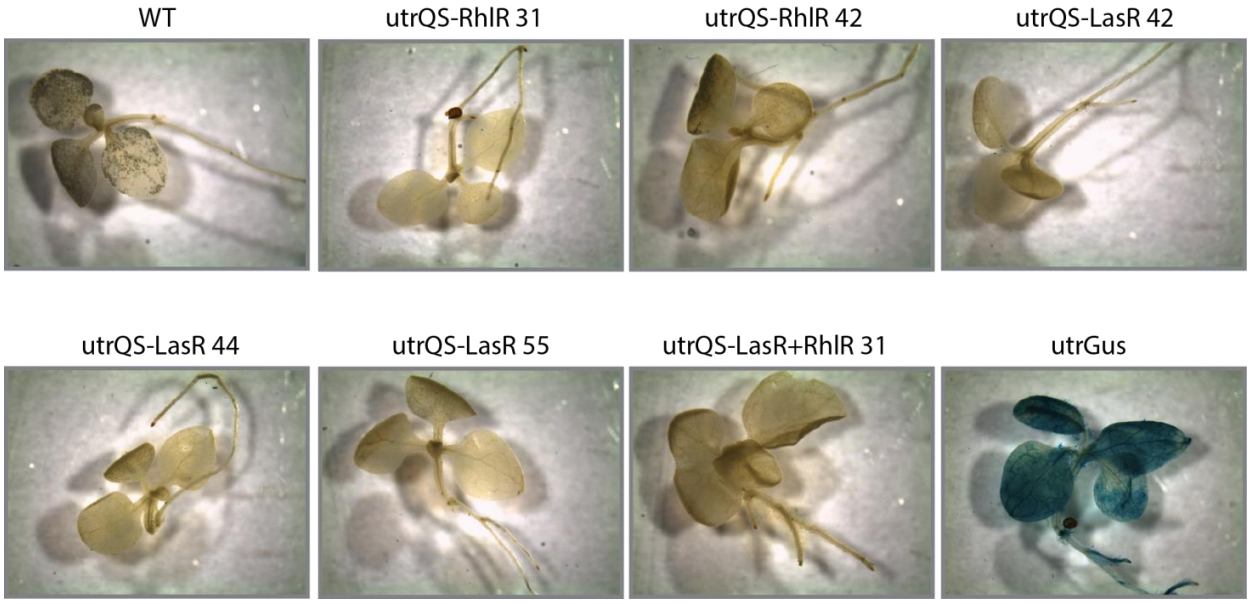

Figura 21. Evaluación de actividad β-glucuronidasa en condiciones no inductoras del sistema. A) Ensayo histoquímico para la detección de actividad β-glucuronidasa en las diferentes líneas de las plantas transformadas con los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR, utilizando como control positivo plantas utrGus y plantas sin transformar como control negativo.

Sin embargo, la falta de actividad β-glucuronidasa puede estar vinculada con la presencia de transcriptos que no se traducen y no con la ausencia de actividad transcripcional en condiciones no inductoras. Para determinarlo, se realizó un ensayo de *northern blot* empleando una sonda que hibrida con el transcripto *uidA*. Como se observa en la Figura 22, no se detectaron transcriptos correspondientes a *uidA,* confirmando que el promotor pLasB no está transcripcionalmente activo en ausencia de inducción (es decir, en ausencia de las AHLs correspondientes). Como control positivo se utilizo una planta transplastómica utrGus para la cuál se observaron los transcriptos esperados de aproximadamente 2kb y 3kb, correspondientes a los promotores *psbA* y *rrn*, respectivamente.

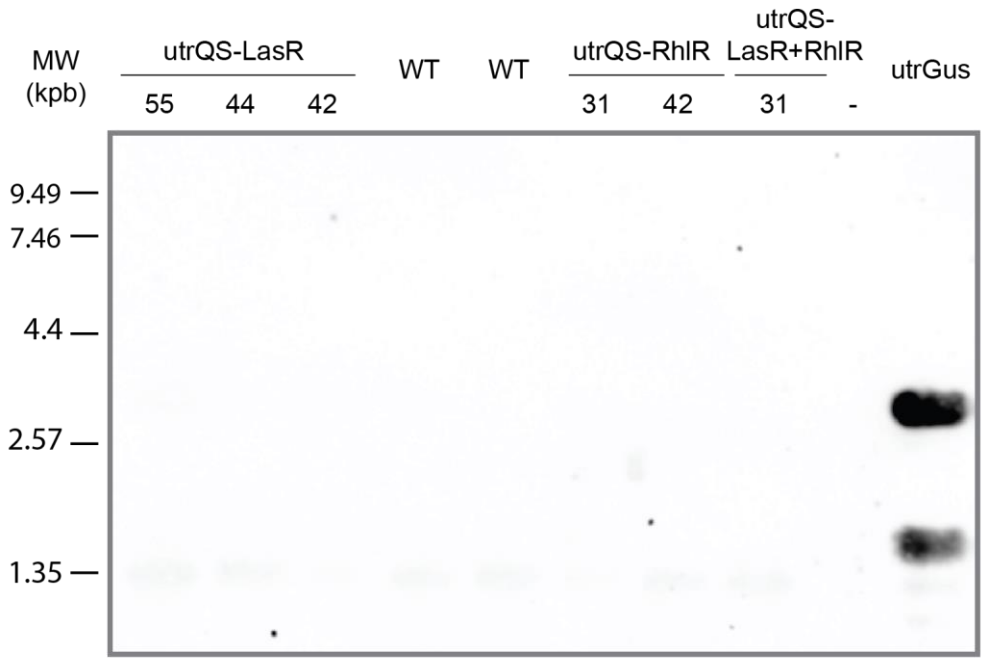

Figura 22. Análisis por *northern blot* de las plantas transplastómicas en condiciones de no inducción. A) *Northern blot* utilizando una sonda específica para detectar los transcriptos conteniendo la secuencia correspondiente a *uidA* Como control positivo se utilizó una planta transplastómica utrGus.

6.2 Análisis de la inducibilidad del sistema utilizando AHLs sintéticas

Antes de comenzar con los ensayos de inducción del sistema, se verificó la integridad de las moléculas señales (AHLs) en solución mediante ensayos con cepas indicadoras.

Existen diferentes bioensayos y sistemas sensores para la detección, caracterización y cuantificación de las AHLs. La cepa CV026 de *Chromobacterium violaceum* es una de las cepas indicadoras más utilizadas. Esta cepa es una mutante mini-Tn5 de la cepa tipo de esta especie ATCC 31532, en la cual la producción de AHLs está involucrada en la síntesis de violaceína, que confiere a las bacterias que la producen una coloración púrpura fácilmente detectable [97]. Otra cepa indicadora muy utilizada para la detección de AHLs es *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), que en respuesta a determinadas AHLs expresa la proteína reportera β-galactosidasa [98].

Se evaluó el censado de las moléculas señales sintéticas, específicas de la comunicación celular de *Pseudomonas aeruginosa*, 3O-C12-HSLs y C4-HSLs en concentraciones de 1, 10 y 100µM. Se observó que la cepa indicadora NTL4/pZLR4 es capaz de censar 3O-C12-HSLs y C4-HSLs, mientras que CV026/12E1B solo permite detectar 3O-C12-HSLs (Figura 23).

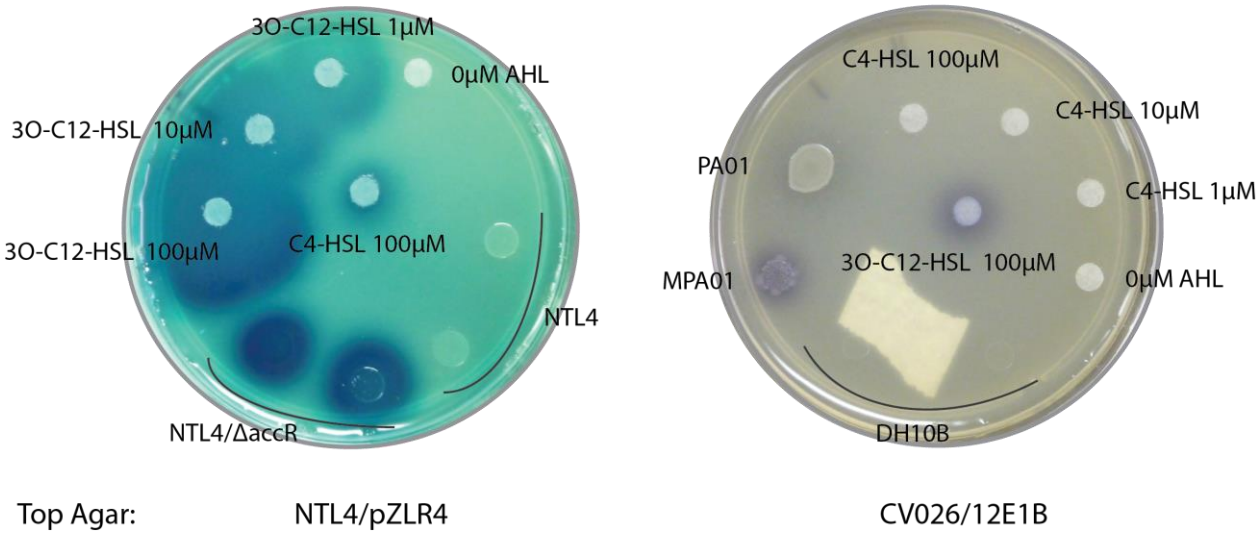

Figura 23. Ensayo de detección de AHLs sintéticas por parte de las cepas indicadoras NTL4/pZLR4 (izquierda) y CV026/12E1B (derecha)

Luego, se analizó la funcionalidad del sistema en las plantas utrQS-RhlR 31 utilizando diferentes concentraciones de C4-HSL sintética (Sigma). Las plántulas crecidas en medio MS fueron rociadas con diferentes concentraciones de C4-HSL (0, 0,1, 1 y 10 mM) y se tomaron muestras a distintos tiempos post tratamiento (0, 6, 12, 24 y 48 hs). En condiciones no inductoras, se pudo constatar la ausencia de expresión de GUS. En un primer ensayo en las plantas transplastómicas, luego de 48 hs de aplicada la C4-HSL, se constató la inducción de la expresión cuando utilizamos concentraciones de 1 mM y 10 mM (Figura 24).

Este ensayo fue repetido para las distintas líneas transplastómicas sin poder reproducir los resultados observados. Por este motivo, se realizaron nuevos ensayos variando la edad de las plantas, los métodos de aplicación de las AHLs y las condiciones experimentales, que se resumen en la Tabla 1. En ninguna de las condiciones ensayadas pudimos detectar actividad β-glucuronidasa.

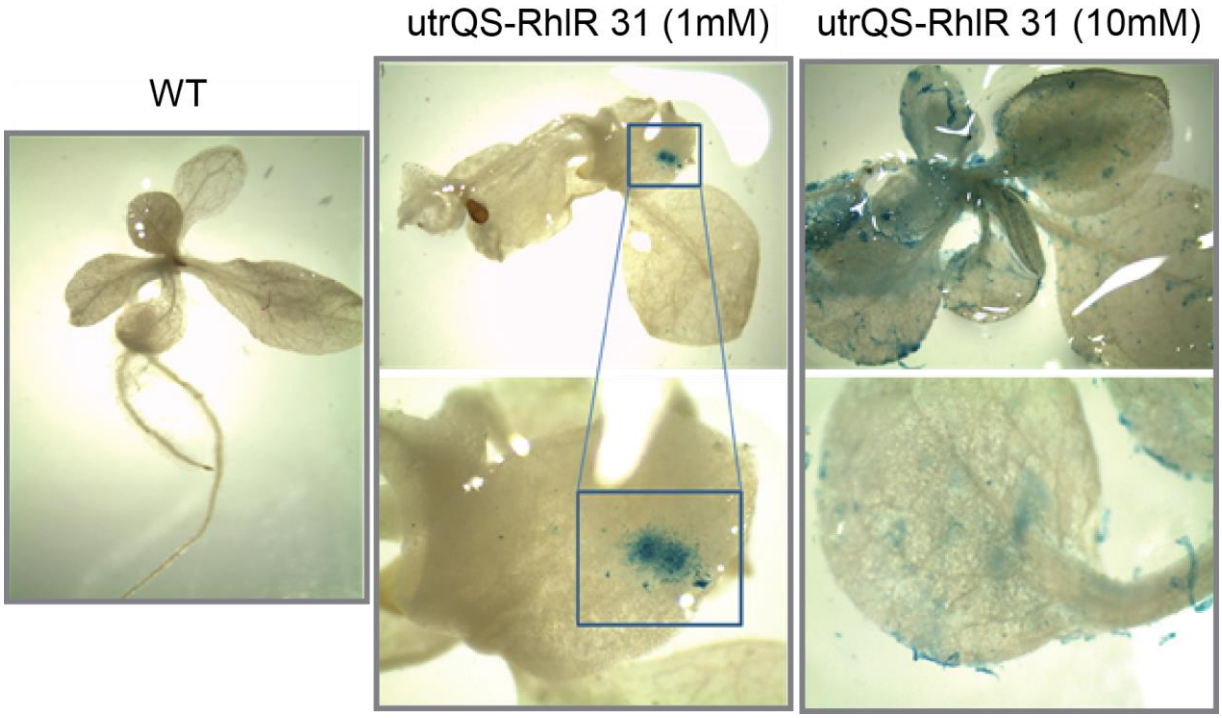

Figura 24. Inducibilidad del sistema mediante HSLs sintéticas.

Tabla 1. Resumen de los diferentes experimentos de inducción.

Experimento	Línea de planta	AHLs concentración	Visualización
Spray sobre plántulas *in vitro*	utrQS-RhlR 31 utrQS-LasR 44 utrQS-LasR 42	1 , 10 y 100µM de 30-C12-HSL y C4-HSL	Metodo histoquimico
Infiltración en hojas de plantas adultas	utrQS-RhlR 31 utrQS-LasR 44 utrQS-LasR 42 utrQS-LasR+RhlR 31	10mM 30-C12-HSL, 10mM C4-HSL y 20mM 30-C12-HSL+C4-HSL	
Infiltración en hojas de plántulas *in vitro*	utrQS-LasR+RhlR 31	14 µM de 30-C12-HSL+C4-HSL	
Induccion *in vitro* de machacado de hojas (evaluación 24 y 48hs)	utrQS-RhlR 31 utrQS-LasR 55 utrQS-LasR+RhlR 31	100µM 30-C12-HSL y C4-HSL	Metodo fluorométrico

En función de los resultados obtenidos, quisimos determinar si la falta de reproducibilidad en la inducción de la actividad β-glucuronidasa podría estar relacionada a una dificultad en el acceso de las AHLs al estroma del cloroplasto, dado que estas moléculas para poder ejercer su efecto deben traspasar eficientemente las distintas barreras físicas que se interponen entre el espacio extracelular y el estroma del cloroplasto. Para evaluar esta hipótesis, decidimos

generar nuevas construcciones genéticas con el objetivo de introducir al estroma plastídico las enzimas necesarias para sintetizar directamente en los cloroplastos las AHLs de interés.

7. Desarrollo de vectores para la producción de AHLs en cloroplastos

7.1 Antecedentes previos

La idea de modificar genéticamente plantas para que puedan sintetizar moléculas señales típicas del mecanismo de *Quorum sensing* de las bacterias, como son las AHLs, no es nueva. Rupert G. Fray y col (1999) demostraron que las sintasas de AHLs utilizan como sustrato dos moléculas de S-adenosil metionina (SAM) y la cadena acilo de la proteína transportadora de acilo (acil-PTA) Ambos sustratos se encuentran normalmente en los cloroplastos y participan en la síntesis de aminoácidos y de ácidos grasos. Por lo tanto, diseñaron un vector de transformación genética (genoma nuclear) que permitiera expresar la sintasa *YenI* (*Yersinia entero-colitica*) conteniendo un péptido de tránsito a cloroplastos; observaron la generación de *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserin lactona (3-oxo-C6-HSL) y *N*-hexanoil-L-homoserin lactona (C6-HSL) en las plantas transgénicas [88].

Para generar las nuevas construcciones genéticas, planteadas en el marco de esta tesis, que contengan las secuencias nucleotídicas correspondientes a las sintasas de AHL de nuestro interés, LasI y RhlI, decidimos utilizar el vector binario pEAQ-HT [99].

El vector pEAQ-HT posee los siguientes elementos genéticos (Figura 25):

- Supresor de silenciamiento (P19). Regulado por el promotor 35S y el terminador 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV).
- Secuencias 5´ y 3´ no traducibles 5´UTR y 3´UTR derivadas del *Cowpea Mosaic Virus* (CPMV), flanqueadas por el promotor 35S (p35S) del CaMV y el terminador del gen nopalina sintasa (tNOS).
- Etiqueta de poli-histidina (6xHis-tag), que puede incorporarse en el extremo N o C-terminal según se desee.
- Gen selector *nptII* (neomicina fosfotransferasa II), regulado por el promotor y terminador del gen nopalina sintasa
- Bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) delimitando el T-DNA.

Figura 25. Esquema del vector binario pEAQ-HT

7.2 Construcción de los vectores pEAQ-PT

Con el objetivo de expresar las sintasas LasI y RhlI que incluyeran un péptido de tránsito al estroma del cloroplasto, y con o sin etiqueta de histidinas (HisTag), se generaron los siguientes vectores: pEAQ-PT:LasI, pEAQ-PT:LasI-His, pEAQ-PT:RhlI y pEAQ-PT:RhlI-His. La etiqueta histidinas se incorporó para poder determinar la expresión de las sintasas LasI o RhlI mediante *western-blot* con anticuerpos anti-6xHis; sin embargo, al desconocer cómo puede afectar esta etiqueta a la función sintasa de las proteínas, decidimos generar en paralelo las versiones sin etiqueta.

Para el desarrollo de estos vectores fue necesario eliminar del vector pEAQ-HT la secuencia correspondiente a la proteína supresora de silenciamiento P19. Esto fue necesario ya que en ensayos preliminares de agroinfiltración realizados con este vector en plantas de *N. tabacum* cv Petit Havana, se observó la aparición de una respuesta hipersensible, atribuible a la presencia de la proteína P19 (Dr. Federico Alfano, comunicación personal) [100]. El Dr. Alfano modificó el vector en nuestro laboratorio de forma tal de eliminar la secuencia correspondiente al supresor P19. Para ello, cortó el plásmido con las enzimas de restricción BamHI y ScaI, y luego autoligó el vector digerido.

En resumen, pEAQ-PT:LasI, pEAQ-PT:LasI-His, pEAQ-PT:RhlI y pEAQ-PT:RhlI-His los vectores incluyen los siguientes elementos (Figura 26):

- Las secuencias codificantes correspondientes a RhlI y LasI, flanqueadas por las regiones 5´ y 3´ UTR del *Cucumber Mosaic Virus* y bajo el control transcripcional de promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador tNOS.
- En el extremo N-terminal del sitio de clonado para LasI y RhlI se incluyó la señal de direccionamiento a estroma de cloroplasto de la subunidad menor de RuBisCo 3C de *N. tabacum* cv. Petit Havana (PT).
- En el extremo C-terminal del sitio de clonado para LasI y RhlI, si corresponde, se encuentra la etiqueta de polihistidina.
- Gen *nptII*, confiere resistencia a kanamicina. Regulado por el promotor y terminador del gen de nopalina sintetasa.
- LB y RB son los bordes izquierdo y derecho del T-DNA.

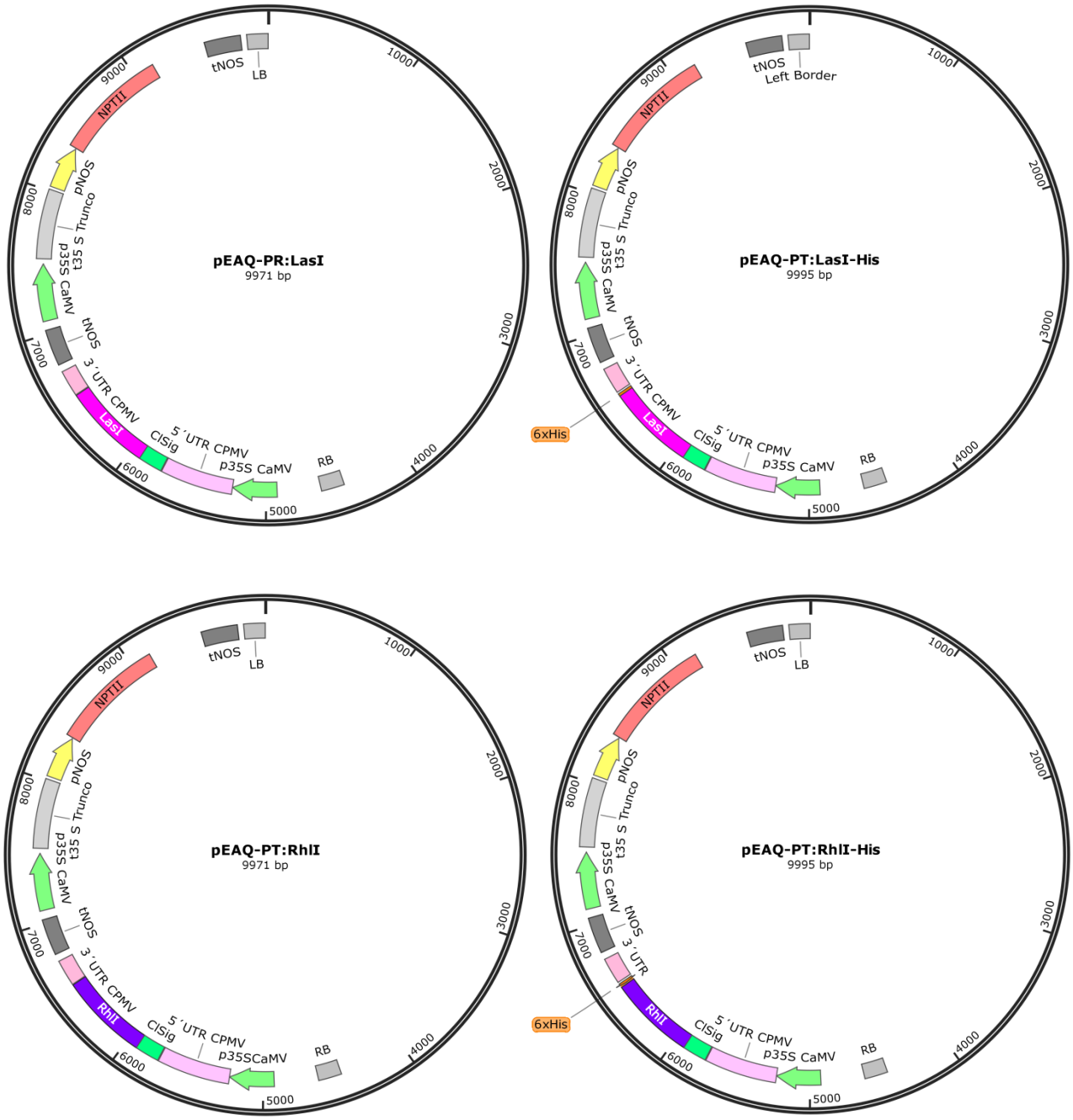

Figura 26. Esquema de los vectores binarios pEAQ-PT:LasI, pEAQ-PT:LasI-His, pEAQ-PT:RhlI y pEAQ-PT:RhlI-His.

7.2.1 Clonado de los distintos elementos para la construcción de los vectores pEAQ-PT

a) LasI y RhlI

Las secuencias correspondientes a las sintasas LasI y RhlI se obtuvieron mediante amplificación por PCR a partir del genoma de *P. aeruginosa*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos LasI Fw y LasI Rv_XhoI, o LasI Fw y LasI Rv_XmaI, para obtener los insertos necesarios para generar las construcciones pEAQ-PT:LasI o pEAQ-PT:LasI-His, respectivamente. De forma análoga, pero utilizando los oligonucleótidos correspondientes para amplificar RhlI (RhlI Fw y RhlI Rv_XhoI, o RhlI Fw y RhlI Rv_XmaI), se amplificaron los insertos necesarios para generar los vectores pEAQ-PT:RhlI o pEAQ-PT:RhlI-His, respectivamente. Esto introduce un sitio SphI en cada producto final de PCR. El sitio SphI del iniciador LasI Fw y RhlI Fw contiene la metionina iniciadora (ATG) y se superpone al segundo codón. Dando como resultado que el segundo amino acido de las proteínas maduras LasI y RhlI contengan un cambio de isoleucina por leucina en esa posición. Se encuentra reportado que este cambio no afecta la capacidad de sintetizar de 3O-C12-HSL por parte de la proteína LasI [90]. Además, para obtener las construcciones que poseen una etiqueta de histidinas, se eliminó el codón de terminación (TGA) de las secuencias de las sintasas endógenas de *P. aeruginosa*.

b) Péptido de transito (PT)

El clonado de este elemento fue llevado a cabo en el laboratorio por el Dr. Federico Alfano. La secuencia del péptido de direccionamiento a cloroplastos de la subunidad menor de RuBisCO fue amplificada por la técnica de PCR utilizando los oligonucleotidos específicos Clsig_Fw y Clsig_Rv, adicionándose los sitios de restricción NruI y SphI.

7.2.2 Construcción de los vectores pEAQ-PT:LasI y pEAQ-PT:RhlI

Para obtener el vector final pEAQ-PT:LasI, se digirió el plásmido pEAQ-HT (sin supresor de silenciamiento P19) con las enzimas NruI y XhoI. Luego se realizó una ligación triple con este vector digerido, el péptido de transito obtenido por corte con las enzimas NruI-SphI y el fragmento de PCR que conteniene la secuencia correspondiente a la sintasa LasI, previamente cortado con las enzimas SphI-XhoI. Un procedimiento similar se siguió para construir el vector pEAQ-PT:RhlI (Figura 27A).

7.2.3 Construcción de los vectores pEAQ-PT:LasI-His y pEAQ-PT:RhlI-His

Para realizar las construcciones que contienen la etiqueta de histidinas, pEAQ-PT:LasI-His y pEAQ-PT:RhlI-His se utilizó una estrategia similar a la mencionada anteriormente. Se utilizó la misma estrategia de ligación triple incluyendo al vector pEAQ-PT sin supresor de silenciamiento (P19) tratado con las enzimas NruI y XmaI, al péptido señal obtenido mediante corte con las enzimas NruI-SphI, y a los fragmentos de PCR correspondientes a la sintasa LasI o RhlI digeridos con las enzimas SphI-XmaI (Figura 27B).

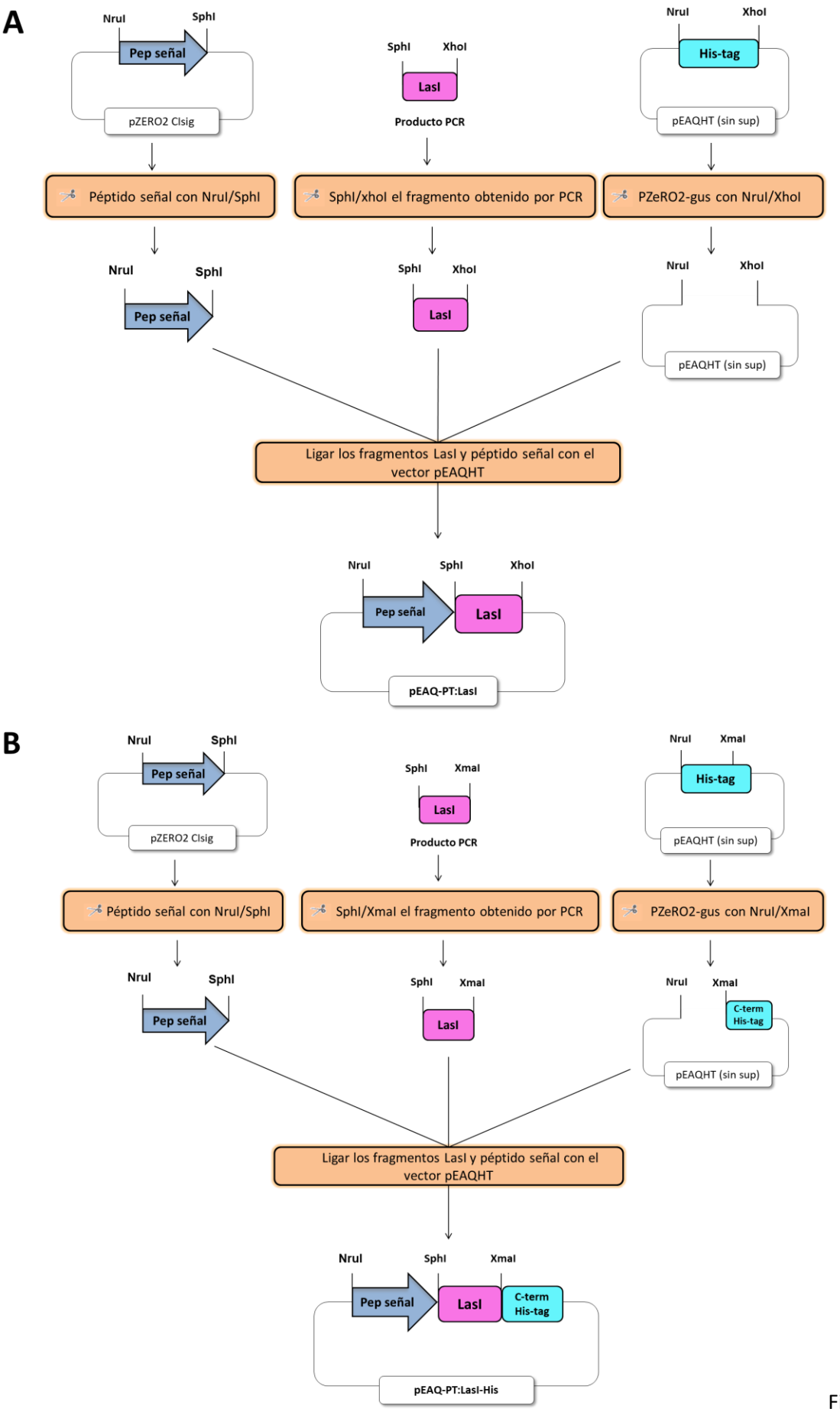
A
NruI
SphI
Pep señal
pZERO2 ClSig
SphI
XhoI
LasI
Producto PCR
NruI
XhoI
His-tag
pEAQHT (sin sup)
Péptido señal con NruI/SphI
SphI/xhoI el fragmento obtenido por PCR
PZeRO2-gus con NruI/XhoI
NruI
SphI
Pep señal
SphI
XhoI
LasI
NruI
XhoI
pEAQHT (sin sup)
Ligar los fragmentos LasI y péptido señal con el vector pEAQHT
NruI
SphI
XhoI
Pep señal
LasI
pEAQ-PT:LasI
B
NruI
SphI
Pep señal
pZERO2 ClSig
SphI
XmaI
LasI
Producto PCR
NruI
XmaI
His-tag
pEAQHT (sin sup)
Péptido señal con NruI/SphI
SphI/XmaI el fragmento obtenido por PCR
PZeRO2-gus con NruI/XmaI
NruI
SphI
Pep señal
SphI
XmaI
LasI
NruI
XmaI
C-term His-tag
pEAQHT (sin sup)
Ligar los fragmentos LasI y péptido señal con el vector pEAQHT
NruI
SphI
XmaI
Pep señal
LasI
C-term His-tag
pEAQ-PT:LasI-His

Figura 27

Figura 27. Esquema de clonado empleado para generar los vectores binarios. A) Estrategia para obtener los vectores **pEAQ-PT:RhlI y pEAQ-PT:LasI**. **B)** Estrategia para obtener los vectores **pEAQ-PT:LasI-His y pEAQ-PT:RhlI-His**. Se esquematiza a modo de ejemplo el clonado correspondiente a la sintasa LasI, de igual forma se realizó el clonado con la sintasa RhlI.

7.3 Análisis de la funcionalidad de los vectores mediante expresión transitoria y *western blot*

La correcta expresión de las sintasas LasI y RhlI se analizó mediante ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración de hojas jóvenes de *N. benthamiana.* Se infiltraron hojas de tabaco con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 transformada con los vectores binarios pEAQ-PT:LasI-His y pEAQ-PT:RhlI-His, y como control negativo se empleó la cepa transformada con el plásmido pEAQ-HT sin supresor (P19), evaluando dos densidades ópticas (DO) (0,3 ó 0,6). Mediante la técnica de *western blot*, utilizando un anticuerpo que reconoce la etiqueta de histidinas, se pudo comprobar la expresión de las sintasas (Figura 28). Según se observa en la Figura 28, es posible detectar la presencia de dos bandas específicas en el *western blot*: la banda de mayor peso molecular observada para pEAQ-PT:LasI-His coincide con el peso molecular esperado para la sintasa LasI cuyo péptido de tránsito fue removido luego de la translocación al estroma de los cloroplastos. La de menor peso molecular que se observa en la construcción pEAQ-PT:RhlI-His correspondería a la sintasa RhlI cuyo péptido de tránsito fue removido luego de la translocación, sin embargo posee un tamaño menor al esperado. Se utilizó un predictor bioinformático de presencia de péptidos de transito a cloroplasto (http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/) el cual predijo un sitio de procesamiento de unos 14 aa rio arriba del sitio esperado, este dato podría explicar la diferencia de tamaño observada.

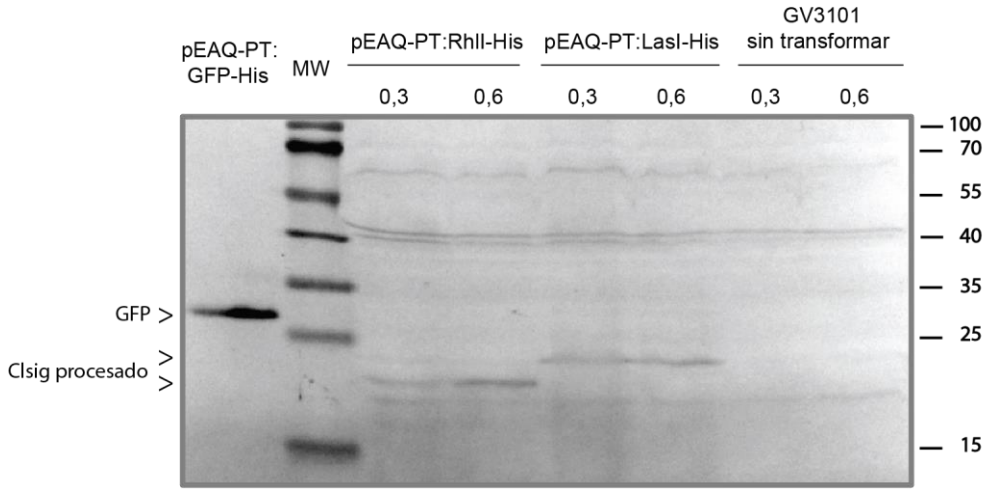

Figura 28. Caracterización por *western blot* de las plantas agroinfiltradas. Extractos de proteínas totales de *N. benthamiana* de la zona agroinfiltrada con los vectores pEAQ-PT:LasI-His y pEAQ-PT:RhlI-His, fueron separados en un gel de poliacrilamida 12%. Las membranas obtenidas luego de la transferencia se revelaron con anticuerpos policlonales anti-His *Tag*. Como control positivo se sembraron extractos de proteínas obtenidas de plantas agroinfiltradas con el vector pEAQ-PT:GFP-His y como control negativo plantas agroinfiltradas con GV031 sin transformar. MW: marcador de peso molecular *Pageruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) expresado en kDa.

Con las construcciones generadas, que fueron validadas en los ensayos anteriores, se realizaron ensayos de expresión transitoria mediante agroinfiltración de las plantas transplastómicas obtenidas con las construcciones utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR. Sin embargo, este ensayo posee dos desventajas, no contamos con supresores del silenciamiento eficientes para *N. tabacum* cv. Petit Havana SR-1 y además, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 produce AHLs que son reconocidas por las cepas indicadoras. Por estos motivos, es difícil evaluar la expresión del sistema mediante esta técnica.

7.4 Obtención de plantas transgénicas nucleares con los genes de sintasas de AHLs (LasI y RhlI)

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió realizar ensayos de transformación genética con el objetivo de obtener plantas transgénicas (transformadas a nivel de su genoma nuclear) que pudieran producir establemente las AHLs. La obtención de las líneas transgénicas se realizó mediante la técnica de transformación mediada por *A. tumefaciens,* utilizando cepas transformadas con los vectores binarios generados previamente, y como explantos, hojas de

plantas *wild-type* o de las plantas transplastómicas obtenidas con las construcciones utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR. Los brotes regenerados en selección fueron analizados por PCR utilizando los oligonucleótidos LasI Fw y LasI Rv_XhoI para la construcción pEAQ-PT:LasI, y RhlI Fw, y RhlI Rv_XhoI para la construcción pEAQ-PT:RhlI. En la Figura 29 se muestra el resultado de las reacciones de PCR para algunas de las plantas obtenidas. Según se resume en la Tabla 2, como resultado de la transformación, obtuvimos plantas transgénicas con las construcciones pEAQ-PT:LasI, pEAQ-PT:RhlI, y con ambas combinadas, sobre los distintos fondos genéticos (plantas *wild-type* o plantas transplastómicas)

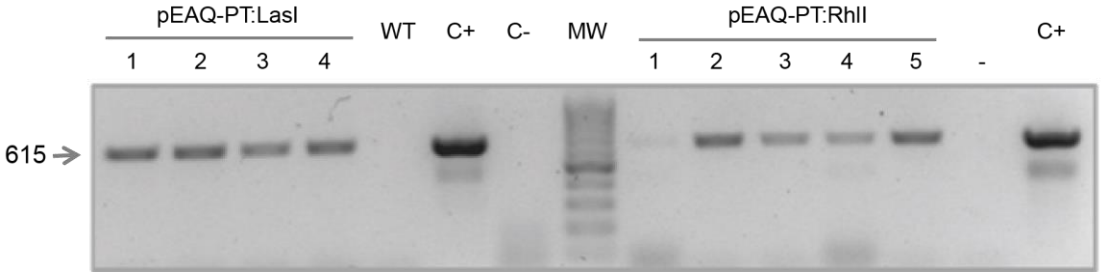

Figura 29. Caracterización de las plantas transgénicas nucleares por PCR. ADN purificado de las distintas líneas transgénicas se utilizó como molde en una reacción de PCR con los oligonucleótidos iniciadores LasI Fw y LasI Rv_XhoI para la construcción pEAQ-PT:LasI y RhlI Fw y RhlI Rv_XhoI para la construcción pEAQ-PT:RhlI. C+: se utilizó como molde para la PCR el plásmido pEAQ-PT:LasI y pEAQ-PT:RhlI. Wt: Planta sin transformar. C-: H2O. MW: marcador de peso molecular 100 bp.

Tabla 2. Resumen de las plantas obtenidas con cada una de las construcciones

Material transformado	Construcción	Abreviatura de las plantas obtenidas	Número de plantas
Wild type	pEAQ-PT:LasI	Wt/ Nc L	3
	pEAQ-PT:RhlI	Wt/ Nc R	3
	pEAQ-PT:LasI + pEAQ-PT:RhlI	Wt/ Nc LR	3
utrQS-RhlR 31	pEAQ-PT:RhlI	Pt R31/ Nc R	8
utrQS-LasR 42	pEAQ-PT:LasI	Pt L42/ Nc L	6
utrQS-LasR 44	pEAQ-PT:LasI	Pt L44/ Nc L	2
utrQS-LasR+RhlR 31	pEAQ-PT:LasI + pEAQ-PT:RhlI	Pt LR/ Nc LR	4

7.5 Evaluación funcional de las plantas transgénicas obtenidas mediante el uso de cepas indicadoras

Utilizando cepas indicadoras, evaluamos la producción de las moléculas señales (AHLs) en las plantas transgénicas generadas. Se colocaron en placas de Petri preparadas para cada ensayo, porciones de hojas de plantas transgénicas o *wild-type* (como control positivo se incluyó una alícuota de un cultivo de la cepa MPAO1 productora de AHLs). Para las plantas transformadas con el vector pEAQ-PT:LasI, productoras de 3O-C12-HSLs, se realizó la detección con la cepa indicadora *Chromobacterium violaceum* (en formato de estría). Como se observa en la Figura 30A, varias plantas transgénicas inducen en la bacteria indicadora la producción de violeceína, lo que indica que se está sintetizando correctamente la proteína sintasa, y como consecuencia la AHL correspondiente, que está siendo reconocida a su vez por *C. violaceum*. Para las plantas transformadas con el vector pEAQ-PT:RhlI, productoras de C4-HSLs, se realizó la detección con la cepa indicadora NTL4/pZLR4 (incorporada en forma de *top* agar). En la Figura 30B se muestra que las plantas transgénicas generan una respuesta positiva de la cepa indicadora; sin embargo, las muestras de plantas *wild-type* también generaron una respuesta positiva (levemente menos intensa) por parte del biosensor, dificultando determinar mediante esta cepa indicadora la producción exitosa de AHLs en las plantas transgénicas.

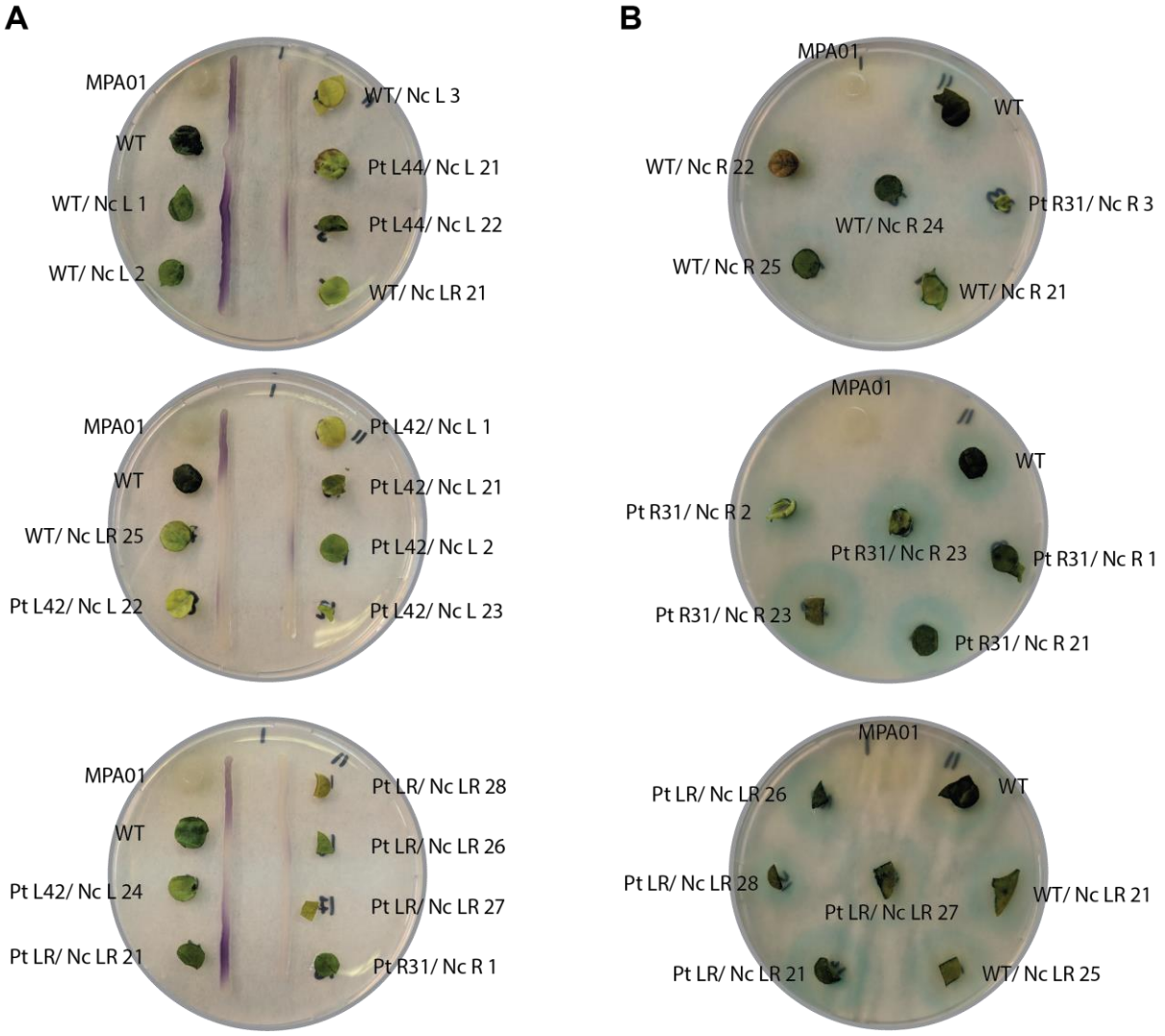

Figura 30. Evaluación de la síntesis de AHLs en las plantas transgénicas. Se analizaron las plantas transformadas con las construcciones pEAQ-PT:RhlI y pEAQ-PT:LasI; como control negativo se utilizaron plantas sin transformar (WT) y como control positivo 5 µl de un cultivo saturado de MPAO1. **A)** Se realizaron dos estrías verticales con *C. Violaceum* y aproximadamente a 5mm de distancia se colocaron los fragmentos de hojas o las bacterias. **B)** Sobre el *top* agar conteniendo la cepa indicadora NTL4/pZLR4 se colocaron los fragmentos de hojas o las bacterias controles.

7.6 Evaluación de la expresión de las proteínas LasR y RhlR en presencia de AHLs

Con el objetivo de evaluar si la presencia de las AHLs en las plantas transplastómicas altera la estabilidad o la integridad de las proteínas LasR y RhlR, realizamos ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos específicos. Como se observa en la Figura 31, en las plantas transplastómicas que poseen su genoma nuclear transformado para la expresión de las sintasas, se visualizó la presencia de las proteínas LasR y/o RhlR (según corresponda), y además se detectó una banda de menor peso molecular (aproximadamente 20 kDa, marcada

con un asterisco (*) en aquellas plantas que expresan las sintasas de AHLs. También, en algunas líneas de plantas se observa una banda diferencial de 50kDa que podría corresponder al dímero del complejo LasR:3O-C12-HSLs o RhlR:C4-HSLs.

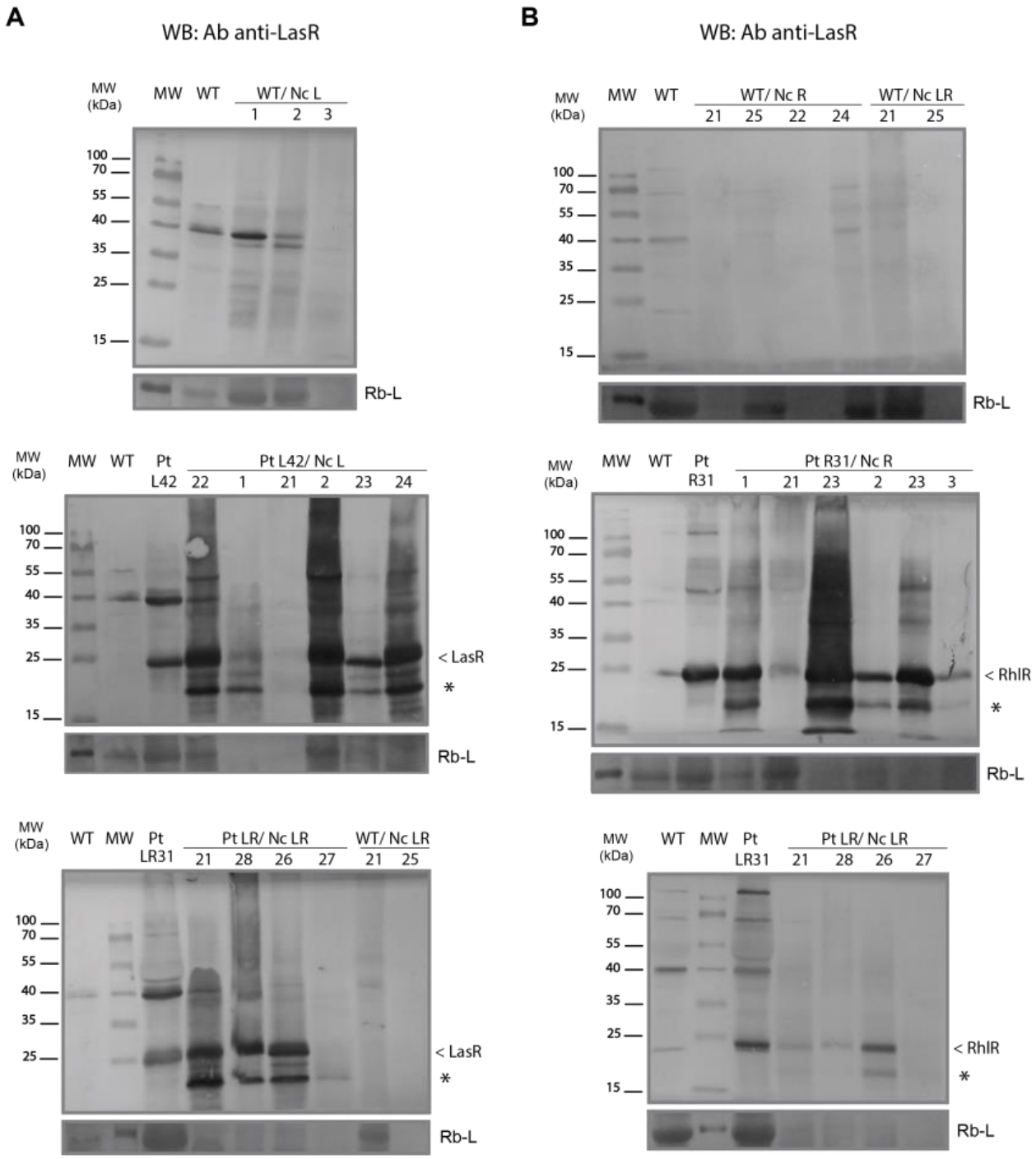

Figura 31. Analisis de la expresión de las proteínas LasR y RhlR en presencia de AHLs. A). *Western blot* de proteínas totales de las plantas transformadas con el vector pEAQ-PT:LasI revelado con anticuerpos anti-LasR **B)** *Western blot* de proteínas totales de las plantas transformadas con el vector pEAQ-PT:RhlI revelado con anticuerpos anti-RhlR

Por último, evaluamos si el sistema se encontraba inducido mediante un ensayo histoquímico para determinar la expresión de *uidA*. Desafortunadamente no se pudo visualizar actividad β-glucuronidasa en las plantas transgenicas que poseen los reguladores transcripcionales LasR y RhlR. Una posible explicación de este resultado es que la presencia de AHLs induzca en asociación a sus proteínas regulatorias la transcripción a partir del pLasB, generándose un transcripto aberrante que no se traduzca correctamente. Otra posibilidad es que el entorno del cloroplasto no resulte adecuado para que los elementos del sistema propuesto funcionen correctamente y permitan en presencia de AHLs una transcripción eficiente a partir del pLasB.

En función de los resultados presentados, debemos realizar nuevos experimentos para determinar las causas de la ausencia de actividad β-glucuronidasa en las plantas transplastómicas inducidas.

Parte B

Obtención de cultivos resistentes a patógenos

Introducción

1. Estrategias para el control de enfermedades

Una de las estrategias más utilizadas para desarrollar plantas resistentes a patógenos mediante ingeniera genética, consiste en la sobreexpresión de proteínas que presentan actividad anti-microbiana.

Las proteínas PRs se descubrieron por primera vez en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV), luego se encontraron en un gran número de familias de plantas frente a la infección por oomicetes, hongos, bacterias, virus y viroides, así como nematodos e insectos [101]. Estas proteínas comprenden un grupo funcionalmente diverso y se acumulan rápidamente en respuesta al ataque de patógenos. Se encuentra reportado que el ARNm correspondiente a las proteínas PR se acumula en minutos u horas posteriores a la inducción de PTI y ETI, siendo la expresión de la mayoría de ellas regulada por SA [102, 103]. En las hojas, las PR pueden encontrarse en diferentes localizaciones, tanto en las células epidérmicas como las células del mesófilo, así como en los haces vasculares. Muchas proteínas relacionadas con la defensa contienen en su secuencia aminoacídica un péptido señal N-terminal que determina su translocación al retículo endoplasmático, y posterior secreción hacia el apoplasto. Otras proteínas tienen señales adicionales que especifican su localización en la vacuola.

Hasta la fecha, se han descrito diecisiete familias de proteínas PR (PR-1 a PR-17) en la mayoría de las especies de plantas [104, 105]. El rol de varias de estas familias se basa en interferir con la actividad, el crecimiento y la propagación de los patógenos. Existen familias cuya actividad es de gran importancia para la defensa de las plantas frente a hongos, como ser la familia PR-2 compuesta por proteínas β-1,3-endoglucanasas, la familia PR-5 que incluye a las proteínas tipo osmotinas y taumatinas, y las PR-3, -4, -8, -11 cuyos miembros presentan actividad endoquitinasa. Las quitinasas, así como los inhibidores de proteinasas (PR-6), también podrían contribuir a la defensa frente a los nematodos y a insectos herbívoros. Los miembros de la familia PR-8 poseen actividad lisozima, que los convierte en potenciales antibacterianos, mientras que las defensinas (PR-12) [106, 107] y tioninas (PR-13) [108, 109] presentan actividades antibacterianas y antifúngicas. Es decir, las proteínas PR son capaces de afectar directamente la integridad del patógeno; sin embargo, se ha demostrado que a través de su actividad enzimática podrían generar moléculas señal que actúan como elicitores para inducir otras vías relacionadas con la defensa de las plantas [102, 103].

Las β-1,3-glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en plantas y están implicadas en procesos de desarrollo y en otros procesos metabólicos relacionados a respuestas a estrés e infección por microorganismos patógenos. Debido a su capacidad para hidrolizar β-1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias, han sido

designadas como proteínas relacionadas a la patogénesis, pertenecientes a la familia 2 (PR-2). Las glucanasas pueden clasificarse según su localización, diferenciándolas en glucanasas de clase I que son proteínas básicas localizadas en las vacuolas de las células vegetales, cuya expresión es constitutiva y aumenta fuertemente en respuesta a la infección por patógenos, y glucanasas de clase II y clase III que son proteínas acidas que se secretan y se acumulan en el espacio extracelular, siendo su expresión dependiente de distintos tipos de estrés [110].

La β-1,3-glucanasa codificada por el gen *gn2* [111] (UniProtKB/Swiss-Prot P23546) es una glucano-endo-1,3-beta-D-glucosidasa de clase I capaz de hidrolizar uniones del tipo β-1,3-D-glucosídicas presentes en los β-1,3-D-glucanos (rompe enlaces internos dando lugar a oligómeros de dos, tres o más unidades). Si bien se expresa inicialmente en las células epidérmicas de plantas sanas, la presencia de etileno induce su acumulación en las células del mesófilo. También se ha descripto su acumulación en las raíces y en los órganos florales [29, 112, 113]. La isoforma vacuolar de la β-1,3-glucanasa se sintetiza como una proteína de 370 aa con una péptido señal en la región N-terminal de 32 aa y una extensión C-terminal de 22 residuos (que no está presente en la proteína madura) que contiene una señal de localización a vacuola y un sitio putativo de N-glicosilación. La proteína madura resultante posee 316 aa.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que las β-1,3-glucanasas limitan el crecimiento fúngico de forma directa a través de la degradación de los glucanos de las paredes celulares de patógenos fúngicos invasores [114]. Sin embargo, también pueden actuar indirectamente provocando la liberación de compuestos derivados de la pared celular que actúan como elicitores induciendo respuestas de defensa [115, 116]. Sus productos enzimáticos, los β-1,3 glucanos, son considerados DAMP y se sabe que son elicitores capaces de interferir en la red de señalización de defensa de las plantas (Figura 32).

Otra familia de proteínas relacionadas a la patogénesis que exhiben propiedades de defensa contra un amplio rango de patógenos fúngicos es la familia PR-5. La familia PR-5 se encuentra integrada por proteínas que presentan funciones en el desarrollo [113, 117, 118], que protegen a la célula vegetal frente a estrés osmótico [119-121] y frente a las bajas temperaturas [122, 123].

Dentro de este grupo, se ha identificado una proteína básica de 24kDa denominada AP24. Esta osmotina de tabaco presenta una función dual ya que está involucrada en respuestas a estrés osmótico y al ataque de hongos y oomicetes [118, 124, 125]. AP24 (UniProtKB-P14170) es una proteína de origen vacuolar de 246 aa, que luego es procesada en una proteína madura de 225 aa cuya estructura terciaria está determinada por 8 puentes disulfuro.

Esta proteína presenta altos niveles de expresión en las raíces y flores, aumentando los mismos frente a estímulos como el estrés salino, el ácido abscísico (ABA), el daño mecánico y la infección por patógenos [102, 113, 126, 127]. Se ha demostrado la actividad antifúngica de AP24 en ensayos *in vitro*, en donde se observó que la osmotina purificada causa lisis de los esporangios e inhibición del crecimiento de *Phytophthora infestans* [128].

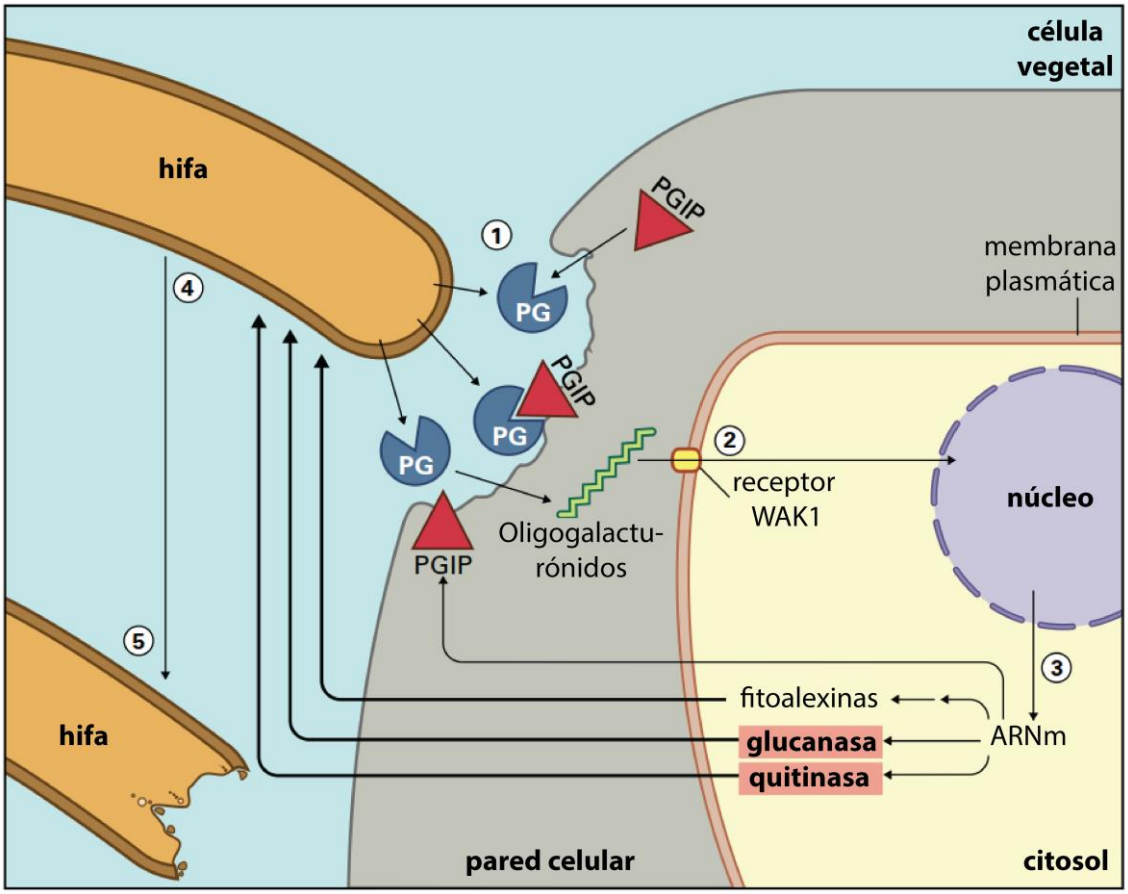

Figura 32. Modelo PG-PGIP. (1) Las poligalacturonasas (PG) secretadas por las hifas fúngicas interactúan con las proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa (PGIP) en la pared celular de la planta. (2) Las PG liberadas de la pared celular de la planta generan oligogalacturónidos que interactúan con el receptor de la planta de oligogalacturónidos (en Arabidopsis es el receptor WAK1). (3) La transducción de la señal de oligogalacturonidos da como resultado la expresión de proteínas de defensa de las plantas, incluidos los PGIP. (4) las quitinasas, glucanasas y fitoalexinas son secretadas por la planta y (5) dañan las hifas fúngicas. Adaptado de Buchanan, 2015.

2. Mejoramiento de cultivos mediante la expresión de péptidos antimicrobianos

Una de las características deseables a la hora de obtener cultivos de variedades resistentes a enfermedades es que la resistencia sea duradera en el tiempo. Desde hace décadas, se han llevado a cabo estrategias de transferencia de resistencias monogénicas a cultivos de interés agronómico a partir de sus parientes silvestres. Si bien esta estrategia es de gran utilidad para obtener variedades resistentes en el campo, su duración suele ser limitada en el tiempo dada la

alta presión de selección que se ejerce sobre la población del patógenos favoreciendo la aparición de cepas resistentes [129-131]. El apilamiento de genes de resistencia (R) puede ayudar a superar esta limitación, pero incluso con el uso de la selección asistida por marcadores moleculares, esta estrategia impone dificultades, particularmente para especies poliploides y/o las que se reproducen por propagación clonal, junto con la limitación del descubrimiento de nuevos genes R en especies sexualmente compatibles [130]. La ingeniería genética proporciona una poderosa herramienta para superar muchas de las limitaciones de las estrategias de mejoramiento clásico. En general, las estrategias que involucren el desarrollo de plantas transgénicas que combinen la expresión de dos o más proteínas antimicrobianas, incluidas las proteínas PR, en un cultivo específico debería proporcionar un control de la enfermedad más amplio y más eficaz que la estrategia de un solo gen [15, 35, 132, 133]. Se han obtenido numerosos desarrollos de plantas transgénicas en los que se han logrado diferentes grados de protección contra hongos y oomicetes. Sin embargo, en muchos casos los niveles de resistencia asociados fueron insuficientes [134]. Por otro lado, la expresión constitutiva de proteínas PR puede dar como resultado indeseable un fenotipo denominado *lession-mimic* (es decir, la formación espontánea de lesiones que se asemejan a lesiones de respuesta hipersensible (HR) en ausencia de un patógeno) [51, 135, 136].

La transformación del genoma plastídico (plastoma) permitiría superar estas limitaciones ya que esta metodología alternativa permite alcanzar mayores niveles de acumulación de proteínas heterólogas que a su vez estarán confinadas en el cloroplasto [41, 46]. Con respecto a la resistencia al estrés biótico, se han desarrollado plantas transplastómicas resistentes a insectos mediante la acumulación en sus plástidos de ARN doble cadena largo [45, 137, 138]. En la literatura se encuentran reportados resultados prometedores para generar resistencia a patógenos fúngicos. Entre ellos, se incluyen la transformación del genoma del cloroplasto para acumular MSI-99 (un péptido antimicrobiano sintético) [50, 139] y para expresar cloroperoxidasa de *Pseudomonas pyrrocinia* [140]; en ambos casos se observa una fuerte inhibición de la germinación y/o crecimiento de las esporas de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* y *Verticillium dahlia* (ensayos *in vitro*) y la limitación en el tamaño de la lesión después de la inoculación de plantas transplastómicas con *Alternaria alternata* [140] o *Colletotrichum destructivum* [50]. Hasta la fecha, no hay publicaciones que demuestren si la transformación de plástidos es una estrategia adecuada para controlar oomicetes, un grupo filogenético que incluye *Phytophthora* sp., uno de los géneros más destructivos cuyas especies miembro pueden causar graves pérdidas económicas en cultivos en todo el mundo, así como daño en los ecosistemas naturales.

Objetivo general

El Objetivo General de esta sección de la Tesis fue evaluar la efectividad de expresar en plástidos de tabaco proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) como estrategia para obtener plantas resistentes a diversos patógenos. Para ello nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

a) Caracterizar molecularmente plantas transplastómicas de *N. tabacum* transformadas con la construcción utrAP24+Gluc, que permite expresar las proteínas de tabaco β-1,3-glucanasa y la osmotina AP24 en el estroma de cloroplastos.

b) Desafiar con patógenos las plantas transplastómicas de tabaco.

c) De resultar exitosos los ensayos de infección del punto b) transformar plantas de *S. tuberosum* var. Desireé a nivel del genoma plastídico con la construcción utrAP24+Gluc.

Parte B

Obtención de cultivos resistentes a patógenos

Resultados

1. Resultados previos al inicio de la tesis

Previamente en nuestro grupo, la Dra. María Eugenia Segretin [39] desarrolló plantas transplastómicas de tabaco transformadas con distintos genes correspondientes a proteínas con actividad antimicrobiana. Seleccionamos para caracterizar molecular y funcionalmente, plantas obtenidas con la construcción denominada putrAP24-Gluc, que contiene las secuencias codificantes correspondiente a las proteínas relacionadas a la patogénesis (o PR), AP24 (osmotina perteneciente a la familia de proteínas PR-5) y β-1,3-glucanasa (pertenece a la familia de proteínas PR-2), ambas secuencias de *N. tabacum*.

El vector utrAP24-Gluc posee los siguientes elementos genéticos (Figura 33):

- Secuencias correspondientes a los genes plastídicos *16S* y *trnI/A* que permiten la integración de los transgenes por recombinación homóloga en la región intergénica correspondiente.
- El promotor P*rrn* del operón de genes de los ARNs ribosomales plastídicos.
- El gen selector *aadA*.
- Las secuencias codificantes correspondientes a las proteínas AP24 (UniProtKB/Swiss-Prot P14170) y β-1,3- glucanasa (UniProtKB/Swiss-Prot P23546), organizadas en forma de policistrón. Para la expresión del segundo cistrón (β-1,3- glucanasa), se incorporó la región 5´ no traducible (5´UTR) del gen 10 del fago T7, que aporta la secuencia RBS en un entorno favorable para la iniciación de la traducción en plástidos [141].
- Secuencia promotora y 5' no traducible (UTR) del gen plastídico *psbA*, regulando la expresión de las secuencias subclonadas río abajo.
- Terminador del gen *rps16* (Trps16).

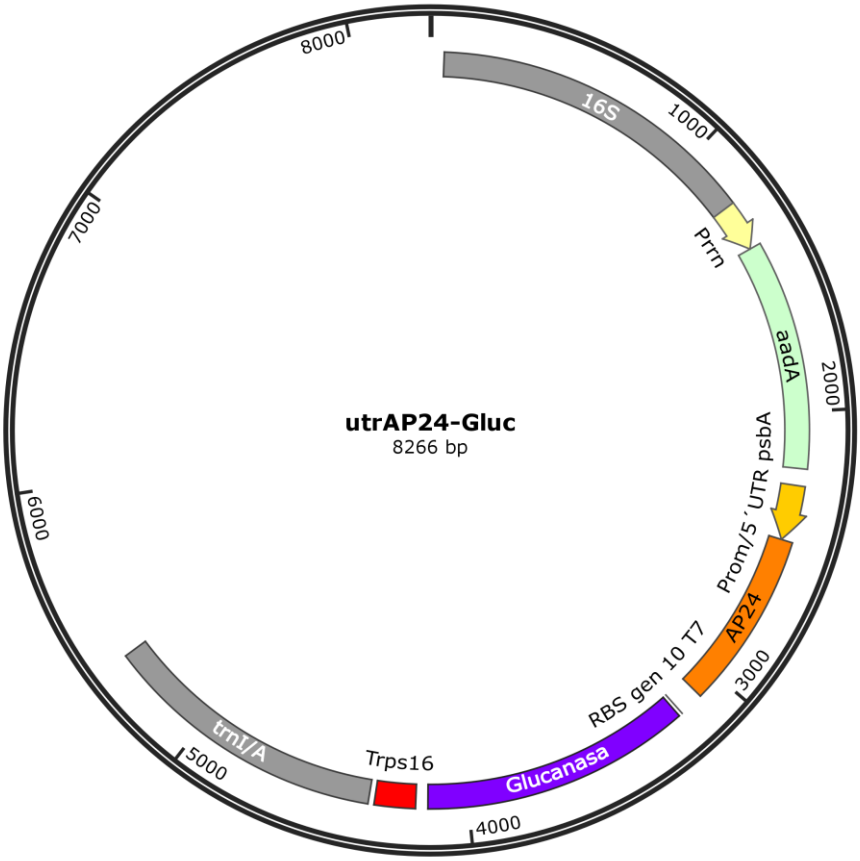

Figura 33. Esquema del vector UTR AP24/Glucanasa utilizado para la transformación de plástidos.

2. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas de *N. tabacum* obtenidas con la construcción utrAP24-Gluc.

2.1. Analisis de la integración del transgen

Confirmamos la naturaleza transplastómica de las plantas regeneradas en presencia del agente selector espectinomicina mediante la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos Fw (Fw2) y Rev (Rv2) mostrados en la Figura 34A. Obtuvimos tres líneas independientes, utrAP24-Gluc 2, 6 y 7, que mostraron la integración del constructo en la ubicación deseada en el genoma plastídico (Figura 34B). Se realizó una nueva reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores aadA-UTR Fw (Fw1) y TrnI-gen Rev (Rv1) que hibridan sobre la región 3' de la secuencia *aadA* y en el gen *TrnI,* respectivamente (Figura 34A). En las plantas utrAP24-Gluc 2 y 6 se amplificó un fragmento del tamaño esperado, mientras que para la línea utrAP24-Gluc 7

se obtuvo un fragmento de menor tamaño. En ambas PCR, se utilizó como control negativo una reacción conteniendo ADN total de una planta sin transformar (Figura 34B).

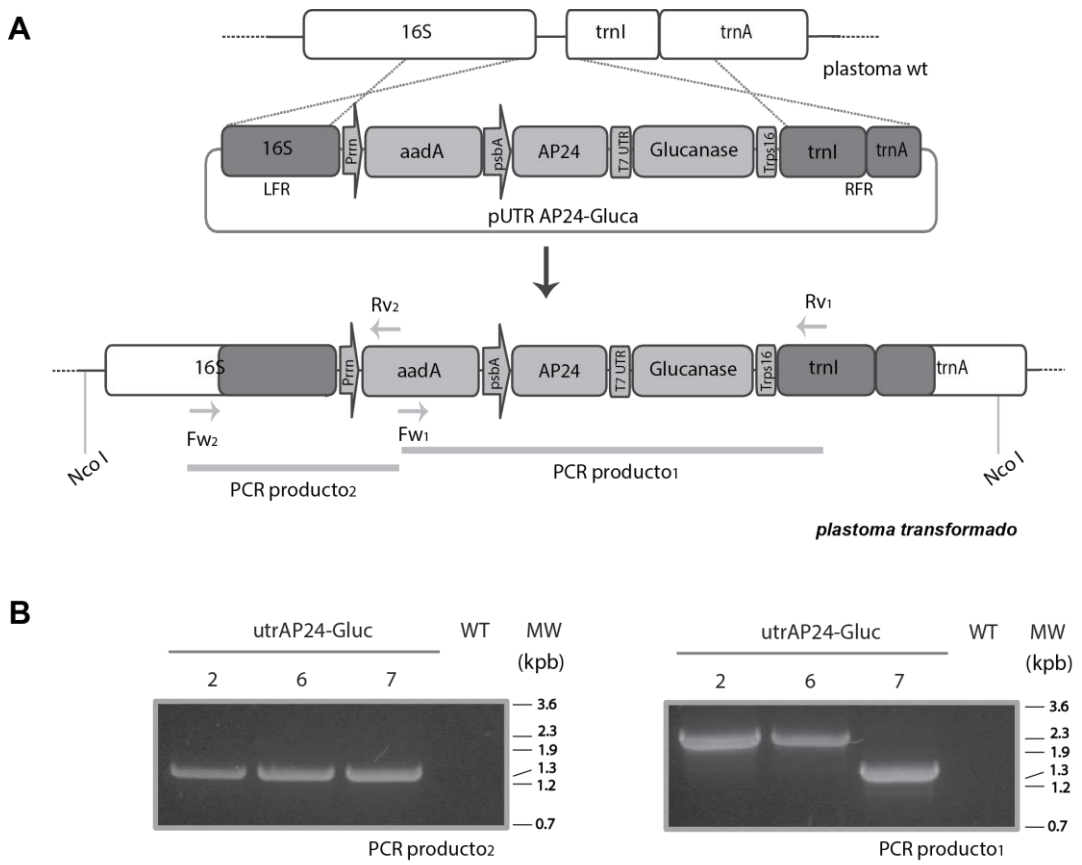

Figura 34. Caracterización de las líneas transplastómicas por PCR. A) Esquema del sitio de integración en el genoma plastídico, del vector de transformación y de la región del genoma modificado luego de la integración por recombinación homóloga. Se muestran en la figura los oligonucleótidos utilizados para dos reacciones de PCR que permiten amplificar un fragmento de 1450 pb solo en las plantas transplastómicas (utilizando los oligonucleótidos Fw2 y Rv2) y un fragmento de 2440 pb solo en las plantas transplastómicas (utilizando los oligonucleótidos Fw1 y Rv1). **B)** Análisis de PCR para confirmar la integración del vector recombinante en el plastoma *wild-type*, usando los oligonucleótidos iniciadores Fw2 y Rv2 (izquierda) y Fw1 y Rv1 (derecha). MW: marcador de peso molecular Lambda BstEII.

2.2. Análisis del estado homoplástico

La integración de los genes de interés en el genoma plastídico se evaluó mediante la técnica de *Southern blot*. 3 µg del ADN total extraído de hojas de las plantas transformadas y de controles sin transformar, fue cortado con la enzima de restricción NcoI que reconoce dos sitios de corte que flanquean al sitio de inserción, posicionados uno río arriba de la región de recombinación izquierda (*16S*) y el otro río abajo de la región de recombinación derecha (*trnI* y

trnA), respectivamente (Figura 35A). La presencia del transgén se detectó por hibridación con una sonda específica diseñada sobre las secuencias *trnI/A*. Como se observa en la Figura 30B, se detectó una banda específica de 9,6 kpb en las plantas utrAP24-Gluc 2 y 6, indicando que la integración ocurrió en el sitio esperado. Sin embargo, y de acuerdo a lo observado en la Figura 29B, en las plantas utrAP24-Gluc 7 se detectó una banda de menor tamaño al esperado. Mediante esta técnica, además, es posible evaluar el estado heteroplástico/homoplástico de las plantas. Se comprobó la homoplastía de las plantas transplastómicas, ya que se puede observar bandas de 9,6 kpb y ausencia de una banda de 6,4 kpb que corresponde a las copias de plastoma no transformadas, que sí se observa en las plantas control no transformadas (Figura 35B).

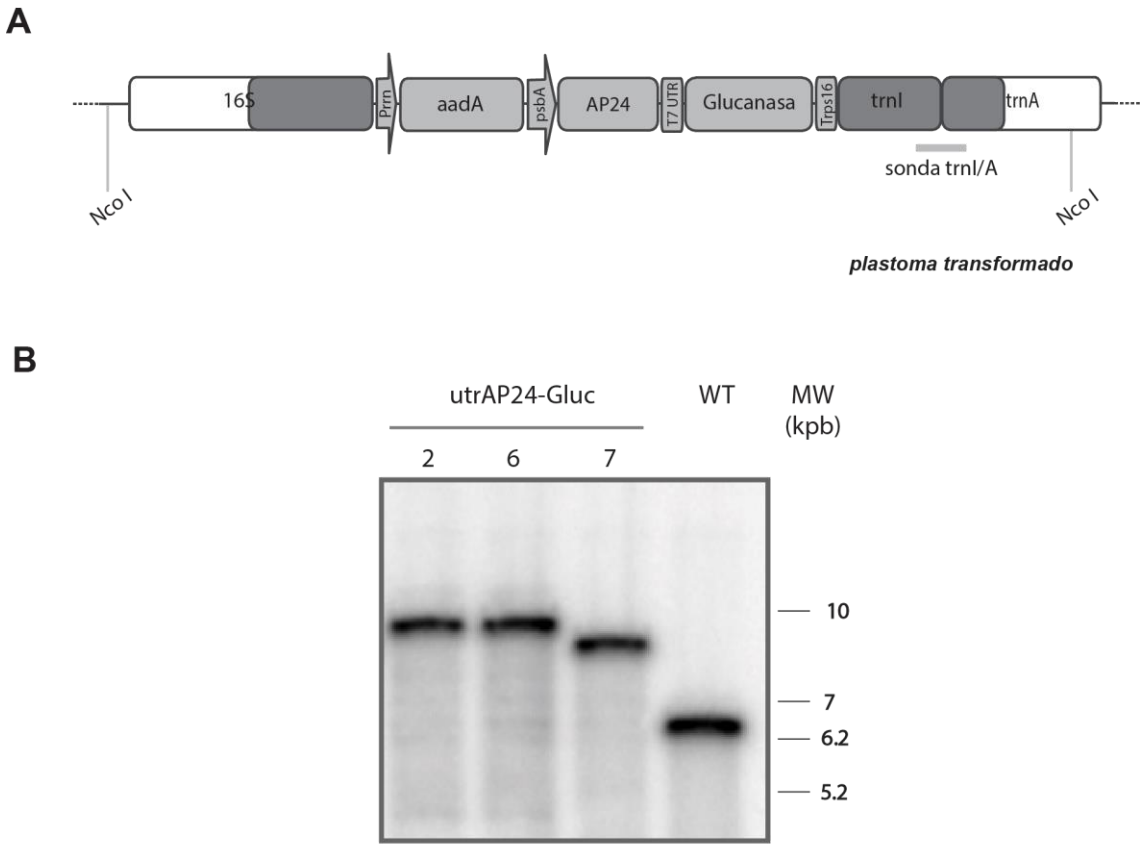

Figura 35. Análisis de las plantas transplastómicas por *Southern blot*. A) Mapa físico mostrando el sitio de hibridación de la sonda trnI/A y los sitios de corte de la enzima NcoI. **B)** *Southern blot* revelado con la sonda *trnI/A* para confirmar la inserción y homoplastía. Se indica en el margen la posición del marcador de peso molecular (MW, 1 KB, Invitrogen).

2.3. Caracterización de los transcriptos que contienen las secuencias de glucanasa y AP24 en las plantas transplastómicas

Mediante la técnica de *northern blot* se evaluó la presencia de los transcriptos generados como consecuencia de la transformación genética del plastoma. En función del diseño de la construcción, esperamos observar tres especies de ARNs derivados de la misma (Figura 36A): transcriptos dicistrónicos (~1,8 kpb) originados a partir del promotor *psbA*, transcriptos tricistrónicos (~2,9 kpb) originados a partir del promotor *Prrn* introducido rio arriba del gen *aadA* y, por último, transcriptos policistrónicos (~4,5 kpb) de mayor tamaño que se generan a partir del promotor endógeno *Prrn*. En las plantas pertenecientes a las líneas utrAP24-Gluc 2 y 6 se pudieron detectar los transcriptos esperados a partir de cada uno de los promotores mencionados previamente, siendo mayoritario el originado en el promotor *psbA*. Sin embargo, en las plantas de la línea utrAP24-Gluc 7 el perfil de ARNs observado no se correspondió con el esperado, confirmando los resultados obtenidos para esta línea en los ensayos de PCR y *Southern blot*. Además, en todas las muestras (plantas transplastómicas y *wild-type*) se detectó una banda de menor peso molecular que correspondería a los transcriptos endógenos de AP24 (~1 kpb) y Glucanasa (~1,4 kpb) (Figura 36).

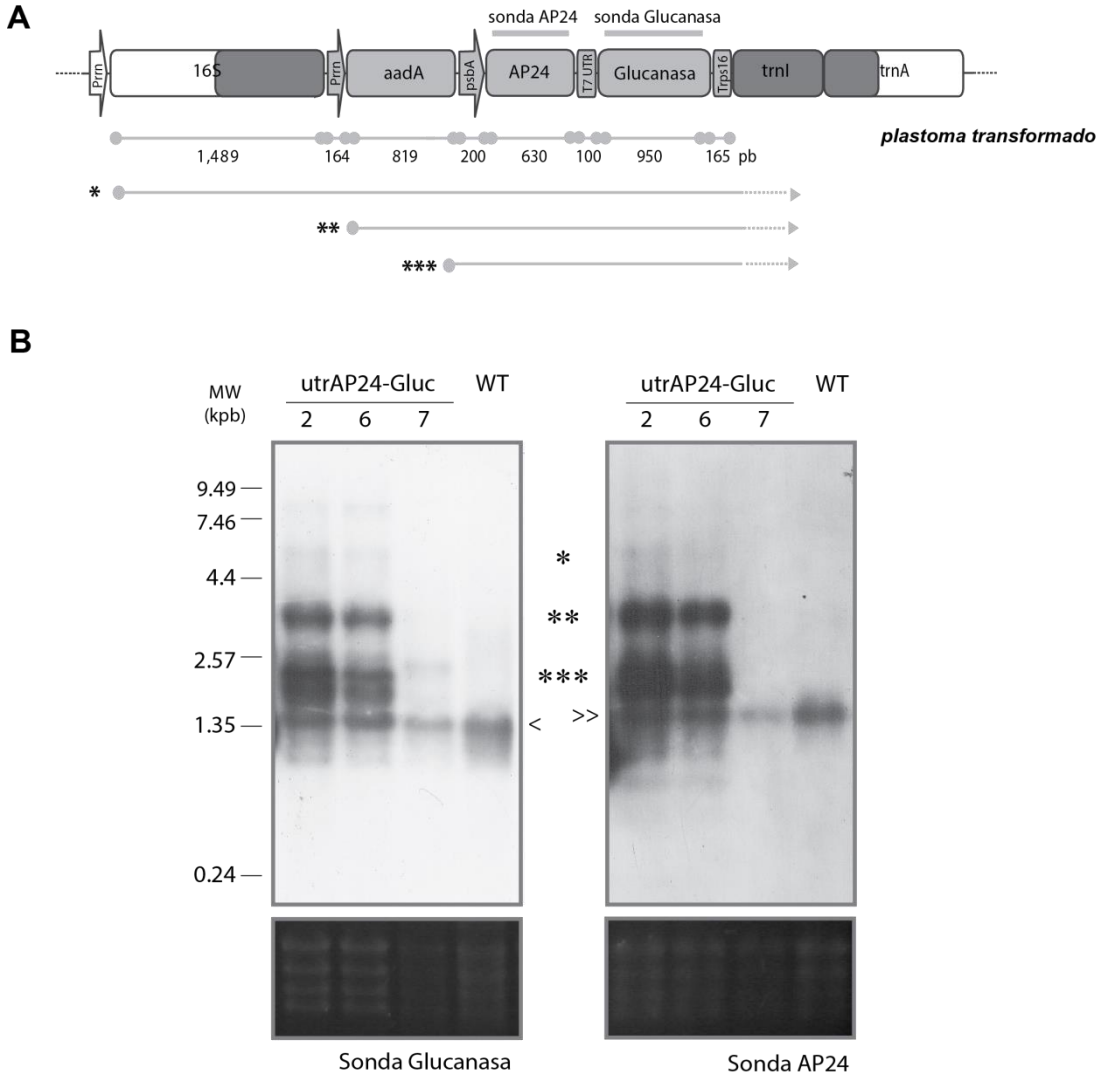

Figura 36. Análisis los niveles de transcripción de glucanasa y AP24 en las plantas transplastómicas. A) Mapa físico mostrando los tamaños esperados para los distintos transcriptos. *: policistrón (~4,5 kpb), **: tricistrón (~2,9 Kpb), ***: dicistrón (~1,8 Kpb), respectivamente **B)** *Northern blot* revelado con sondas específicas para detectar AP24 o Glucanasa mostrando los transcriptos derivados de las copias de plastoma transformado, y los correspondientes a AP24 o glucanasa endógenos (< o >>). Se muestra los ARN ribosomales mayoritarios en el gel antes de ser transferido como control de carga.

2.4. Análisis fenotípico de plantas transplastómicas con la construcción utrAP24-Gluc.

En primer lugar, quisimos evaluar si la expresión de AP24 y β-1,3-glucanasa desde el genoma plastídico tenía un impacto en el fenotipo de las plantas transplastómicas, respecto a las plantas controles sin transformar. Para ello, se germinaron semillas obtenidas de plantas transplastómicas utrAP24-Glu de tercera ronda de regeneración en presencia del agente

selector (Figura 37A). Se observó que el fenotipo de las plántulas, fue indistinguible al de las plantas controles. Posteriormente, se transfirieron plántulas a tierra para obtener plantas adultas. Nuevamente, como se puede ver en la Figura 37B, el fenotipo de las plantas transplastómicas obtenidas fue similar al de las plantas controles no transformadas, sugiriendo que la presencia de los transgenes correspondientes a las proteínas PR seleccionadas no afecta el fenotipo de las plantas.

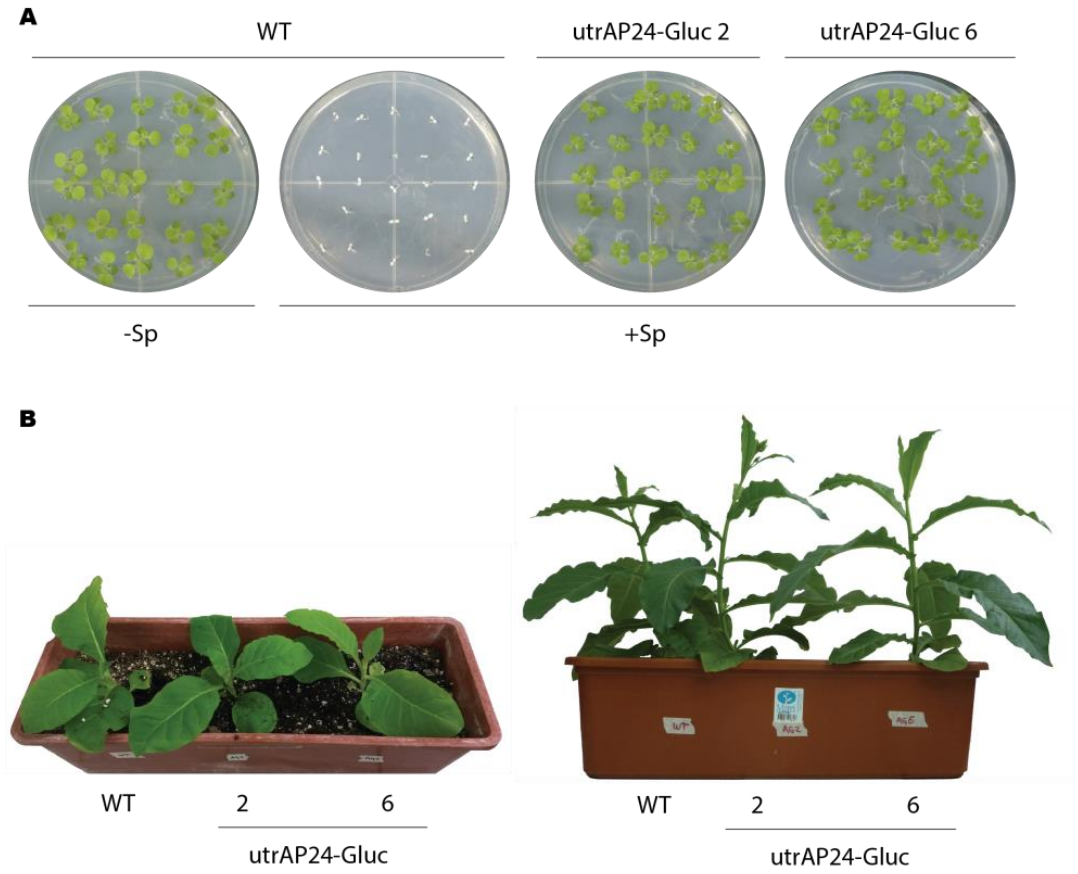

Figura 37. Fenotipo de las plantas transformadas con genes de proteínas antimicrobianas. Plantas de tabaco transplastómicas líneas UTR AP24/Gluc 2 y 6 y control sin transformar (WT) creciendo **A)** *in vitro* en medio MS solo o adicionado con 500mg/L de espectinomicina. **B)** en condiciones de invernadero a las 8 y 12 semanas luego de la siembra.

3. Ensayos de resistencia a hongos y oomicetes de las plantas transplastómicas

Para llevar a cabo los ensayos de desafío de las plantas transplastómicas con patógenos de importancia agronómica en condiciones de invernadero y en condiciones de campo, se estableció una colaboración con el Dr. Orlando Borrás-Hidalgo, Investigador del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba. Se realizaron ensayos de infección de las plantas transplastómicas que expresan las proteínas PR, con los siguientes

patógenos: *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina* (oomicete), *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (oomicete) y *Rhizoctonia solani* (hongo basidiomicete). Por la información obtenida a partir de las caracterizaciones moleculares, se decidió no incluir en los ensayos funcionales la línea utrAP24-Gluc 7.

3.1 Evaluación de la resistencia de las plantas transplastómicas de tabaco a *Rhizoctonia solani* en condiciones de invernadero

El ensayo con *Rhizoctonia solani*, hongo necrótrofo, se realizó bajo condiciones de invernadero, sembrando las plantas en suelo inoculado, y analizando los síntomas a los 7 días luego de la siembra. Los principales síntomas que se evidenciaron en las plantas *wild-type* y en las plantas transplastómicas utrGus a causa de la infección por *R. solani* fueron pequeñas manchas necróticas de color pardo a rojo a nivel de los peciolos de las hojas mas cercanas al suelo o por encima de ella. Posteriormente, las lesiones se explandieron a través de los tallos, causando que el tejido se volviera más marrón hasta que finalmente la planta muere. Esta pudrición es el origen de la caída de la planta y de su muerte (Figura 38A). Las plantas controles utrGus y *wild-type* mostraron una incidencia severa de la enfermedad (muerte), mientras que las líneas transplastómicas utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 mostraron resistencia a la infección por *R. solani* (Figura 38B). El desarrollo de los síntomas coincidió con un aumento de la biomasa fúngica (determinada por qRT-PCR) en las raíces colonizadas de las plantas utrGus y *wild-type*, mientras que no hubo aumento significativo de la biomasa de *R. solani* en las plantas transplastómicas (Figura 38C).

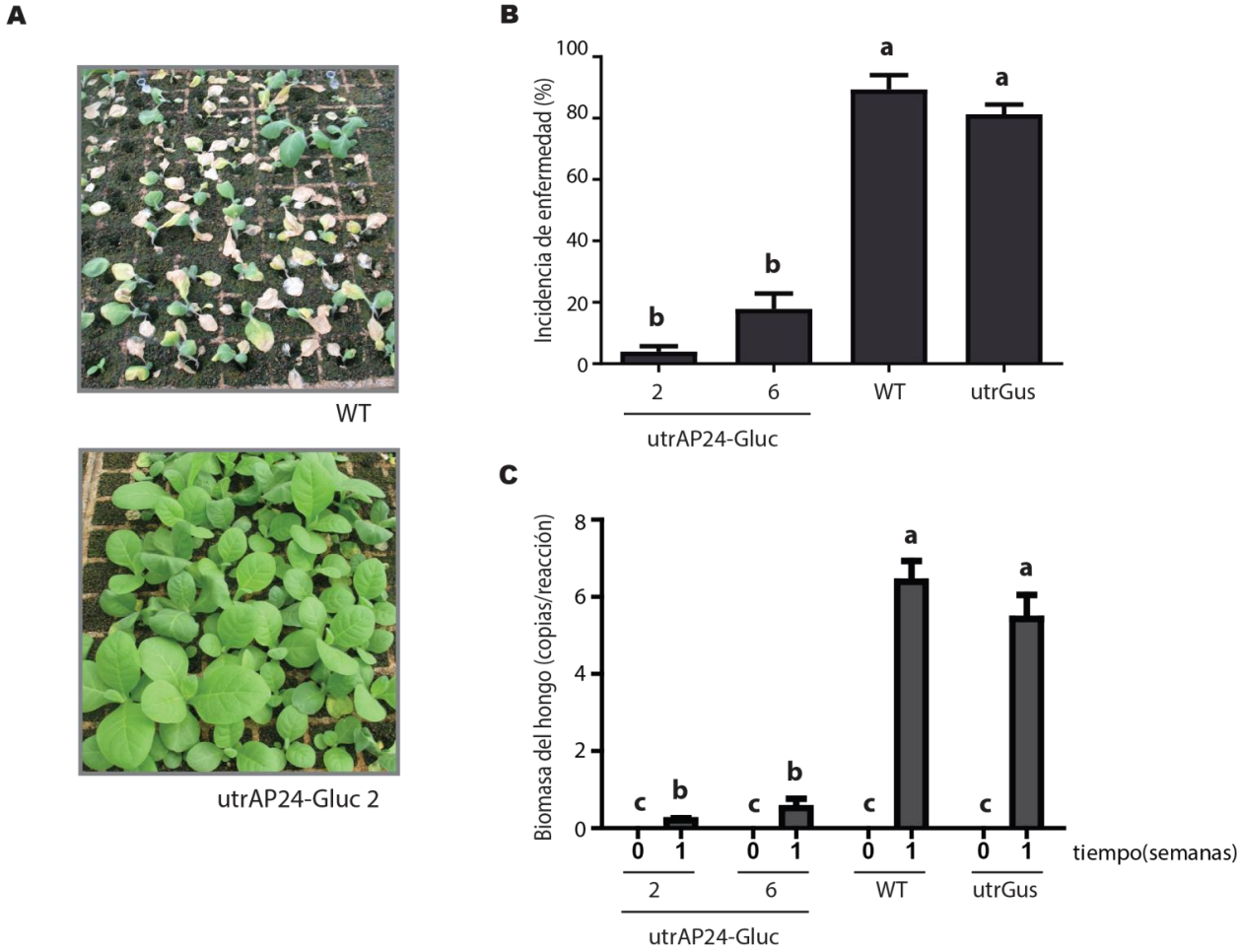

Figura 38. Evaluación en invernadero de plantas de tabaco transplastómicas para la resistencia contra *Rhizoctonia solani*. **A)** Imágenes representativas correspondientes a experimentos de infección por *R. solani*. **B)** Evaluacion de la incidecia de la enfermedad en las plantas de tabaco transplastómicas. **C)** PCR cuantitativa en tiempo real para medir el crecimiento de R solani (biomasa del hongo) en las plantas transplastómicas al tiempo 0 y luego de una semana de infección. Las barras representan valores medios (N = 90; ± DE). Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

3.2. Evaluación de la resistencia de las plantas transplastómicas de tabaco frente a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* en condiciones de campo

Se realizaron ensayos de desafío de las líneas transplastómicas de tabaco que expresan las combinaciones utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 en el campo, en condiciones de alta presión de inóculo del patógeno *P. parasitica* var. *nicotianae* (oomicete biótrofo). A los cinco días después de la siembra, se presentaron ligeros síntomas de enfermedad en las plantas utrGus y *wild-type*, mientras que no se detectaron síntomas en las plantas transplastómicas. Luego de diez días del inicio del ensayo, se observaron síntomas severos de la enfermedad

(marchitamiento de las hojas y pudrición del tallo) en las plantas utrGus y *wild-type*. En cambio, ambas líneas utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 se mantuvieron sanas y mostraron un alto nivel de resistencia a *P. parasitica* var. *nicotianae* (Figura 39A). En concordancia con lo observado, la biomasa del oomicete, determinada mediante PCR en tiempo real, aumentó gradualmente a medida que *P. parasitica* var. *nicotianae* colonizó las plantas utrGus y *wild-type*. Mientras tanto, las plantas utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 no mostraron un aumento significativo en la biomasa de patógenos (Figura 39B).

Por último, se realizó un ensayo a campo durante la estación fría y húmeda cuando el moho azul del tabaco, enfermedad causada por el oomicete hemibiótrofo *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* muestra una alta incidencia. Las plantas transplastómicas utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 mostraron un alto nivel de resistencia a *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* en comparación con las plantas de control utrGus y *wild-type* (Figura 39C). A los 35 días después de la siembra, las plantas control utrGus y *wild-type* se infectaron y se observaron claramente los síntomas de la enfermedad. Como consecuencia de la progresión de la enfermedad, las plantas utrGus y *wild-type* murieron 5 días después, mientras que las líneas transplastómicas utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 permanecieron sin síntomas de enfermedad evidentes (Figura 39C). Al igual que en los experimentos anteriores, el nivel de resistencia a la enfermedad se correlaciona con la acumulación del patógeno. La PCR en tiempo real confirmó que no hubo aumento significativo de la biomasa del patógeno en las plantas utrAP24-Gluc 2 y utrAP24-Gluc 6 en comparación con las plantas de control utrGus y *wild-type* (Figura 39D).

Actualmente, y en función de estos resultados alentadores, estamos realizando experimentos de transformación por biobalística del plastoma de papa con la construcción utrAP24-Gluc. Esperamos en el corto plazo poder obtener las primeras plantas transplastómicas de papa.

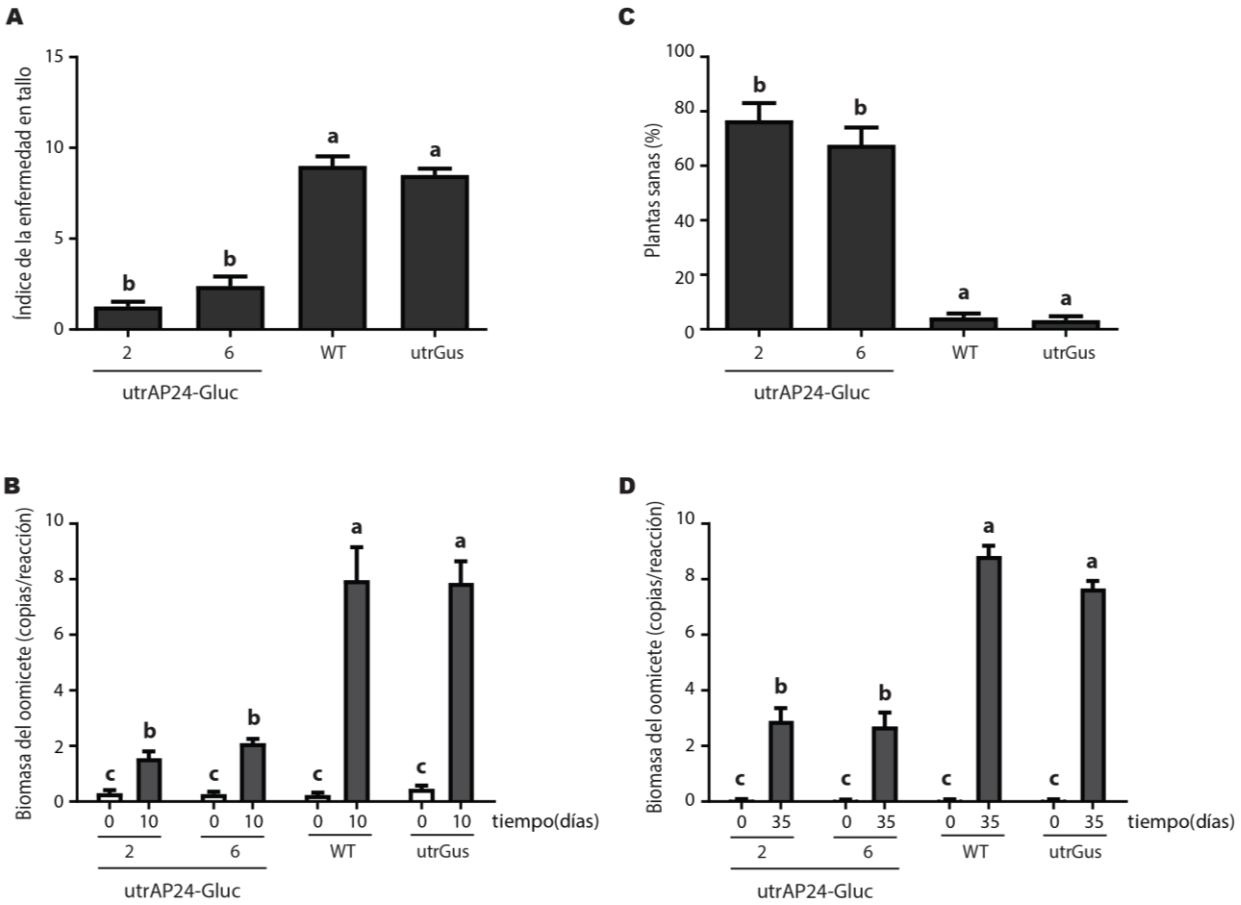

Figura 39. Evaluación a campo de plantas transgénicas de tabaco para la resistencia contra *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae y Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. A) Cuantificacion del daño de la enfermedad en el tallo en plantas de tabaco transplastómicas sembradas en suelo con alto inóculo de *P. parasitica* var. *nicotianae* a los 10 días después de la siembra. **B)** PCR cuantitativa en tiempo real para medir el crecimiento de *P. parasitica* var. *nicotianae* en las plantas transplastómicas a los 10 días después de la siembra. **C)** Cuantificación de plantas sanas sembradas en un área con alta incidencia de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* a los 35 días después de la siembra. **D)** PCR cuantitativa en tiempo real para medir el crecimiento de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* en plantas transplastómicas a los 35 días después de la siembra. Las barras representan valores medios (N = 90; ± DE). Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

Parte C

Establecimiento de la transformación de plástidos de *Nicotiana benthamiana*

Introducción

1. *N. benthamiana* como modelo de estudio

El género *Nicotiana* (*Solanaceae*) incluye 76 especies principalmente tropicales y subtropicales distribuídas en cuatro continentes, en su mayoría provenientes de Sudamérica y Australia [142].

Dentro de la familia *Solanaceae*, se encuentra una planta herbácea originaria de las regiones del norte de Australia, denominada *Nicotiana benthamiana*, estrechamente relacionada con *N. tabacum*. Existen varias cepas silvestres a lo largo de Australia, pero la que se utiliza a nivel de laboratorio es originario de una población que ha retenido una mutación de pérdida de función en *Rdr1* (ARN polimerasa dependiente de ARN 1), haciéndolo muy susceptible a los virus [143].

Son varias las ventajas que sitúan a *N. benthamiana* como un buen modelo de estudio. Entre ellas, su ciclo de vida corto, su parentesco cercano con el tabaco cultivable (*Nicotiana tabacum*) y que pertenece a la familia de las solanáceas que incluye cultivos importantes como la papa y el tomate. *N. benthamiana* es susceptible a una amplia variedad de otros agentes patógenos vegetales (tales como bacterias, oomicetos, hongos, etc.), situando a esta especie como modelo para la investigación en interacciones planta-patógeno, en particular en el contexto de inmunidad innata y vías de señalización involucradas en defensa. Como comentara, el principal patógeno del cultivo de papa es *Phytophthora infestans* que no infecta N. tabacum, pero es hospedante de *N. benthamina.* Además, *N. benthamiana* puede transformarse genéticamente y existen protocolos para su regeneración *in vitro*. Más aún, es la especie más utilizada en experimentos de expresión transitoria por agroinfiltración [144].

Existen en la bibliografía trabajos que reportan la transformación mediante biobalística del genoma plastídico de *N. benthamiana*. Davarpanah y col. demostraron por primera vez la transformación el genoma plastídico de *N. benthamaiana* utilizando un vector diseñado con los sitios de recombinación y secuencias regulatorias de *N. tabacum* [145]. En trabajos publicados recientemente, se utilizó esta metodología para generar plantas transgénicas de *N. benthamiana* resistentes a estrés biótico. Entre ellos se reportó la transformación del genoma plastídico de *N. benthamiana* para acumular tres proteínas vinculadas a defensa, esporamina, cistatina y quitinasa, que resultó en un alto nivel de resistencia contra larvas de *Spodoptera litura* y *Spodoptera exigua*, inhibición de las enfermedades producidas por *Alternaria alternata* y *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* y tolerancia mejorada de las plantas a estreses abióticos [146]. Por otro lado, plantas transplastómicas de *N. benthamaiana* que acumulan horquillas de ARN largo contra el gen de la acetilcolinesterasa del gusano de algodón, *Helicoverpa armígera*, lograron controlar al insecto [147].

Objetivos generales

El objetivo general de este parte del trabajo de Tesis Doctoral fue poner a punto la transformación del genoma plastídico de *Nicotiana benthamiana*, para ser utilizada como nueva planta modelo para evaluar estrategias de resistencia a patógenos. Para ello nos propusimos como **objetivos especificos**:

a) Establecer la transformación de cloroplastos de *Nicotiana benthamiana* con el vector pBSW-utrGUS.

b) Caracterizar molecularmente las plantas transplastómicas obtenidas

Parte C

Establecimiento de la transformación de plástidos de *N. benthamiana*

Resultados

1. Antecedentes previos al inicio de la tesis

Nuestro grupo de investigación cuenta con gran experiencia en la transformación de cultivos de solanáceas, como son *N. tabacum* y *S. tuberosum* [38-41, 148]. *N. benthamiana* pertenece a la familia de las solanáceas y es un modelo muy utilizado para evaluar interacción planta-patógeno. Por este motivo y dada la relevancia de *N. benthamiana* en los estudios de interacción planta patógeno, se decidió establecer en nuestro laboratorio la transformación de *N. benthamiana* con el vector previamente diseñado para la trasformación del genoma de cloroplastos de *N. tabacum*.

2. Comparación de secuencias de los genomas plastídicos de *N. benthamiana* y *N. tabacum*

En la mayoría de las plantas superiores, el orden de los genes y las secuencias del operón ARN ribosómal, que incluye el *16S ARNr*, *trnI*, *trnA*, y *23S ARNr*, estan altamente conservado. Sin embargo, con el objetivo de determinar si el vector para transformación de cloroplastos de *N. tabacum* pBSW-utrGus podía ser utilizado para transformar genéticamente el plastoma de *N. benthamiana,* se realizó un análisis de homología de secuencia entre *N. benthamiana* y *N. tabacum* para las regiones recombinogénicas incluídas en el vector, correspondientes a los genes 16S y *trnI/A*. Como se observa en la Figura 40, las regiones analizadas muestran un alto grado de homología, aproximadamente del 100%. Estas regiones analizadas, poseen muy pocas inserciones, deleciones y falta de homología. Las diferencias encontradas se observan en zonas no codificantes de los genes 16S y *trnI/A* de los plastomas comparadas. Esto sugiere que sería factible utilizar el vector pBSW-utrGus, que contiene estas secuencias recombinogénicas y elementos regulatorios de *N. tabacum* que ya fueron probados en esta otra especie vegetal, para intentar transformar plástidos de *N. benthamiana* [145].

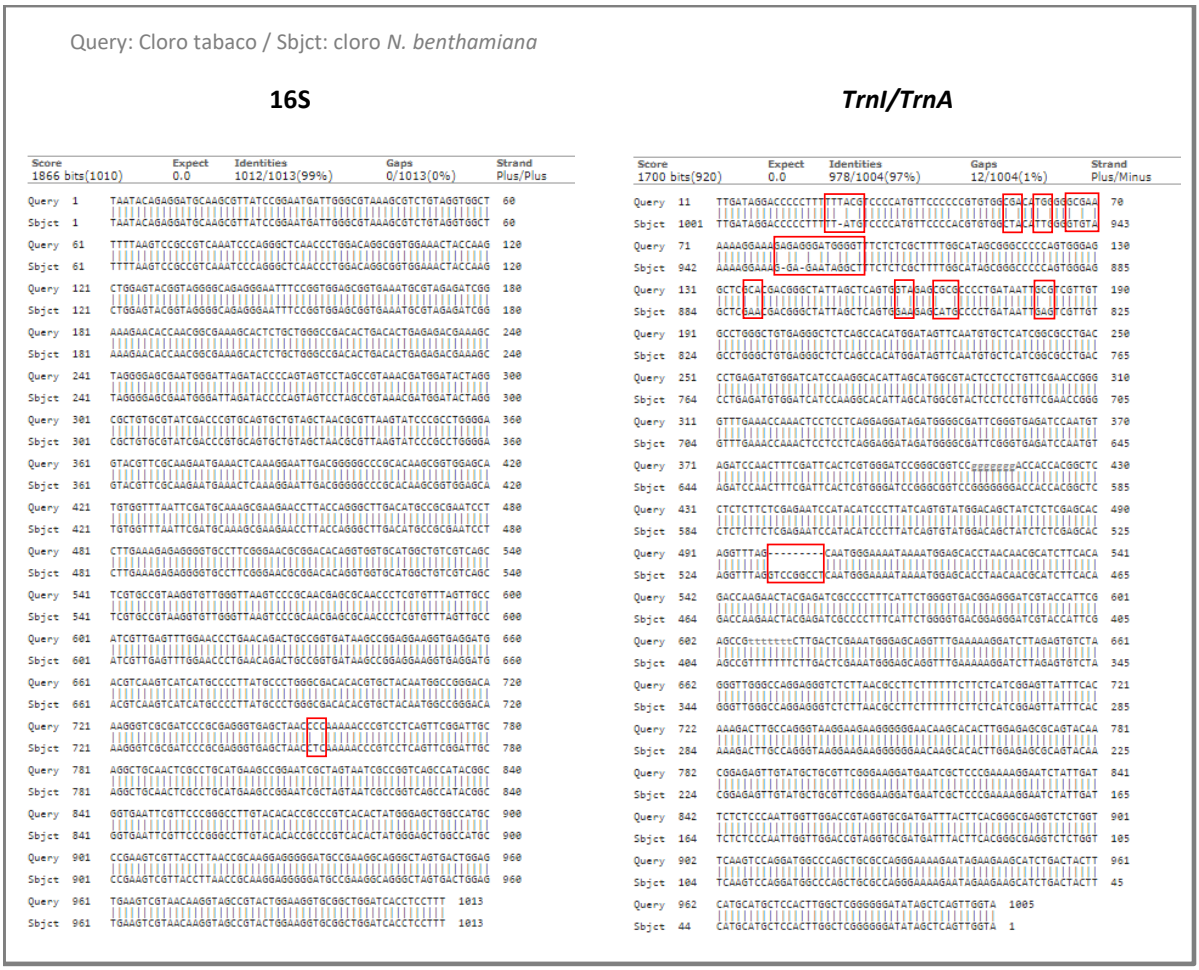

Figura 40. Comparación de las secuencias del genoma plastídico de *N. tabacum* y de *N. benthamiana* en la región involucrada en la recombinación homóloga. Las secuencias de *N. tabacum* (GenBank: NC_001879) y *N. benthamiana* (GenBank: GCA_000723945.1) correspondientes a la región para la integración de los vectores pBSW-utrGUS, se compararon utilizando el algoritmo Blast. La secuencias anotadas como Query y Subject corresponden a *N. tabacum* y *N. benthamiana*, respectivamente. Con recuadros rojos se muestran las zonas en las que se encontraron inserciones en el genoma de *N. benthamiana* respecto al de tabaco. A la izquierda se encuentra la secuencia correspondiente al gen 16S y a la derecha la correspondiente a la región *trnI/A*.

3. Determinación de los parámetros óptimos para la transformación por biobalística de hojas de *N. benthamiana*

Como comentara, la transformación del genoma plastídico se realiza utilizando la técnica de biobalística. Se encuentran reportados los parámetros para la transformación de hojas de *N. benthamiana* utilizando una pistola génica [145], y algunos trabajos indican que los parámetros a utilizar serían los reportados para *N. tabacum.* Para determinar en nuestras condiciones de trabajo cuáles eran los parámetros óptimos para transformar mediante biobalística hojas de *N. benthamiana,* decidimos realizar ensayos de bombardeo y expresión transitoria utilizando como explanto hojas de *N. benthamiana* crecidas *in vitro*.

Se realizaron ensayos de expresión transitoria nuclear en hojas de *N. benthamiana* con el vector pHAPGusi (prom35S::Gus intrón::term35S), a fin de evaluar la distancia óptima entre el soporte de las partículas y el explanto, parámetro determinante en la eficiencia de transformación por biobalística. Se evaluaron tres distancias: 6, 9 y 12 cm. La expresión del gen reportero se analizó mediante un ensayo histoquímico 48 hs luego del bombardeo (Figura 41). La condición en la cual se observó un mayor número de puntos azules fue cuando la distancia empleada en el bombardeo fue de 6 cm, motivo por el cuál se decidió entonces utilizar esta distancia para comenzar los ensayos de transformación de cloroplastos de *N. benthamiana*.

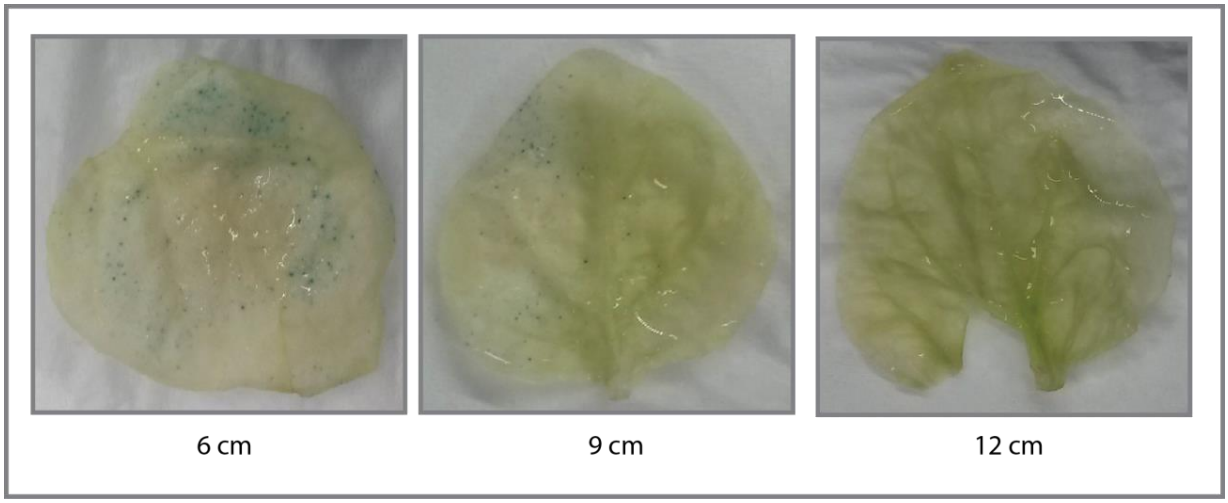

Figura 41. Expresión transitoria de *uidA* por biobalística. Se puso a punto la distancia entre la membrana de retención y la muestra mediante ensayos de expresión transitoria utilizando el vector pHAPGusi. Se usaron discos de ruptura de 1100psi y una distancia entre el disco de ruptura y el macrotransportador de ¼ de pulgada. Luego de los disparos, las hojas se colocaron en la solución de revelado con X-Gluc y se incubaron a 37°C durante una noche. Para facilitar la visualización de los puntos azules, luego de la tinción se decoloraron las hojas utilizando etanol 80%.

Teniendo en cuenta los resultados de este ensayo de expresión transitoria y a la bibliografía disponible [145] se seleccionaron las siguientes condiciones para los posteriores ensayos de transformación (según parámetros indicados en la Figura 2B):

- Discos de ruptura que soportan una presión de 1100 psi
- Distancia A: ¼ de pulgada
- Distancia B: 11mm
- Distancia C: 6cm
- Presión de vacío: 28mmHg

- Microtransportadores: micropartículas de oro de 0,6µm de diámetro

4. Comparación de medios de regeneración

La regeneración es una etapa de gran importancia a la hora de transformar plantas de forma estable. En este paso se debe lograr la rediferenciación de las células totipotenciales (células capaces de generar una planta entera) mediante la adición a los medios de cultivo de reguladores del crecimiento.

En 2009, Davarpanah y col. reportan por primera vez la transformación de cloroplastos de *Nicotiana benthamiana* utilizando la misma metodología que para *N. tabacum*, mismas secuencias de recombinacion, parámetros de bombardeo y medio de regeneración. El medio de inducción de brotes utilizado está compuesto por medio MS suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) 1 mg/L y ácido α-naftalenacético (ANA) 0.1 mg/L (M1). En estas condiciones, se observa una etapa de formación de callos prolongada que interfiere con la obtención de brotes. En los últimos años, Bally y col. publicaron un nuevo medio de regeneración en el cuál modifican la proporción de citoquininas y auxinas [147], utilizando 2 mg/L de BAP y 0.05 mg/L ANA (M2). Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos comparar de manera simultánea estos medios. Para ello, realizamos 3 placas para cada medio a evaluar y se distribuyeron 6 explantos por cada placa. Luego de 4 semanas, se cuantificó el número de brotes regenerados en cada medio de regeneración (Figura 42). Para el medio de regeneración denominado M1 se obtuvieron en promedio 8,8 brotes por fragmento de hoja (explanto), en contraste con el M2 en el cual se obtuvieron 15,4 brotes por fragmento, aproximadamente un 40% más de brotes en el medio de regeneración propuesto por Bally y col., en comparación al que se utiliza para *N. tabacum*.

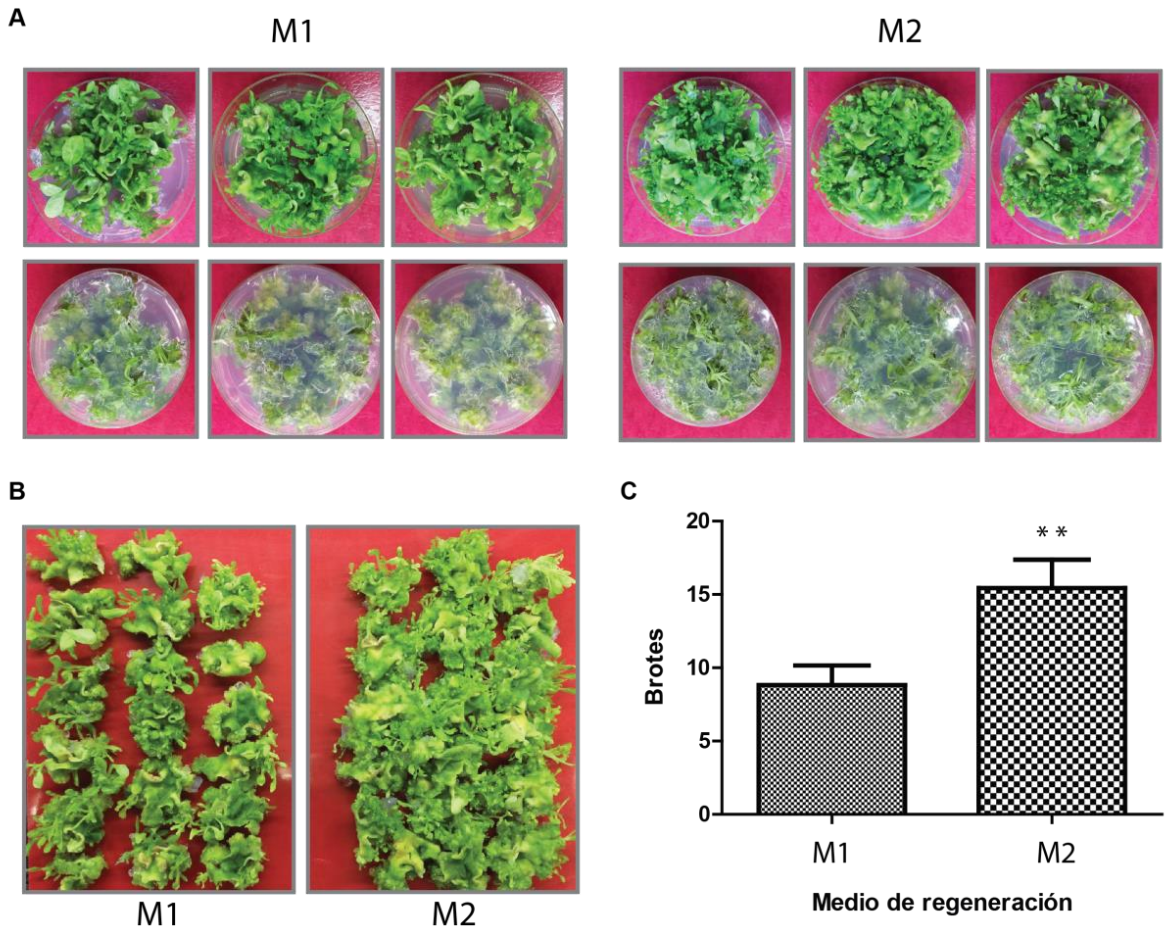

Figura 42. Comparación de los medios de regeneración. Se evaluó la generación de brotes utilizando fragmentos de hojas de *N. benthamiana* como explantos. Se contaron los brotes obtenidos luego de 4 semanas en medio de regeneración según el publicado por Davarpanah y col. (M1) o Bally y col.(M2) **A)** se muestran las placas antes de cuantificar los brotes obtenidos **B)** se muestran agrupados los fragmentos de hojas luego de la regeneración de A). **C)** Se muestra el promedio del número de brotes obtenidos por explanto para cada tratamiento de regeneración.

5. Transformación del genoma plastídico de *N. benthamiana* con el vector pBSW-utrGus

Con los parámetros seleccionados, se bombardearon hojas de *N. benthamiana* con el vector pBSW-utrGUS. El pBSW-utrGUS tiene como ventajas que ya ha sido utilizado previamente en el grupo para poner a punto las transformaciones de *N. tabacum* y *S. tuberosum*, permitiendo obtener plantas con un fenotipo normal y altos niveles de expresión del gen reportero, que a su vez es fácilmente visualizable mediante un ensayo histoquímico. Luego de los bombardeos, los discos de las hojas bombardeadas y controles sin transformar se colocaron para su regeneración en medio M1 en presencia de 500 mg/L del agente selector (espectinomicina), o en ausencia de selección en el caso de los controles de regeneración. Al cabo de

aproximadamente dos meses se obtuvieron los primeros brotes, de los cuales se extrajeron explantos para nuevas rondas de regeneración con el objetivo de alcanzar la homoplastía. En la Figura 43 se pueden observar los brotes obtenidos y los controles de la transformación.

Por el momento, contamos con varias plantas regeneradas a partir del mismo callo, siendo posiblemente todas estas plantas clones.

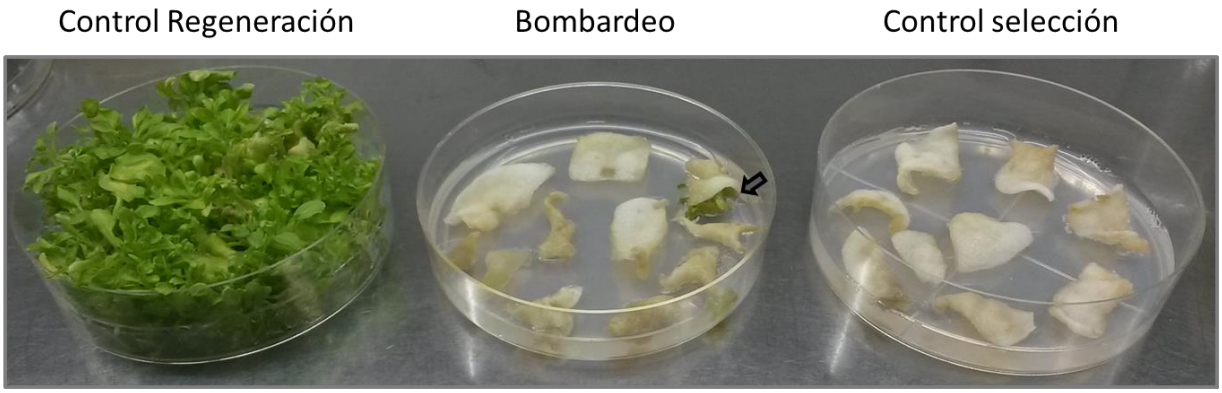

Figura 43. Transformación de cloroplastos de *N. benthamiana*. Izquierda: el control de regeneración consistió en discos de hojas de *N. benthamiana* no transformados, colocados en medio M1 sin agente selector. **Centro:** Discos de hojas de *N. benthamiana* bombardeados con el vector pBSW-utrGUS, colocados en medio M1 con 500mg/L de espectinomicina; la flecha señala el brote regenerado. **Derecha:** para el control de Selección se colocaron los discos de hojas de *N. benthamiana* no transformados en medio M1 con 500mg/L de espectinomicina. Las fotos fueron tomadas a los dos meses de iniciado el experimento.

6. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas de *N. benthamiana* transformadas

Para confirmar la presencia del transgén en las plantas obtenidas luego de los bombardeos, se realizó una PCR con oligonucleótidos iniciadores específicos que hibridan en la región *Prrn/aadA* y en el gen *uidA* (Figura 44A). En las plantas transplastomicas utrGus 1, 2 y 4 se obtuvo un producto de amplificación de 1260 pb debido a la integración de las secuencias recombinantes. Se incluyó una muestra *wild-type* como control negativo en donde no hubo un producto de amplificación (Figura 44B).

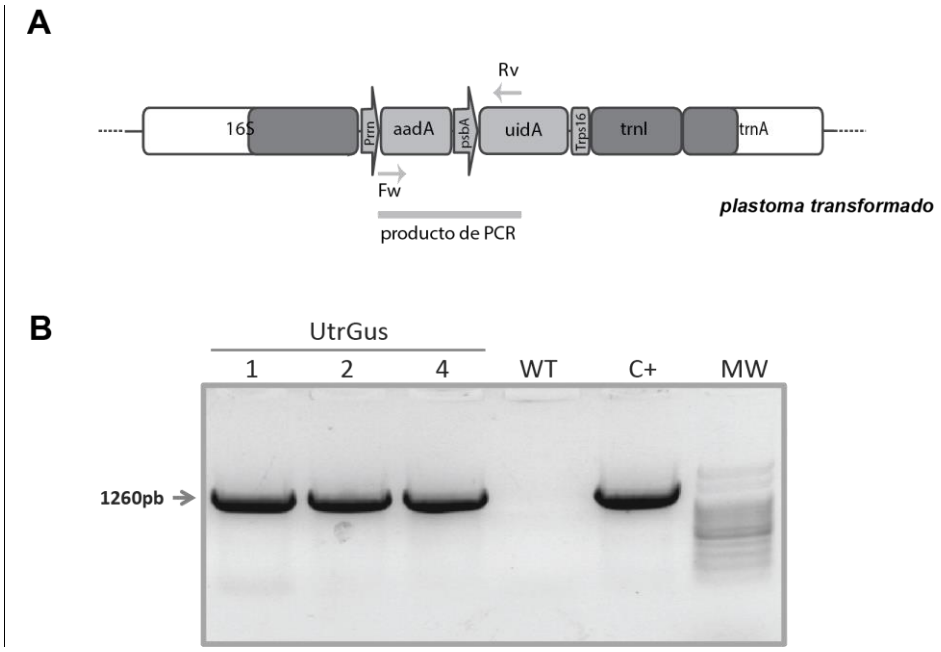

Figura 44. Evaluación de la naturaleza transplastómicas de las plantas regenerantes. A) Se esquematiza el sitio de inserción de la construcción en el plastoma. Se muestran los sitios de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores Prrn-aadA (Fw) y Gus5 (Rv). **B)** Identificación de las líneas transplastómicas por ensayo de PCR. WT: control sin transformar. C+: planta transplastomica utrGus de *N. tabacum.* MW: marcador de peso molecular 100bp.

Como se mencionó anteriormente, las líneas utrGus 1, 2 y 4 se obtuvieron del mismo callo de regeneración, por lo cual se continuó trabajando solo con la línea utrGus 4. Las semillas de esta línea generadas por autofecundación se germinaron en medio MS suplementado con espectinomicina. Las plántulas mostraron un fenotipo de hojas “mosaico” y con crecimiento deformado, indicativo de heteroplastia (Figura 45). Al crecer en medio conteniendo antibiótico, se ejerce una presión de selección sobre aquellas células que no han incorporado el transgén en ninguna de las copias de ADN plastídico. La coexistencia de poblaciones celulares heterogéneas (con distinto grado de heteroplastía) con distintas tolerancias a la espectinomicina, resulta en este fenotipo de hojas mosaico con malformaciones. Sin embargo, a medida que las plantas siguieron crecieron, los síntomas observados comenzaron a atenuarse en las hojas más nuevas.

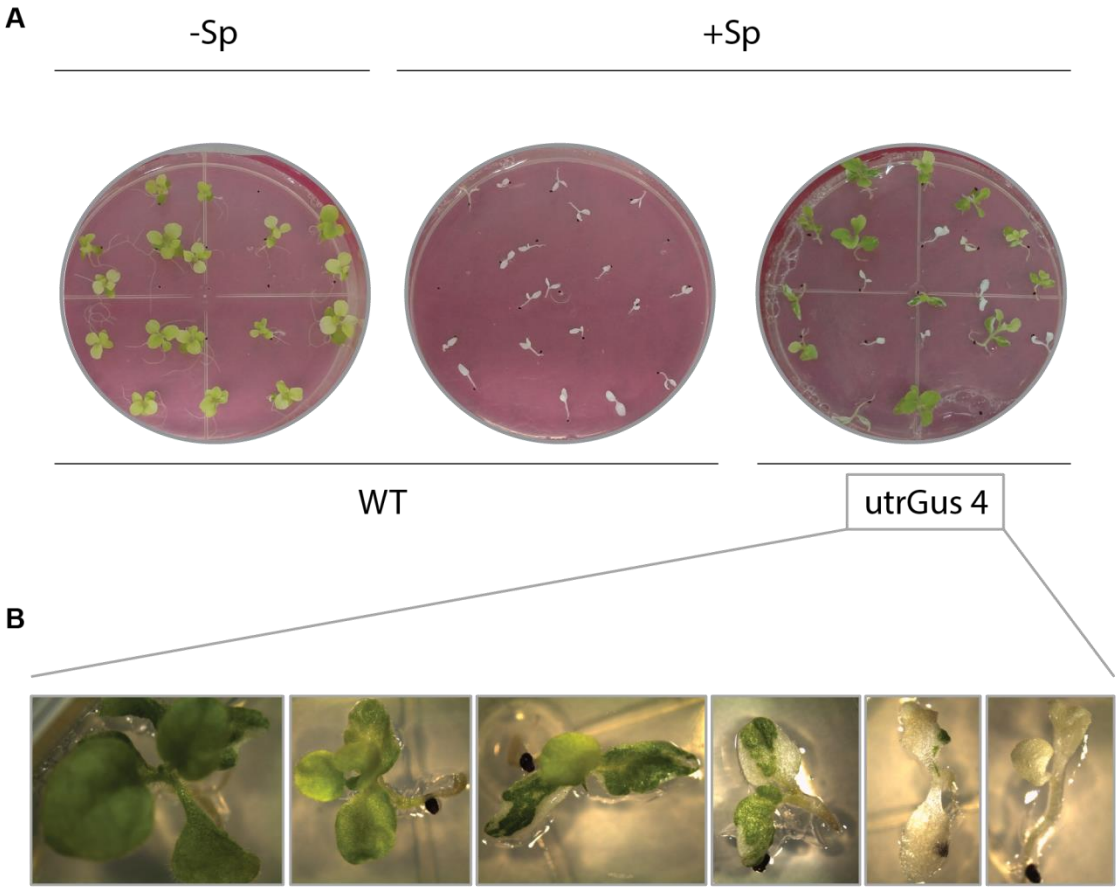

Figura 45. Fenotipo de la línea utrGus 4 germinada en medio MS en presencia de espectinomicina. A) Semillas de *N. benthamiana* WT y utrGus 4 se esterilizaron superficialmente y se colocaron en placas conteniendo MS solo o adicionado con 500mg/L de espectinomicina (-sp o +sp, respectivamente). **B)** Detalle del fenotipo alterado que presentan las plántulas germinadas en medio MS suplementado con espectinomicina

7. Evaluación de la expresión de *uidA* en las plantas transplastómicas

La expresión del gen reportero *uidA* en hojas de las plantas transformadas se evaluó mediante ensayos histoquímicos de actividad β-glucuronidasa y por SDS-PAGE.

Para evaluar la expresión de *uidA* mediante un ensayo histoquímico, se tomaron hojas y planta entera de la línea utrGus 4 crecidas *in vitro* y se las incubó con el sustrato X-Gluc, que en presencia de la enzima β-glucuronidasa permite obtener un producto de reacción de color azul. En las Figura 46 se observa que la planta utrGus 4, positiva por la técnica de PCR, también poseen actividad β-glucuronidasa.

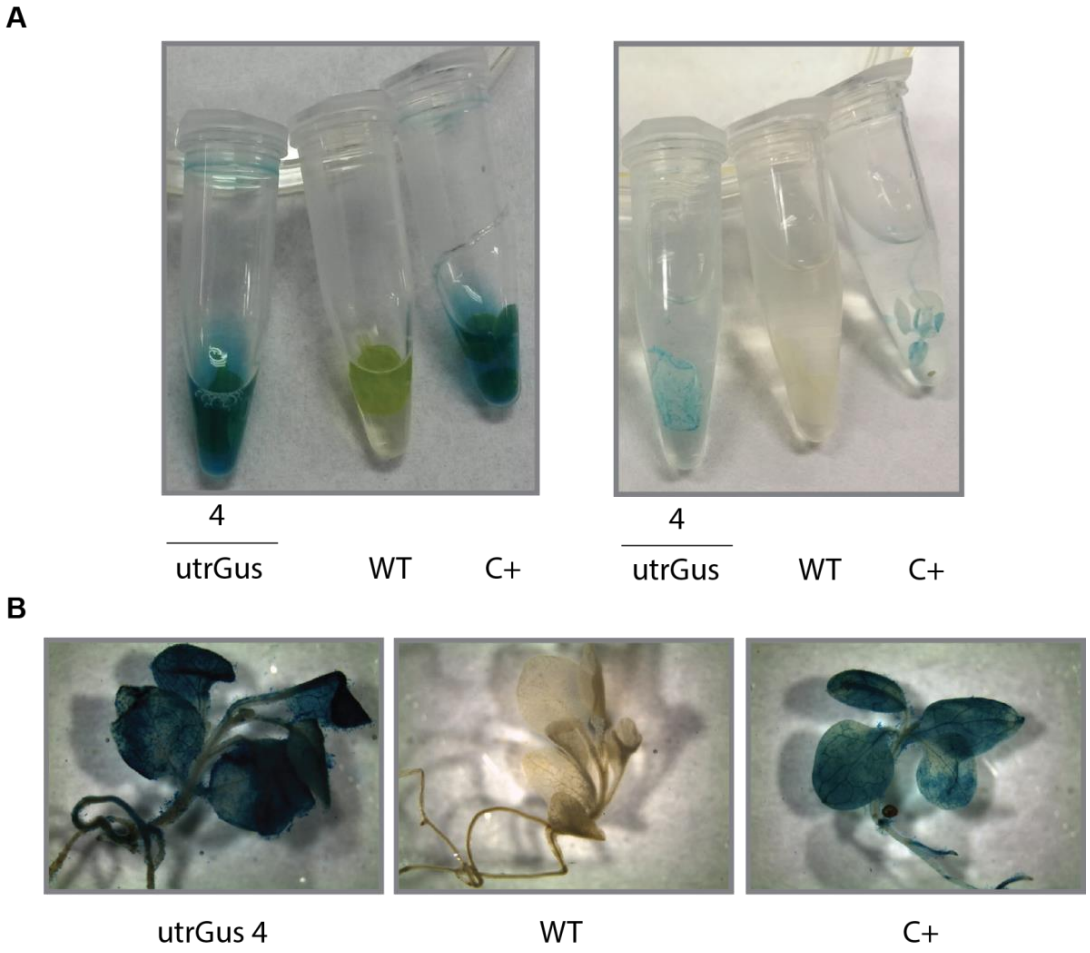

Figura 46. Ensayo de actividad GUS en planta transplastómica. La actividad β-glucuronidasa se evaluó mediante un ensayo histoquímico **A)** Se aisló una hoja de la planta transplastómica utrGus 4 y se observó la expresión de β-glucuronidasa en el sobrenadante de la reacción (izquierda) y en el tejido de la hoja luego de eliminar la clorofila con etanol 80% (derecha). **B)** Expresión de β-glucuronidasa en plántulas enteras de la línea utrGus 4. WT: controles no transformados. C+: plantas transgénicas de *N. tabacum* para *uidA*.

Para confirmar que el gen *uidA* se expresa en altos niveles, como sugieren los resultados observados en el ensayo histoquímico, se extrajeron muestras de proteínas totales solubles de las hojas de la planta transplastómica utrGus 4 para ser evaluada por SDS-PAGE y posterior tinción con *Coomasie Brilliant Blue* (CBB). A fines comparativos se incluyó una muestra de proteínas totales solubles de una planta transplastómica de *N. tabacum* transformada con el vector pBSW-utrGus (Figura 47) [39]. En la Figura 47 se puede observar los altos niveles de expresión de GUS en la planta de *N. benthamiana* transformada con pBSW-utrGus, comparable a los obtenidos previamente para plantas transplastómicas de *N. tabacum*

transformadas con el mismo vector. La intensidad de la banda es comparable a la intensidad de la banda correspondiente a la subunidad mayor de la RuBisCO (Rb-L), proteína mayoritaria en las plantas, y representa aproximadamente entre el 30 y el 40% de las proteínas totales solubles. Estos altos niveles de expresión de la proteína recombinante parecerían no estar afectando la viabilidad de las plantas (figura 45).

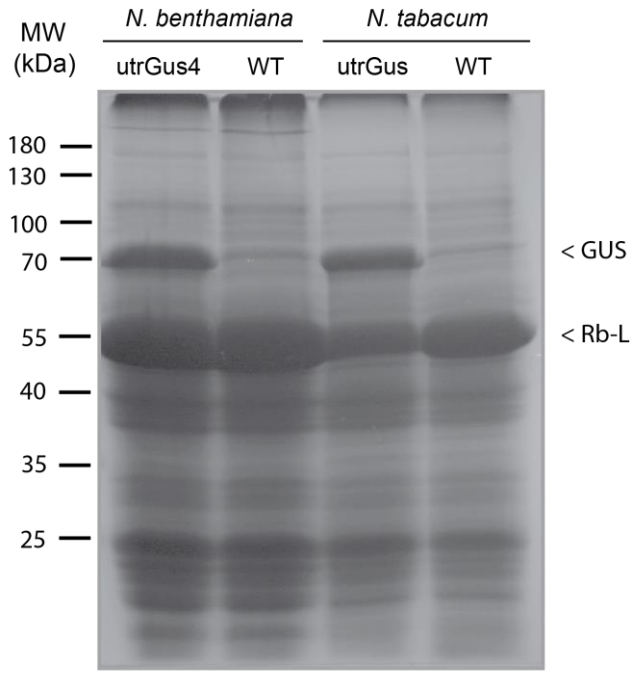

Figura 47. Análisis por SDS-PAGE de las plantas transplastómicas utrGus. En cada calle se sembraron proteínas totales de hojas obtenidas a partir de 7 mg de tejido fresco. Las muestras se separaron por SDS-PAGE 12%, el gel fue teñido con *Coomasie Brilliant Blue*. Para GUS se espera una banda del tamaño de 68,45KDa y una banda de 52,9KDa para la proteína Rb-L. WT: control sin transformar de *N. benthamiana* o *N. tabacum*. utrGus: plantas transplastómicas de *N. benthamiana* o *N. tabacum* transformadas con *uidA*. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. MW: marcador de peso molecular, Pageruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) expresado en kDa.

.

Discusión General

Desarrollo de un sistema de expresión inducible basado en el mecanismo de quorum sensing

El desarrollo de plantas transgénicas para obtener resistencia a patógenos mediante la sobre-expresión de proteínas con acción antimicrobiana, se ve limitado dado que la expresión constitutiva de numerosas proteínas de defensa puede generar en la planta efectos deletéreos, incluyendo la aparición de fenotipos conocidos como *lesion-mimic* [51]. Este hecho nos planteó la necesidad de desarrollar sistemas de expresión inducibles que permitan generar altos niveles de expresión del transgén en respuesta a la interacción con determinados microorganismos, disminuyendo así los posibles costos metabólicos relacionados a la expresión constitutiva de elevados niveles de proteínas heterólogas. Varios de los sistemas de expresión inducible desarrollados para la transformación del genoma plastídico que han sido reportados, requieren en paralelo de la transformación genética del genoma nuclear [80, 83]. Además, los sistemas inducibles en los cuáles solo se transformó el genoma plastídico no permitieron alcanzar altos niveles de expresión luego de la inducción [86]. Hasta el momento, no se han reportado sistemas de expresión inducibles por patógenos mediante transformación del genoma plastídico. Es por ello, que uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue el desarrollo de nuevos vectores de transformación del genoma plastídico que permitan obtener altos niveles de expresión de transgenes de manera inducible por la presencia de patógenos.

Para ello, generamos tres construcciones genéticas (utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR) diseñadas para la expresión de transgenes en el cloroplasto en respuesta a la inducción por AHLs. Dado que existe una gran similitud en las maquinarias de transcripción y traducción entre *E. coli* y el cloroplasto, los vectores diseñados para la transformación del genoma plastídico pueden ser evaluados preliminarmente en *E. coli* antes de proceder a la transformación genética de las plantas [149]. Los vectores utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR fueron funcionales en *E. coli*, respondiendo la expresión de la proteína reportera a la inducción mediada por AHLs (Figura 10). Este resultado demuestra que los elementos del sistema planteado fueron funcionales en bacterias, y respondieron a la inducción exitosamente, alentándonos a proceder con la transformación del genoma plastídico en plantas de *N. tabacum*.

Obtuvimos plantas transplastómicas con las tres construcciones genéticas desarrolladas, que mostraron un fenotipo normal en la T0 y en la T1 proveniente de los brotes regenerados inicialmente. Sin embargo, plántulas germinadas de semillas obtenidas a partir de rondas de regeneración más avanzadas comenzaron a mostrar un fenotipo anormal, particularmente caracterizado por un crecimiento más lento y/o la presencia de hojas variegadas, con respecto a las plantas controles no transformadas. Más aún, este fenotipo alterado no revirtió cuando las

plantas crecieron en tierra en ausencia del agente selector (Figura 15). Cuando la alteración fenotípica se debe a un estado heteroplástico, aquellas células que no poseen en sus plástidos copias del plastoma transformado mueren en presencia del agente selector, resultando en hojas deformadas. En ausencia del selector, el fenotipo normal tiende a recuperarse. En el caso de las plantas transplastómicas obtenidas con las construcciones utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR, el fenotipo variegado observado no parece corresponder a un estado heteroplástico de las plantas, sino que podría estar vinculado con la presencia de rearreglos y/o deleciones de genes involucrados en la fotosíntesis, de manera similar al fenotipo observado en plantas mutantes para *rbcL* [150]. El análisis de *Southern blot* mostró presencia de bandas correspondientes a plastoma no transformado en todas las líneas evaluadas, además de otras bandas de tamaños no esperados cuya identidad no pudo ser asignada. El resultado del *Southern blot* y el análisis fenotípico permiten sugerir que la construcción genética integrada al plastoma le confiere inestabilidad, favoreciendo la aparición de rearreglos, y la prevalencia de copias de plastoma no transformadas.

Mediante la técnica de *northern blot*, se detectaron los transcriptos esperados a partir de cada uno de los promotores contenidos en la construcción genética, siendo mayoritario el mensajero de menor tamaño originado a partir el promotor *psbA.* Además, pudimos corroborar que la señal intercistrónica (IEE) incluida en la construcción utrQS-LasR+RhlR permitió el procesamiento de los ARN policistrónicos que la contenían, aunque según se observa en el *northern blot,* el procesamiento no fue 100% eficiente, observación que concuerda con la bibliografía [96]. También pudimos observar que en las líneas de plantas transformadas con el vector utrQS-LasR, se detecta un transcripto con la sonda *LasR* de menor tamaño al esperado. Cuando analizamos *in silico* los transcriptos esperados a partir del promotor *psbA*, detectamos un potencial sitio de terminación de la transcripción que podría explicar la banda de menor peso molecular observada. Mediante un análisis de *western blot* se comprobó que las plantas presentaron un perfil de expresión estable de las proteínas heterólogas.

En las plantas transplastómicas ya caracterizadas molecularmente evaluamos la funcionalidad del sistema de expresión inducible por AHLs utilizando distintos diseños experimentales. Comenzamos realizando una aplicación exógena, en forma de *spray*, de las moléculas señales C4-HSL y 3O-C12-HSL, capaces de inducir el sistema a través de sus reguladores transcripcionales RhlR y LasR, respectivamente. Este método de aplicación ya fue utilizado exitosamente para inducir la expresión de un gen reportero en plantas transgénicas nucleares de *Arabidopsis* que expresan el regulador transcripcional TraR, sugiriendo que las AHLs aplicadas en la superficie de la hoja pueden atravesar la pared celular y la membrana plasmática [79]. Luego de la aplicación por *spray* de ambas AHLs sintéticas en distintas concentraciones, pudimos observar en una planta de la línea utrQS-RhlR 31 la expresión de la

proteína reportera β-glucuronidasa a las 48hs post inducción con 1 mM y 10 mM de C4-HSL. Sin embargo, no logramos reproducir este resultado cuando realizamos nuevos experimentos, incluso explorando distintas alternativas de aplicación de las AHLs sintéticas (como se resume en la Tabla 1). La ausencia de actividad β-glucuronidasa en respuesta a la inducción podría deberse a distintos factores, incluyendo una ausencia de inducción por la baja estabilidad de las AHLs sintéticas en solución, o por dificultad en el acceso al estroma de los plástidos de las AHLs aplicadas exógenamente. Hasta el momento, no hay reportes en la bibliografía que demuestren que las AHLs aplicadas extracelularmente son capaces de atravesar las distintas membranas biológicas y llegar en concentraciones adecuadas al estroma plastídico.

Teniendo esto en cuenta, nos propusimos entonces avanzar hacia un sistema que nos permitiera independizarnos de las dificultades asociadas a la administración exógena de las moléculas inductoras. Para ello, desarrollamos nuevas construcciones genéticas diseñadas para permitir a las células vegetales sintetizar las dos AHLs de interés, C4-HSL y 3O-C12-HSL, utilizando sustratos ya presentes en el estroma plastídico. Se ha demostrado que plantas transgénicas nucleares que expresan los genes para la síntesis de acil-homoserin lactonas con un péptido de tránsito para su localización en cloroplastos, fueron capaces de sintetizar AHLs, y que estas moléculas difundieron hacia el apoplasto [88-90]. En los cloroplastos se encuentran las moléculas S-adenosil metionina (SAM) y la cadena acilo de la proteína transportadora de acilo (acil-PTA), sustratos de las sintasas de AHLs para la producción de diferentes homoserin lactonas. Generamos entonces una serie de plásmidos binarios que contenían dentro del T-DNA las secuencias codificantes correspondientes a las proteínas sintasas LasI y RhlI incluyendo un péptido de tránsito, clonado previamente en el laboratorio, para su direccionamiento al estroma plastídico. Con los vectores diseñados, obtuvimos varias líneas independientes de plantas transgénicas nucleares, utilizando diferentes fondos genéticos (plantas WT o transplastómicas para las tres construcciones, utrQS-LasR, utrQS-RhlR y utrQS-LasR+RhlR). La producción de las AHLs en estas plantas transgénicas se evaluó utilizando las cepas indicadoras *C. violaceum* CV026/12E1B y *A. tumefaciens* NTL4/pZLR4. En ensayos realizados con cepas indicadoras, pudimos demostrar que las plantas transgénicas nucleares que expresan LasI producen niveles detectables de 3O-C12-HSL. En el caso de las plantas transgénicas nucleares transformadas con RhlI, detectamos inducción en la expresión de β-galactosidasa (transgén reportero presente en la cepa indicadora *A. tumefaciens* NTL4/pZLR4) compatible con la producción de AHLs en el tejido vegetal. Sin embargo, dado que las hojas de las plantas no transformadas también indujeron niveles apreciables de actividad β-galactosidasa, necesitamos realizar nuevos ensayos para determinar con certeza la producción de C4-HSL en las plantas que expresan RhlI. En paralelo, generamos versiones alternativas de estas construcciones en las cuáles a las proteínas sintasas se les adicionó una etiqueta de

6xHis en su extremo C-terminal. Estas construcciones fueron utilizadas en ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana,* que nos permitieron detectar bandas del peso molecular esperado correspondientes a dos versiones de la proteína LasI: conteniendo el péptido de tránsito, o con el péptido de tránsito procesado luego de la translocación al estroma de los cloroplastos. Sin embargo, para la sintasa RhlI observamos una banda de menor peso molecular al predicho. Cuando analizamos *in silico* la secuencia correspondiente a la proteína RhlI fusionada al péptido de tránsito a cloroplastos (PT), detectamos un sitio de procesamiento del péptido de tránsito alternativo, que daría como producto una proteína de menor tamaño. Serian necesarios nuevos experimentos para determinar si este procesamiento es el que da origen a la banda de menor peso molecular observada.

Además, se evaluó mediante ensayos de *western blot* en las plantas transgénicas nucleares productoras de AHLs si la estabilidad o la integridad de las proteínas LasR y RhlR acumuladas en el estroma plastídico, se veía alterada por la presencia las AHLs 3O-C12-HSL y/o C4-HSL. Mediante ensayos de *western blot* realizados sobre las plantas doble transgénicas (Pt/Nt), pudimos detectar las bandas de tamaño esperado para los reguladores transcripcionales LasR y RhlR, y una banda adicional de menor peso molecular presente solamente en aquellas plantas transplastómicas que expresan las sintasas de AHLs. Esta banda sugiere que, en presencia de su AHL correspondiente, las proteínas LasR y RhlR son objeto de procesamientos/modificaciones cuya naturaleza aún desconocemos. Para determinar si el sistema inducible por AHLs propuesto era funcional, se evaluó la actividad β-glucuronidasa en las plantas transgénicas nucleares mediante un ensayo histoquímico. Lamentablemente, no pudimos detectar en las plantas transgénicas nucleares actividad β-glucuronidasa. Si bien pudimos resolver dificultades asociadas al acceso de las moléculas inductoras (AHLs) al estroma plastídico, resta determinar qué etapa/s del mecanismo de inducción propuesto no están funcionando adecuadamente. Es posible que la proteólisis observada en los ensayos de expresión transitoria, y/o la ausencia de un correcto plegamiento de las proteínas LasR y RhlR, impidan la activación del sistema propuesto.

La familia de proteínas tipo LuxR, son reguladores transcripcionales que poseen dos dominios funcionales, el dominio N-terminal tiene como función la unión a AHL y el dominio C-terminal de unión al ADN [151-154]. Esta familia de proteínas, en general, se unen al ADN en una región conservada denominada “caja tipo lux”, caracterizada por una secuencia de reconocimiento repetida e invertida palindrómica de 20pb, y ubicada alrededor de la posición -42,5 del sitio del inicio de la transcripción [155-159]. La interacción entre LuxR y su AHL afín genera un cambio conformacional que asegura la estabilidad y el plegamiento correcto para la unión del complejo al ADN, a través de su extremo C-terminal. A su vez, este complejo recluta a la ARN polimerasa al interactuar con la subunidad alfa (αCTD y αNTD) y en consecuencia

activa la transcripción [160, 161]. Además de interactuar con la subunidad αCTD de la ARN polimerasa, se sabe que muchos reguladores transcripcionales establecen contacto con la subunidad σ70 de la ARN polimerasa [162, 163]. Se cree que la interacción con αNTD activa la transcripción, mientras que la interacción con αCTD alivia el efecto inhibidor de esta región [164-166]. Los reguladores transcripcionales LasR y RhlR pertenecen a la familia filogenética LuxRs y poseen las características de esta familia [167, 168].

Si bien el cloroplasto posee un origen evolutivo común a las bacterias, la ARN polimerasa plastídica (PEP) no es totalmente homóloga a la ARN polimerasa bacteriana. El reemplazo de la subunidad α de la ARN polimerasa plastídica en tabaco (producto del gen *rpoA*), con la subunidad equivalente de *E. coli* generó plantas deficientes en clorofila, fenotipo similar al observado en plantas mutantes en *rpoA,* junto con la ausencia de transcriptos que inician en promotores reconocidos por la ARN polimerasa plastídica [169, 170]. Las subunidades β y β' de la PEP, pero no la subunidad α, pueden sustituir funcionalmente a las subunidades homólogas de la ARN polimerasa de *E. coli* [169, 170]. Estas diferencias podrían explicar por qué el sistema inducible funcionó correctamente en *E. coli*, pero no así en las plantas transplastómicas.

Para solucionar una potencial limitación en la permeabilidad de las AHLs hacia el cloroplasto, generamos plantas transgénicas que además de contener los elementos propios del sistema inducible en cloroplastos, expresaran las sintasas LasI y RhlI para producir 3O-C12-HSL y C4-HSL. Estas nuevas plantas no mostraron expresión del gen reportero *uidA* en ensayos preliminares, sugiriendo que son necesarios nuevos experimentos para determinar las causas que impiden el funcionamiento en cloroplastos del sistema inducible desarrollado.

Obtención de cultivos resistentes a patógenos

Se han reportado diferentes estrategias para obtener cultivos resistentes a enfermedades mediante ingeniería genética a nivel del genoma nuclear, como ser la sobreexpresión de genes que codifican proteínas PR (para una revisión, véase [103, 171]). Si bien la expresión constitutiva de las proteínas PR ha sido considerada una estrategia prometedora, existen ciertas limitaciones entre las que se incluyen un bajo nivel de expresión y la aparición de lesiones en ausencia de patógeno, fenotipo conocido en la literatura como *lession mimic* [135, 136, 172]. Para llevar a cabo nuestro objetivo de obtener plantas transplastómicas resistentes a patógenos filamentosos, decidimos evaluar como estrategia la transformación del genoma plastídico para expresar las proteínas PR de tabaco AP24 y β-1,3-glucanasa en plantas de tabaco. El tabaco es el cultivo no alimenticio más importante del planeta. Su producción está

limitada por patógenos filamentosos (*Peronospora hyoscyami* f.sp *tabacina, Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *R. solani*) y plagas (especialmente *Heliothis virescens* y *M. persicae*). Además, el tabaco es una especie modelo para estudios en la familia de las solanáceas, que incluye miembros de gran importancia como fuente de alimento, como son la papa, el tomate y los pimientos. Logramos obtener tres líneas de tabaco transplastómicas independientes y homoplásticas transformadas con las secuencias codificantes de AP24 y β-1,3-glucanasa de *N. tabacum*. Una de estas líneas, utrAP24-Gluc 7, mostró un perfil inesperados en el análisis mediante PCR, *Southern* y *northern blot* (Figuras 30, 31 y 32), sugiriendo reordenamientos en el genoma del plástido. Por este motivo, esta línea no se evaluó en los ensayos de infección. Las líneas transplastómicas de tabaco utrAP24-Gluc 2 y 6 presentaron un fenotipo indistinguible del de las plantas control, y en ambas pudo observarse la expresión de ambos transgenes AP24 y β-1,3-glucanasa (Figura 37). Cuando estas líneas fueron desafiadas con el patógeno fúngico necrotrófo *R. solani* en condiciones de invernadero, exhibieron un fenotipo resistente en comparación con las plantas control (Figura 38). Estas mismas líneas se evaluaron en ensayos a campo con los oomicetes *P. hyoscyami* f.sp *tabacina* (biótrofo) y *P. parasitica* var. *nicotianae* (hemibiótrofo) (Figura 39). Sorprendentemente, las plantas utrAP24-Gluc mostraron un fenotipo resistente contra estos dos oomicetes en condiciones de alta presión de inóculo, tal como lo demuestra la alta incidencia de la enfermedad en las plantas control. Las proteínas AP24 (PR-5) y β-1,3-glucanasa (PR-2) están implicadas en respuestas de defensa desencadenadas frente a diversos patógenos, incluidos hongos y oomicetes con diferentes estilos de vida [102, 103]. Por ejemplo, la mutante *cep de A. thaliana* que presenta expresión constitutiva de PR-1, PR-2 y PR-5, mostró una resistencia mejorada a *P. parasitica* [173]. Las plantas transgénicas transformadas a nivel del genoma nuclear para sobreexpresar osmotinas de diversas fuentes confirieron diferentes grados de protección frente a patógenos filamentosos, incluidos *R. solani* [174, 175], *Botrytis cinerea, Oidium lycopersicum Leveillula taurica* y *Phytophthora infestans* [175, 176], *Sclerotinea sclerotiorum* [177], *Fusarium pallidoroseum* y *Colletotrichum sp*. [178]. La protección contra diferentes patógenos filamentosos en plantas transgénicas por sobreexpresión de β-1,3-glucanasa básica, se ha reportado para *R. solani* [179], *Phytophthora infestans* [180], *Fusarium sp.* [181], *Cercospora arachidicola* y *Aspergillus flavus* [182]. Existen numerosos reportes demostrando que las estrategias basadas en la combinación o “apilamiento” de varios genes es importante para mejorar el grado de resistencia (y también podría ser importante para su durabilidad). La co-expresión de dos o más proteínas PR proporcionó, en algunos casos una protección incrementada contra patógenos filamentosos en plantas transgénicas [35, 183, 184]. Como se desprende de la bibliografía, se ha demostrado que la expresión de osmotina y β-1,3-glucanasa protege a las plantas frente a *R. solani*; sin embargo, no hay reportes de su eficacia

para controlar a *P. hyoscyami* f. sp *tabacina* o *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* en plantas transgénicas que sobre-expresan estas proteínas PR.

La localización subcelular esperada para las proteínas endógenas AP24 y β-1,3-glucanasa es la vacuola y/o el apoplasto [102, 132, 185], donde podrían actuar interrumpiendo directamente la integridad de la membrana del patógeno/pared celular o indirectamente (cuando se acumula en el apoplasto) liberando elicitores (ya sean PAMPs o DAMPs) para activar las respuestas de defensa de la planta [171]. El modo indirecto de acción se ha propuesto especialmente para la β-1,3-glucanasa, enzima que una vez en el apoplasto puede actuar sobre las hifas del patógeno liberando en consecuencia oligosacáridos elicitores (como β-glucano) que a su vez pueden desencadenar inmunidad en la planta [186]. El fenotipo resistente observado en este trabajo para las plantas transplastómicas utrAP24-Gluc podría explicarse para *R. solani* (necrótrofo) y *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (hemibiótrofo) al considerar la acción directa de estas proteínas PR sobre las hifas del patógeno una vez que se pierde la integridad de las células vegetales y se libera el contenido de los plástidos como consecuencia de la muerte celular desencadenada por el patógeno. Además, una vez liberadas de la contención del plástido, estas proteínas PR también podrían actuar a través del modo de acción indirecto. Por otro lado, existen publicaciones que reportan la existencia de inhibidores secretados por patógenos filamentosos durante la infección, que interfieren con la función de las proteínas PR presentes en el hospedante. Al menos tres proteínas PR diferentes son blanco de inhibidores secretados por oomicetes del género *Phytophthora*, que incluyen una proteína inhibidora de *Phytophthora sojae* que interfiere con una β-1,3-glucanasa de soja [187, 188]. De acuerdo con estas observaciones, no podemos descartar que la acumulación de proteínas PR en el plástido confiera resistencia a las plantas al permitir su almacenamiento en este compartimento sub-celular, quedando protegidas de la acción inhibitoria de las proteínas del patógeno secretadas durante la infección.

Las plantas transplastómicas utrAP24-Gluc se comportaron resistentes en ensayos realizados en condiciones de campo, en respuesta a la presencia de alto inóculo de *P. hyoscyami* f.sp *tabacina*. Este resultado nos sorprendió, al ser *P. hyoscyami* f.sp *tabacina* un patógeno biótrofo obligado. En el caso de los patógenos biótrofos, la integridad celular se mantiene y se forman estructuras muy especializadas (denominadas haustorios) en la interfaz de la interacción para permitir su nutrición y el intercambio de moléculas entre patógeno-hospedante [189]. Se han descripto varios tipos de vesículas que contienen material derivado del cloroplasto y que se generan en condiciones fisiológicas normales o frente a estrés [190, 191]. Además, resultados preliminares obtenidos en el marco de una colaboración sugieren que ciertas vesículas que contienen material plastídico se acumulan dentro de la célula vegetal

alrededor del haustorio (en el patosistema *P. infestans* - *N. benthamiana*) estas podrían fusionarse a la membrana plasmática y liberar su contenido hacia el espacio comprendido entre la membrana plasmática de la célula vegetal y el oomicete (Dr. Tolga Bozkurt, Imperial college London, UK; comunicación personal). Tomando en cuenta estas observaciones, una hipótesis para explicar el resultado observado con las plantas utrAP24-Gluc y *P. hyoscyami* f.sp *tabacina* es que las proteínas PR acumuladas en los cloroplastos podrían formar parte del contenido de vesículas derivadas de estas organelas y liberarse así al espacio peri haustorio. Aún, es necesario realizar más experimentos para comprender la base molecular de la resistencia de las plantas transplastómicas frente a *P. hyoscyami* f.sp *tabacina*.

En este trabajo hemos demostrado que la transformación del genoma plastídico con genes que codifican proteínas PR confiere a las plantas un fenotipo de resistencia frente al desafío con hongos y oomicetes, tanto en ensayos de infección en invernadero como sometidas a alta presión de inóculo en ensayos a campo. Los hongos y oomicetos evaluados en este trabajo incluyen algunos de los patógenos de plantas más relevantes que causan pérdidas económicas enormes en cultivos de relevancia. Aunque es necesario realizar más experimentos para descifrar las bases moleculares del fenotipo resistente observado, pudimos demostrar que la transformación del genoma plastídico es una estrategia viable para obtener cultivos resistentes a patógenos.

Establecimiento de la transformación de plástidos de *N. benthamiana*

N. benthamiana es hospedante de muchos patógenos de interés agronómico y se ha convertido en un modelo para el estudio de los mismos. Con el objetivo de disponer en el laboratorio del modelo *N. benthamiana* transplastómica para la evaluación de estrategias de resistencia a patógenos, entre otras aplicaciones, se decidió ensayar la transformación del genoma plastídico de *N. benthamiana*.

Durante este trabajo de Tesis Doctoral pudimos implementar en el laboratorio la transformación del genoma plastídico de *N. benthamiana* utilizando el vector pBSW-utrGus. Logramos obtener plantas transplastómicas, a partir de las cuáles fue posible cosechar semillas viables capaces de germinar en medio selectivo. Estas plantas expresaron cantidades comparables de la proteína heteróloga GUS, respecto a las plantas transplastómicas de tabaco obtenidas previamente en el laboratorio (Figura 47) [39]. La eficiencia de la transformación fue mucho menor si se la compara con *N. tabacum*, observación ya descripta en la bibliografía. Por un lado, la etapa de regeneración de los explantos bombardeados atraviesa por una etapa prolongada de tejido indiferenciado (callo), interfiriendo con el desarrollo de brotes. Por otro lado, la baja efi-

ciencia de transformación también podría deberse a que las regiones necesarias para la recombinación (y los elementos regulatorios) son de una especie vegetal diferente a la que se desea transformar [50, 192, 193].

Actualmente se están transformando plantas de *N. benthamiana* con la construcción utrAP24-Gluc, con el objetivo de generar un sistema modelo para evaluar la efectividad de la expresión de proteínas PR en el cloroplasto para el control de otros patógenos de relevancia en solanáceas, en particular *Phytophthora infestans,* que no pueden evaluarse en *N. tabacum* por ser no hospedante.

Conclusión

Con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias para conferir resistencia a patógenos se plantearon varios objetivos en el marco de esta tesis doctoral. Por un lado, se demostró que la expresión de las proteínas PR AP24 y β-1,3-glucanasa en los plástidos de N. tabacum confieren resistencia frente al desafío con hongos y oomicetes. Además, se estableció la transformación del genoma plastídico de N. benthamiana. Esto, nos permitirá estudiar un rango más amplio de patógenos de interés agronómico para los cuáles N. tabacum no es un buen modelo. Nos planteamos además desarrollar un sistema de expresión inducible de genes vinculados a defensa sólo en presencia de moléculas derivadas de microorganismos patógenos. En el marco de este objetivo generamos plantas transplastómicas que contienen los elementos necesarios para la inducción por moléculas señales implicadas en el sistema de Quorum sensing bacteriano de transgenes. El sistema funcionó en un entorno procariota, pero desafortunadamente hasta el momento no logramos que funcione en las plantas transplastómicas, siendo necesarios nuevos experimentos para determinar las causas y proponer modificaciones al esquema propuesto.

Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas

1.1 Escherichia coli

- **Condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa DH10B de *Escherichia coli*. Los cultivos líquidos crecieron a 37ºC en medio LB (peptona de caseína o triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y NaCl 5 g/L) con agitación a 220 r.p.m. Los cultivos sólidos se crecieron en placas de petri a 37ºC en medio LB adicionado con 1,5 % de agar. El medio se suplementó con antibióticos de acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L, espectinomicina 100 mg/L, estreptomicina 100 mg/L.

- **Transformación de células competentes de *E. coli* por electroporación.**

Preparación de células electro-competentes de E. coli

A partir de una colonia aislada de la cepa DH10B de *E. coli*, se inició un cultivo en 10 ml de medio LB líquido, y se creció toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se diluyó 1:100 en 1L de medio LB, y se creció en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO600=0,6-1. Los cultivos se mantuvieron en hielo durante 15-30 min. Luego se centrifugaron 15 min. a 4.000g (4°C). El precipitado se resuspendió con agitación suave, en 1L de agua fría. Luego de centrifugar 15 min. a 4.000g (4°C), el precipitado se resuspendió suavemente en 500 ml de agua fría. Tras una nueva centrifugación durante 15 min. a 4.000g (4°C), el precipitado se resuspendió en 20 ml de glicerol 10% frío. Finalmente, el precipitado obtenido luego de una nueva centrifugación durante 15 min. a 4.000g (4°C), se resuspendió en 2-3 ml de glicerol 10% frío y se dispensó en tubos *eppendorf* que se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Transformación de células electro-competentes de E. coli.

Las células competentes se transformaron mediante electroporación, utilizando para ello el equipo “MicroPulser” (BioRad). Se utilizaron cubetas de electroporación de

2mm de espesor estériles (Molecular BioProducts), que se enfriaron antes de usar. Allí se colocaron 50 µl de bacterias competentes previamente mezcladas con 2 µl del ADN a transformar. Las bacterias se transformaron usando el programa Ec2 del equipo (1 pulso de 2,5kV). Inmediatamente, se agregó a la cubeta 1ml de medio LB, y la suspensión bacteriana se

incubó 1h a 37°C para su recuperación. Transcurrido ese tiempo, 100-200µl se sembraron en una placa de LB sólido con los antibióticos correspondientes.

1.2 Agrobacterium tumefaciens

- **Cepas y condiciones de cultivo.**

Se utilizaron las cepas GV3101, que posee resistencia genómica a rifampicina (100 mg/L) y plasmídica (pTiC58) a gentamicina (100 mg/L), y LBA4404 que posee resistencia genómica a rifampicina y plasmídica (pAL4404) a estreptomicina (100 mg/L). Los cultivos de *A. tumefaciens* se crecieron en el medio LB ya descripto. El cultivo se realizó a 28ºC con agitación a 200 r.p.m.

- **Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación**

Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Una colonia aislada de *A. tumefaciens* se sembró en 5 ml de medio LB y se cultivó durante toda la noche a 28ºC con agitación. Este cultivo se utilizó como inóculo para sembrar 200 ml del mismo medio, que crecieron con agitación a 28°C hasta alcanzar una D.O.600nm de 0,5. Ambos medios de cultivo se suplementaron con los antibióticos para los cuales es resistente la cepa de *A. tumefaciens* utilizada. El cultivo se centrifugó a 1.100 g durante 15 minutos a 4ºC y el precipitado se resuspendió suavemente y en frío, en 200 ml de agua bidestilada estéril. Se volvió a centrifugar y se resuspendió el precipitado en 1 ml de glicerol 10 % estéril. Las bacterias así preparadas se separaron en alícuotas y se conservaron a -70ºC.

Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Las bacterias de *A. tumefaciens* competentes se transformaron utilizando el método descripto por Holsters *et al* (1978) [194]. Se incubaron en N2 líquido durante 10 minutos, 50 µl de medio LB, 50 µl de bacterias competentes y entre 500 ng y 1 µg de ADN, seguidos de 10 minutos a 37ºC. Este proceso de pasaje de temperatura se repitió un total de tres veces y las bacterias luego se incubaron en 5 ml de medio LB sin antibióticos durante 5 horas a 28ºC. El cultivo se concentró por centrifugación y se sembró en medio sólido selectivo incubando a 28ºC durante al menos 48 horas.

Se transformó *A. tumefaciens* (cepa GV3101) con las siguientes construcciones:

Plásmido	Antibiótico al que otorga resistencia en procariota	Agente al que otorga resistencia en plantas
PEAQ-HT Clsig GFP	Kanamicina	Kanamicina
PEAQ-HT Clsig RhlI	Kanamicina	Kanamicina
PEAQ-HT Clsig LasI	Kanamicina	Kanamicina
PEAQ-HT Clsig RhlI + His Tag	Kanamicina	Kanamicina
PEAQ-HT Clsig LasI + His Tag	Kanamicina	Kanamicina

1.3 Bacterias para ensayos de cepas indicadoras

Para los ensayos con bacterias indicadoras se utilizó *Chromobacterium violaceum* cepa CV026/12E1B (indicadora de AHLs de cadena corta), *Agrobacterium tumefaciens* cepas NTL4/pZLR4 (reportera de AHLs de cadena larga), NTL4/pTiC58DaccR (productor constitutivo de AHLs) y NTL4 (no produce AHLs). Las bacterias se crecieron en agar nutritivo (40 gr/L de agar base sangre o agar triptona-soja; 5 gr/L de extracto de levadura) a 28°C. El medio se suplementó con el antibiótico gentamicina (30 µg/ml) para la cepa NTL4/pZLR4.

Las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y MPAO1 (cepas productoras de N-3-oxo-dodecanoil-L-Homoserin lactona o 3O-C12-HSL, y N-butiril-L-Homoserin lactona o C4-HSL) y *E. coli* (como control no inductor de las bacterias indicadoras) se crecieron en el medio LB ya descripto a 28ºC y 37ºC, respectivamente.

Todas estas cepas fueron provistas por los Dres. Patricio Sobrero y Claudio Valverde, de la UNQ. Se utilizaron las cepas de *Pseudomona aeruginosa* PAO1 y MPAO1, provistas por Natalia Morero de la UNC.

2. Líneas de plantas

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* cultivares Petit Havana, *Nicotiana benthamiana* y *Solanum tuberosum* cv. Desiree para las transformaciones de cloroplastos por biobalística. Para las transformaciones mediadas por *A. tumefaciens* se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* cultivares Petit Havana.

3. Plásmidos

3.1 Comerciales

1. **pGemT-Easy** (Promega): vector de clonado, especialmente para productos de PCR amplificados con Taq Polimerasa.

2. **pZeRO-2** (Invitrogen Life Technologies): vector de clonado para productos de amplificación por PCR (preferentemente productos romos amplificados por *Pfu*).

3. **pEAQ-HT:** vector binario que posee el supresor de silenciamiento (P19), bajo el promotor y el terminador 35S. Secuencia 5´ no traducible (5´UTR) y 3´UTR derivadas de CPMV (Cowpea Mosaic Virus) que permite producir muy buenos niveles de expresión transitoria y se encuentran flanqueadas por el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la nopalina sintasa (tnos). En el extremo C o N-terminal pueden incorporarse tags de polihistidina (6xHis-tag), si se desea. Posee resistencia a kanamicina (gen NPTII).

3.2 No comerciales

1. **pHAPGusi:** Para generar este vector se utilizó como base el vector pHAP12. El pHAP12 derivado del pUC18 y que contiene la secuencia que codifica el precursor de la proteína AP24 de tabaco bajo el control transcripcional de una versión extendida del promotor 35S del CaMV (35S (L) CaMV, [195], la secuencia potenciadora de la traducción Ω del TMV (*Tobacco mosaic virus*) y la secuencia terminadora tNOS. Este plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. Lázaro Hernández (CIGB, Cuba). El fragmento Gusi se obtuvo del vector pBIN35s-Gusi y con el vector pHAP12 se generó el pHAPGusi.

2. **pBSW-utr:** plasmido desarrollado en el laboratorio del Dr. Fernando Bravo Almonacid [39]. Posee dos secuencias correspondientes al genoma plastídico de tabaco que flanquean al marcador de selección y al sitio de clonado, que permiten la integración del gen de interés junto con el marcador en la región intergénica entre los genes 16S y trn I, ambos pertenecientes al operón rrn. Este sitio seleccionado permite la integración dentro del operon rrn que se localiza en las dos regiones repetidas con orientación invertida del genoma plastídico. Además, contiene el promotor rrn del operón de genes para ARNs ribosomales plastídicos. Este es un promotor de expresión constitutiva y fuerte; reconocido por las dos ARN polimerasas presentes en el plástido, una de origen plastídica y la otra nuclear, PEP y NEP, respectivamente. Bajo este promotor se encuentra el gen selector aadA, (aminoglicosido-3-adenililtransferasa) que otorga resistencia a espectinomicina. Río arriba del sitio de clonado del gen de interés (NdeI y

XbaI sitios de restricción de corte único) el promotor y la secuencia 5' no traducible (UTR) del gen plastídico psbA, que codifica para la proteína D1 del fotosistema II. La incorporación de éste elemento se decidió en base a evidencias previas que relacionan su presencia (así como la de regiones 5' no traducibles de otros genes) con mayores niveles de expresión del transgen [92-94]. Por último, posee un terminador del gen rps16 cuyo producto es la proteína ribosomal rps16.

3. **pZErO-PA:** Brevemente, el vector pZeRO2-aadA fue cortado con las enzimas Sac I y Sac II, liberandose un fragmento conteniendo al gen aadA que fue posteriormente subclonado Parte A Resultados 48 en el vector pZeRO2-Prrn cortado con las mismas enzimas. Así se obtuvo al vector pZeRO2-PA. Este último vector fue cortado simultáneamente con las enzimas de restricción Xho I y Xba I.

4. **pGEM16S-trnA:** vector pGEM-T easy que tiene clonado un fragmento de 2.184 bp correspondiente a los genes del ARN ribosomal 16S y del ARN de transferencia para isoleucina (trnI), necesarios para que la integración de los transgenes se de por recombinacion homologa en esa región intergénica.

4. Secuencias

LasR: secuencia nucleotídica y aminoacídica de LasR. Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG) y XbaI (TCTAGA), utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita).

CAT**ATG**GCCTTGGTTGACGGTTTTCTTGAGCTGGAACGCTCAAGTGGAAAATTGGAGTGGAGCGCCATCCTGCAGAAGATGGC
GAGCGACCTTGGATTCTCGAAGATCCTGTTCGGCCTGTTGCCTAAGGACAGCCAGGACTACGAGAACGCCTTCATCGTCGGCA
ACTACCCGGCCGCCTGGCGCGAGCATTACGACCGGGCTGGCTACGCGCGGGTCGACCCGACGGTCAGTCACTGTACCCAGA
GCGTACTGCCGATTTTCTGGGAACCGTCCATCTACCAGACGCGAAAGCAGCACGAGTTCTTCGAGGAAGCCTCGGCCGCCGG
CCTGGTGTATGGGCTGACCATGCCGCTGCATGGTGCTCGCGGCGAACTCGGCGCGCTGAGCCTCAGCGTGGAAGCGGAAAA
CCGGGCCGAGGCCAACCGTTTCATGGAGTCGGTCCTGCCGACCCTGTGGATGCTCAAGGACTACGCACTGCAGAGCGGTGCC
GGACTGGCCTTCGAACATCCGGTCAGCAAACCGGTGGTTCTGACCAGCCGGGAGAAGGAAGTGTTGCAGTGGTGCGCCATCG
GCAAGACCAGTTGGGAGATATCGGTTATCTGCAACTGCTCGGAAGCCAATGTGAACTTCcatATGGGAAATATTCGGCGGAAGTT
CGGTGTGACCTCCCGCCGCGTAGCGGCCATTATGGCCGTTAATTTGGGTCTTATTACTCTC**TGA**TCTTGCCTCTAGA

MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAWREHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIF
WEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHGARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLPTLWMLKDYALQSGAGLAFEHPVSK
PVVLTSREKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNIRRKFGVTSRRVAAIMAVNLGLITL*

RhlR: secuencia nucleotídica y aminoacídica de RhlR. Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG) y XbaI (TCTAGA), utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita).

CAT**ATG**AGGAATGACGGAGGCTTTTTGCTGTGGTGGGACGGTTTGCGTAGCGAGATGCAGCCGATCCACGACAGCCAGGGCG
TGTTCGCCGTCCTGGAAAAGGAAGTGCGGCGCCTGGGCTTCGATTACTACGCCTATGGCGTGCGCCACACGATTCCCTTCACC
CGGCCGAAGACCGAGGTCCATGGCACCTATCCCAAGGCCTGGCTGGAGCGATACCAGATGCAGAACTACGGGGCCGTGGATC
CGGCGATCCTCAACGGCCTGCGCTCCTCGGAAATGGTGGTCTGGAGCGACAGCCTGTTCGACCAGAGCCGGATGCTCTGGAA
CGAGGCTCGCGATTGGGGCCTCTGTGTCGGCGCGACCTTGCCGATCCGCGCGCCGAACAATTTGCTCAGCGTGCTTTCCGTG
GCGCGCGACCAGCAGAACATCTCCAGCTTCGAGCGCGAGGAAATCCGCCTGCGGCTGCGTTGCATGATCGAGTTGCTGACCC
AGAAGCTGACCGACCTGGAGCATCCGATGCTGATGTCCAACCCGGTCTGCCTGAGCCATCGCGAACGCGAGATCCTGCAATG
GACCGCCGACGGCAAGAGTTCCGGGGAAATCGCCATCATCCTGAGCATCTCCGAGAGCACGGTGAACTTCCACCACAAGAAC
ATCCAGAAGAAGTTCGACGCGCCGAACAAGACGCTGGCTGCCGCCTACGCCGCGGCGCTGGGTCTCATC**TGA**AGCTCTAGA

MRNDGGFLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEVHGTYPKAWLERYQMQNYGAVDPAIL
NGLRSSEMVVWSDSLFDQSRMLWNEARDWGLCVGATLPIRAPNNLLSVLSVARDQQNISSFEREEIRLRLRCMIELLTQKLTDLEHP
MLMSNPVCLSHREREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKKFDAPNKTLAAAYAAALGLI*

LasB: secuencia nucleotídica del promotor de elastasa LasB. En subrayado se indican los sitios SpeI (ACTAGT) y NdeI (CATATG) utilizados para el subclonado y en negrita las secuencias putativas del operadoras OP2 y OP1.

ACTAGTTCGACGTCATCGATTTCCGCGGCCAGGAAAGCGTGCAACTGATGATCGTCCACATGGCCCCTCGCTGAGCGCGTCCC
GGAGCTGGGGGCAACCTAGCTGCC**ACCTGCTTTTCTGCTAGCT**ATTCCAGCGAAAACATACAGATTTCCGGCGAAATCAAGGC
T**ACCTGCCAGTTCTGGCAGGT**TTGGCCGCGGGTTCTTTTTGGTACACGAAAGCACCGTCGAAAACGGGACCGAGCCAGGGGA
GTGCAGTTCCTTCTACCCGAAGGACTGATACGGCTGTTCCGATCAGCCCACAAGGCGGCGGTAAGCGTCGGCCGAGTACTTC
GGCCTGAAAAAACCAGGAGAACTGAACCATATG

SD+IEE: secuencia nucleotídica del elemento de expresión intercistronico (IEE) con la secuencia Shine-Dalgarno (SD). Subrayado se indican los sitios HindIII (AAGCTT) y NdeI (CATATG) utilizados para el subclonado

CATATGAATCCCTCCCGTCGACTTGAGATCTGTTGACTTTGTATACCATTCCGTTGTAAATAAACGATCCTAAGCTT

LasI (genebank NCBI CP017306.1)**:** secuencia nucleotídica y aminoacídica de LasI. En negrita se marca el codón de inicio y terminación de la sintasa endógena. Por el diseño de clonado se genera un cambio nucleotidico de una A por una C (resaltada en gris), lo que genera en las proteínas maduras un cambio de isoleucina por leucina.

ATGCTCGTACAAATTGGTCGGCGCGAAGAGTTCGATAAAAAACTGCTGGGCGAGATGCACAAGTTGCGTGCTCAAGTGTTCAA
GGAGCGCAAAGGCTGGGACGTTAGTGTCATCGACGAGATGGAAATCGATGGTTATGACGCACTCAGTCCTTATTACATGTTGAT
CCAGGAAGATACTCCTGAAGCCCAGGTTTTCGGTTGCTGGCGAATTCTCGATACCACTGGCCCCTACATGCTGAAGAACACCTT

CCCGGAGCTTCTGCACGGCAAGGAAGCGCCTTGCTCGCCGCACATCTGGGAACTCAGCCGTTTCGCCATCAACTCTGGACAG
AAAGGCTCGCTGGGCTTTTCCGACTGTACGCTGGAGGCGATGCGCGCGCTGGCCCGCTACAGCCTGCAGAACGACATCCAGA
CGCTGGTGACGGTAACCACCGTAGGCGTGGAGAAGATGATGATCCGTGCCGGCCTGGACGTATCGCGCTTCGGTCCGCACCT
GAAGATCGGCATCGAGCGCGCGGTGGCCTTGCGCATCGAACTCAATGCCAAGACCCAGATCGCGCTTTACGGGGGAGTGCTG
GTGGAACAGCGACTGGCGGTTTCA**TGA**

MLVQIGRREEFDKKLLGEMHKLRAQVFKERKGWDVSVIDEMEIDGYDALSPYYMLIQEDTPEAQVFGCWRILDTTGPYMLKNTFPEL
LHGKEAPCSPHIWELSRFAINSGQKGSLGFSDCTLEAMRALARYSLQNDIQTLVTVTTVGVEKMMIRAGLDVSRFGPHLKIGIERAVAL
RIELNAKTQIALYGGVLVEQRLAVS*

RhlI (genebank NCBI AAG06864.1)**:** secuencia nucleotídica y aminoacídica de RhlI. En negrita se marca el codón de inicio y terminación de la sintasa endógena. Por el diseño de clonado se genera un cambio nucleotidico de una A por una C (resaltada en gris), lo que genera en las proteínas maduras un cambio de isoleucina por leucina.

ATGCTCGAATTGCTCTCTGAATCGCTGGAAGGGCTTTCCGCCGCCATGATCGCCGAGCTGGGACGCTACCGGCATCAGGTCTT
CATCGAGAAGCTGGGCTGGGACGTGGTCTCCACCTCCAGGGTCCGCGACCAGGAATTCGACCAGTTCGACCATCCGCAAACC
CGCTACATCGTCGCCATGAGCCGCCAGGGCATCTGCGGTTGCGCCCGCCTGCTGCCGACGACCGACGCCTACCTGCTCAAGG
ACGTCTTCGCCTACCTGTGCAGCGAAACCCCGCCGAGCGATCCGTCGGTCTGGGAGCTTTCGCGCTACGCCGCCAGCGCGGC
GGACGATCCGCAGCTGGCGATGAAGATATTCTGGTCCAGCCTGCAATGCGCCTGGTACCTGGGCGCCAGTTCGGTGGTGGCG
GTGACCACCACGGCCATGGAGCGCTATTTCGTTCGCAACGGCGTGATCCTCCAGCGCCTCGGCCCGCCGCAGAAGGTCAAGG
GCGAGACGCTGGTCGCGATCAGCTTCCCGGCCTACCAGGAGCGCGGCCTGGAGATGCTGCTGCGCTACCACCCGGAATGGC
TGCAGGGCGTACCGCTGTCGATGGCGGTG**TGA**

MLELLSESLEGLSAAMIAELGRYRHQVFIEKLGWDVVSTSRVRDQEFDQFDHPQTRYIVAMSRQGICGCARLLPTTDAYLLKDVFAYL
CSETPPSDPSVWELSRYAASAADDPQLAMKIFWSSLQCAWYLGASSVVAVTTTAMERYFVRNGVILQRLGPPQKVKGETLVAISFPA
YQERGLEMLLRYHPEWLQGVPLSMAV*

Péptido de transito: secuencia nucleotídica del péptido de direccionamiento a cloroplasto de la subunidad menor de RuBisCO. Subrayado se indican los sitios NruI (TCGCGA) y SphI (GCATGC) utilizados para el subclonado y en negrita el codón de iniciación.

TCGCGA**ATG**GCTTCCTCAGTTCTTTCCTCTGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCAATGTTGCTCAAGCTAACATGGTTGCACCTTTC
ACTGGCCTTAAGTCAGCTGCCTCATTCCCTGTTTCAAGGAAGCAAAACCTTGACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGA
GTGCAATGCATGC

MASSVLSSAAVATRSNVAQANMVAPFTGLKSAASFPVSRKQNLDITSIASNGGRVQC

Gus: secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen *uidA*. Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG) y XbaI (TCTAGA), utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita).

CAT**ATG**TTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAAAC
TGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTT
CGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGC
GTATCGTGCTGCGTTTCGATGCGGTCACTCATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGC
TATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTG
AACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTCTTTAAC
TATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCGC
GCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAAC
AGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTC
TATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAA
GGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGACTTGCGTGGCAAAGG
ATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTA
CGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTT
AGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAAGCGCAC
TTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATAC
CCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCACCTGC
GTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGG
TATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAAACTGCATCAGCC
GATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGT
GTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTCGCCGATTTT
GCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTT
TTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAA**TGA**ATCTAGA

5. Oligonucleótidos iniciadores

Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados a lo largo de este trabajo se muestran en la siguiente tabla. Los nucleótidos sombreados corresponden a la secuencia de los sitios enumerados en la tercera columna. RBS: secuencia GGAGG, sitio de unión del ribosoma.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Sitios
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	
Fw	GTA TCT GGG GAA TAA GCA TCG G	
Rv	CGA TGA CGC CAA CTA CCT CTG	
TrbcL_Fw	CGTAAAGCTTCTAGACATTAGCAGATAAATTAG	HindIII y XbaI
TrbcL_Rv	CGATTTTGATTAAGCTTACTAGATTTTG	HindIII

TpsbA-Fw	GAAGCTCCATCTAGAAATGGATAAGA	XbaI
TpsbA-Rv	GAAGCGGCCGCTATTCCTAGGATT	NotI
LasR-Fw	GAGAAGAACGTAGCCATATG	NdeI
LasR-Rv	GGACTCTAGAGGCAAGATCAGAG	XbaI
RhlR-Fw	CGATCAGGGCTTACTCATATG	NdeI
RhlR-Rv	GCGTCTAGAGCTTCAGATGAG	XbaI
pLasB-Fw	CTACTAGTTCGACGTCATCGATTTCC	SpeI
pLasB-Rv	GAAACCTTCTTCATATGGTTCAG	NdeI
LasI Fw	CGCATGCTCGTACAAATTGGTCGGC	SphI
LasI Rv_XhoI	CCTCGAGTCATGAAACCGCCAGTCG	XhoI
LasI Rv_XmaI	GCCCGGGTGAAACCGCCAGTCG	XmaI
RhlI Fw	CGCATGCTCGAATTGCTCTCTGAATCG	SphI
RhlI Rv_XhoI	CCTCGAGTCACACCGCCATCGAC	XhoI
RhlI Rv_XmaI	GCCCGGGCACAGCCATCGACAG	XmaI
Cl sig_Fw	AATCGCGAATGGCTTCCTCAGTTC	NruI
Cl sig_Rv	CAGCATGCATTGCACTCTTC	SphI
aadA-UTR Fw	CATACTTGAAGCTAGACAGG	
TrnI-gen Rev	CTCTACCACTGAGCTAATAGCC	
Prrn-aadA Fw	GCGGTAAAAGGAGGTTAAAC	
Gus5_-Rv-2015	GAATATCTGCATCGGCGAAC	
psbA AUbox	GTCCCTGATGATTAAATAAACCAAG	
Gus5´Rev_2015	GAATATCTGCATCGGCGAAC	

6. Metodología del ADN recombinante

6.1 Aislamiento de ADN plasmídico

- **Mini preparación de ADN plasmídico**

Método de lisis alcalina

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de medio LB suplementado con antibióticos y se cultivó toda la noche con agitación a 37ºC. Se cosecharon por centrifugación entre 1,5 y 4,5 ml de cultivo y se resuspendieron en 300 µl de solución 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, ribonucleasa A 100 µg/ml). Se agregaron 300 µl de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos. Se agregaron luego, 300 µl de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugaron las muestras a 15.000 g durante 10 minutos a 4ºC. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, al cual se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente 15000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 %, se secó y se resuspendió en 30 µl de H2O bidestilada.

Purificación de ADN plasmídico utilizando matrices comerciales de fibra de vidrio

Las preparaciones de ADN plasmídico para secuenciación y bombardeo se hicieron utilizando el sistema de purificación *Wizard plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo el protocolo suministrado en el kit. El sistema consiste en una modificación del método de lisis alcalina, en la que el paso de precipitación del ADN con isopropanol, se reemplazó por el pasaje a través de una columna conteniendo una matriz de fibra de vidrio. El ADN unido diferencialmente a la columna se eluyó con 50 a 100 µl de H_2O de acuerdo a la concentración final de ADN deseada.

6.2 Preparación de plásmidos e insertos

- **Amplificación de insertos por PCR**

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR, se hizo utilizando las enzimas *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) o *Pfu* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), de acuerdo a las condiciones sugeridas y con los *buffers* suministrados por la empresa

proveedora. Se utilizaron 10 ng de ADN molde y entre 100 y 150 ng de cada oligonucléotido iniciador por reacción.

Para obtener los elementos del sistema de *quórum sensing* se realizó una colony PCR utilizando como ADN molde una colonia de *P. aeruginosa*.

- **Corte con enzimas de restricción**

Los cortes de plásmidos e insertos de ADN para clonado, así como los mapeos de restricción, se realizaron con enzimas comerciales de acuerdo a las condiciones especificadas por cada empresa proveedora (New England Biolabs, Promega, Amersham Biosciences, Gibco BRL). Todas las reacciones se incubaron entre 1 y 2 horas a la temperatura correspondiente y utilizando 5 unidades de enzima por cada µg de ADN. Los productos cortados se separaron por electroforesis en geles de agarosa entre 1 y 2 % en TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM pH 8, EDTA disódico 2 mM) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización por exposición a luz UV en un transiluminador *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech).

- **Rellenado de extremos 5´ extendidos**

El rellenado de extremos 5´ extendidos generados por restricción, se hizo por polimerización con el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli* (New England Biolabs). El ADN cortado se llevó a una concentración de 50 ng/µl en cualquiera de los *buffers* de restricción y se incubó con 33 µM de cada dNTP y 1 unidad de Klenow por cada µg de ADN, a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo incubándola a 75ºC durante 20 minutos. Puesto que esta enzima puede conservar parte de su actividad 3´-5´ exonucleasa luego del tratamiento con calor, se hizo una extracción fenólica para asegurar su inactivación y evitar el posible daño de los extremos rellenados.

- **Desfosforilación de extremos compatibles**

Los plásmidos con extremos romos y cohesivos compatibles, se desfosforilaron previamente a la reacción de ligación. Se utilizó la fosfatasa alcalina SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Promega), en las condiciones indicadas por el fabricante. El ADN purificado se incubó a 37ºC durante 15 minutos con 1 unidad de SAP por cada µg de ADN, en el *buffer* suministrado con la enzima, en 50 µl de reacción. La enzima se inactivó calentando la mezcla de reacción a 65ºC durante 15 minutos.

- **Purificación de plásmidos y fragmentos de ADN**

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de Agarosa.

Los plásmidos, fragmentos de ADN y productos de PCR se separaron e identificaron por electroforesis en geles de agarosa entre 1 y 2 % en TAE 1X y geles de agarosa de bajo punto de fusión 1 % (*Low Melt Point Agarose*, Gibco BRL). Las bandas de interés se cortaron del gel y el ADN se purificó utilizando sistemas comerciales basados en el pegado diferencial del ADN a una matriz de fibra de vidrio (*Wizard PCR Preps DNA Purification System*, Promega).

Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se hicieron utilizando la ADN ligasa del fago T4 (Gibco BRL; Invitrogen Life Technologies). Se usaron entre 25 y 50 ng de plásmido y relaciones molares de extremos plásmido: inserto variables entre 1:1 y 1:10. En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado junto con la enzima en un volumen final de 20 µl de reacción. La cantidad de T4 ADN ligasa utilizada varió de acuerdo a las características de los extremos a ligar. Se utilizaron 0,1 y 1 unidad de enzima por reacción cuando se intentaban ligar extremos cohesivos o romos respectivamente y 0,5 unidades cuando ambos tipos de extremos estaban presentes. Las reacciones se incubaron a 16ºC entre 4 y 16 horas.

- **Condiciones especiales de ligada. Productos de PCR**

Los productos de amplificación con *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) se ligaron al vector pGEM-T-Easy (Promega) utilizando la ADN ligasa y el *buffer* de ligación rápida suministrados junto con el vector de clonado. La reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Los fragmentos amplificados con las ADN polimerasas *Pfu* o *Pfx* (Invitrogen Life Technologies) se subclonaron en el vector pZeRO-2 (Invitrogen Life Technologies), utilizando el *buffer* y la ADN ligasa suministradas. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 16°C.

7. Ensayos de actividad enzimática

7.1 Ensayo histoquímico para detectar actividad β-glucuronidasa

La actividad β-glucuronidasa fue evaluada cualitativamente utilizando como sustrato X-Gluc que da lugar a un precipitado color azul.

Solución de revelado GUS: NaH2PO4 100 mM pH 7, K4Fe(CN)6 0,5 mM, EDTA-Na2 10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-glucurónico) 1 mM El sustrato (X-Gluc, USB) se prepara disolviendo 50mg en 1 ml de DMSO (stock 100X, conservar a -20°C), que se mezcla con la solución de revelado al momento de usar.

- **Ensayos de detección en material vegetal**

Muestras tomadas de hojas de plantas transplastómicas, controles o transformaciones transitorias, se sumergieron en solución de revelado con X-Gluc (en algunos casos para la tinción se aplicó vacío para facilitar la entrada del sustrato). Las muestras se incubaron a 37°C durante una noche, y al día siguiente se decoloraron con etanol 80% para extraer los pigmentos y así facilitar la observación de color azul.

7.2 Ensayo fluorométrico para detectar activividad β-glucuronidasa

La actividad β-glucuronidasa fue evaluada cuantitativamente utilizando un sustrato cuyo producto es detectable por fluorometría (4-metill-umbelliferona o 4-MU). Para ello se utilizó un fluorómetro modelo TKO100 de Hoefer. Las muestras se procesaron en el buffer de extracción GUS como se indicó oportunamente; luego de tomar una alícuota para cuantificación de proteínas, se agregaron inhibidores de proteasas (PMSF 1mM). El experimento se llevó a cabo incubando una alícuota de 50 µl de una dilución del extracto (en buffer de extracción GUS) en 150 µl buffer de reacción [(se compone de buffer de extracción GUS más el sustrato 4-MUG (4-methyl-umbeliferil-β-D-glucuronido) 1mM] a 37°C. Se tomaron alícuotas de 20 µl a distintos intervalos de tiempo que se diluyeron en 1,98ml de una solución de frenado de la reacción enzimática (Na2CO3 50nM). Posteriormente, se cuantificó la aparición de producto comparando la absorbancia observada respecto a una curva patrón construída con distintas concentraciones del producto (4-MU).

7.3 Ensayos para detectar AHLs

- **Análisis de la funcionalidad de las construcciones utrQS-RhlR, utrQS-LasR y utrQS-LasR+RhlR en bacterias**

El ensayo se realizó colocando sobre una placa de agar nutritivo, top agar conteniendo las bacterias *P. aeruginosa* MPAO1 (cepa productora de 3-oxo-C12-HSL y C4-HSL) o *E. coli* (control no inductor), y el sustrato X-Gluc. Luego, sobre este top agar se colocaron alícuotas de cultivos crecidos en medio líquido de las bacterias recombinantes a ensayar y bacterias controles. Además, se incluyó como controles *E. coli* transformada con el plásmido utrGus (control positivo de actividad β-glucuronidasa), y *E. coli* no transformada (control negativo). Las construcciones utrQS-RhlR, utrQS-LasR y utrQS-LasR+RhlR fueron utilizadas para transformar *E. coli* cepa BW27343 CGSC#7924 que no posee actividad β-glucuronidasa. Las placas se incubaron a 37°C y, a las 72hs se evaluó la aparición de producto coloreado.

- **Ensayo para detectar N-acil-L-homoserin lactonas (AHLs) de cadena corta**

Estos ensayos se realizaron a partir de placas de agar nutritivo sobre la cual se realizaron dos estrias paralelas (separadas entre si a 10-15 mm) de CV026/12E1B a partir de un cultivo fresco de esta bacteria. A cada lado de las líneas, y a una distancia de 5 mm se depositó una gota de 5 µl de cultivos crecidos en agitación durante toda la noche de *P. aeruginosa* MPAO1 y *E. coli* DH10B. Luego se incubaron las placas a 28°C durante 48-72 hs.

- **Ensayo para detectar N-acil-L-homoserin lactonas (AHLs) de cadena larga**

En una placa de agar TSA (tripteína-soja 4 gr/L y agar 15g/L) se colocó top ágar conteniendo 4 ml de ágar blando (0,8% en H_2O), 500 µl de un cultivo saturado de *A. tumefaciens* cepa NTL4/pZLR4 y X-gal 0,01% w/v. Una vez solidificada la capa de ágar indicador, se depositó 5 µl de cultivos saturado de las cepas a testear o de las AHLs sintéticas (C4-HSL y 3-oxo-C12-HSL de sigma-aldrich). Como controles se utilizaron *A. tumefaciens* NTL4 y NTL4/pTiC58ΔaccR. Las cajas se incubaron a 28°C durante 48-72 hs.

8. Ensayos de expresión transitoria en plantas de tabaco

8.1 Agroinfiltración con A. tumefaciens

- **Protocolo de crecimiento en condiciones no inductoras de los genes *vir***

A partir de nuevas colonias provenientes de cultivos en placa, se cultivaron de los clones de A. tumefaciens deseados de medio LB con los antibióticos correspondientes; los mismos crecieron durante la noche a 28ºC. Al día siguiente se utilizaron para inocular un cultivo de

mayor volúmen de medio LB que creció en las mismas condiciones. Cuando la DO 600nm alcanzó un valor de entre 0,6 y 1,2, los cultivos se centrifugaron a 3.000g durante 10min. Las células precipitadas se resuspendieron con agua en cantidad suficiente para alcanzar una DO 600nm de 0,4. La suspensión se cargó en jeringas de 1ml (sin aguja) con las que se ejerció presión sobre la cara abaxial de hojas jóvenes expandidas (en la planta entera o separadas de ella), a fin de forzar la entrada de las bacterias al espacio intercelular. Al cabo de 4 a 7 días se evaluó la expresión del transgen de interés.

- **Protocolo de crecimiento con inducción de los genes *vir***

A partir de estrías frescas, se largaron cultivos de los clones de *A. tumefaciens* deseados en medio LB con los antibióticos correspondientes; los mismos se crecieron durante la noche a 28ºC. Al día siguiente se utilizaron para iniciar un cultivo de mayor volúmen en medio LB crecido en condiciones de inducción de los genes vir [196]. Para ellos se inocularon 100ml de LB suplementado con 1ml de MES 1M (Sigma-Aldrich), antibióticos, y 2mM de acetosiringona (Sigma-Aldrich, preparada en DMSO). Luego de crecer toda la noche a 28ºC y 200rpm de agitación, una vez alcanzada una DO 600nm de entre 0,6 y 1,2, se cosecharon las células por centrifugación a 4.000g durante 8min. El precipitado se resuspendió en un volúmen de buffer MMA suficiente para obtener una DO 600nm de 2 (1L de MMA: 5g de sales MS, 1,95g de MES, 20g de sacarosa; el pH se ajustó a 5,6 con NaOH) y una concentración final de 200mM de acetosiringona. Los cultivos obtenidos fueron infiltrados con jeringas en hojas de plantas jóvenes de tabaco (de aproximadamente 4-5 hojas).

8.2 Bombardeo con micropartículas

Partículas de oro se recubrieron con el ADN del plásmido de interés según el protocolo que se detalla más adelante. Se bombardearon secciones de hojas con las micropartículas empleando parámetros indicados en cada caso. La evaluación de la expresión del transgen (generalmente uidA) se realizó a las 48hs de efectuados los disparos. Durante ese lapso, el material vegetal se conservó en una cámara húmeda en oscuridad.

9. Transformación de plantas de tabaco

9.1 Transformación de plantas de tabaco mediada por *A. tumefaciens*

La transformación de plantas de *N. tabacum* cv Petit Havana por *A. tumefaciens* se hizo siguiendo el protocolo descripto por Horsch et al (1985) [197]. Brevemente, se cortaron discos de unos 2 a 4 cm 2 de hojas de plantas cultivadas in vitro a los que se hicieron pequeñas heridas y se los incubó entre 30 minutos y una hora en 20 ml de medio MS líquido [198] con 20 µl de un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante crecido durante toda la noche. Los discos se secaron entonces sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y se transfirieron a frascos con medio MS sólido (MS adicionado con 0,8 % de agar), suplementado con las hormonas ácido α-naftalenacético (ANA) 0,1 mg/L (SigmaChemical) y 6-bencilaminopurina (BAP) 1 mg/L (Sigma Chemical). Como controles de regeneración y eficacia del agente selectivo se sometió a un grupo de discos de hojas al mismo tratamiento pero omitiendo el agregado del cultivo de *A. tumefaciens*. Los frascos se incubaron durante 48 horas a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Transcurridas las 48 horas de co-cultivo los discos se transfirieron a nuevos frascos conteniendo medio MS sólido suplementado con hormonas (ANA 0,1 mg/L, BAP 1 mg/L), agente selector kanamicina 50 mg/L y cefotaxime 200 mg/L. De los explantos control 10 discos se repicaron a un medio conteniendo el agente selector para verificar la efectividad de la selección y 10 discos se transfirieron a un frasco sin selector como control de regeneración. La incubación se hizo a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y los discos se repicaron a medio fresco con hormonas y antibióticos cada 3 semanas.

Los brotes, que aparecieron entre 30 y 60 días más tarde, se separaron del explanto y se repicaron a medio MS sólido sin hormonas y suplementado con el agente selector más el bacteriostático para que desarrollen raíces. Las plantas se mantuvieron in vitro realizando repiques a medio MS sólido conteniendo el agente selector cada 4 semanas.

9.2 Transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística.

- **Preparación de los microtransportadores (micropartículas de oro) de 0,6µm.**

Se mezclaron 50 mg de partículas de oro de 0,6 µm de diámetro (0,6 µm Gold Microcarriers Bio-Rad), por agitación con vortex durante 2 minutos en 1 ml de etanol absoluto y se centrifugaron a 15.000 g durante 2 a 5 minutos a 4 o C. Se descartó el sobrenadante y se agregó al precipitado 1 ml de etanol 70 %, resuspendiendo con agitación durante 1 y 2 minutos. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando cada 3 minutos y se volvió a centrifugar a 15.000 g durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 1 ml de agua estéril, resuspendiendo con vortex y

centrifugando a 15.000 g durante 2 minutos cada vez. Finalmente, las partículas se resuspendieron en 1 ml de glicerol 50 % estéril y se conservaron a -20ºC.

- **Recubrimiento de los microtransportadores de oro de 0,6µm con el ADN.**

Se tomaron 50 µl de la preparación de partículas de oro resuspendidas con la ayuda de un vortex y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Se agregaron en orden secuencial y agitando con vortex cada vez, 10 µg del plásmido para transformar, a una concentración de 1 µg/µl, 5 µl de CaCl 2 2,5 M y 20 µl de espermidina 0,1 M. La mezcla se incubó con agitación a 4ºC durante 20 minutos. Luego se agregaron 200 µl de etanol absoluto, se agitó con vortex y se centrifugó a 800 g durante 1 minuto a 4 o C. Se descartó el sobrenadante con pipeta y con cuidado de no remover el precipitado. Las partículas se lavaron de esta misma forma 5 veces con 200 µl de etanol absoluto, resuspendiendo muy bien entre cada centrifugación. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 45 µl de etanol absoluto, conservándose en hielo un máximo de 2 horas hasta su utilización.

- **Bombardeo de hojas de tabaco.**

Los macrotransportadores (Macrocarriers, Bio-Rad), previamente esterilizados por inmersión en etanol 100 % durante 15 minutos, se secaron en el flujo laminar y se ensamblaron con los soportes para macrotransportadores (Macrocarrier Holders, Bio-Rad) esterilizados por inmersión en etanol 100%. Entre 7 y 8 µl de los microtransportadores recubiertos con el ADN, se distribuyeron sobre la zona central de los macrotransportadores y se dejaron secar en el flujo laminar. Entretanto, se cortaron hojas jóvenes de plantas de *N. tabacum* cv Petit Havana y *N.benthamiana* germinadas in vitro y se colocaron con la cara abaxial hacia arriba sobre un disco de papel de filtro (Whatman International) de 6 a 7 cm de diámetro, en una placa de petri con medio RMOP (sales MS, tiamina 1 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, sacarosa 30 g/l, ANA 0,1 mg/L, BAP 1 mg/L, agar 0,8 %).

El bombardeo se hizo utilizando el dispositivo para biobalística PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad). Los discos de ruptura (1.100 psi Rupture Disks, Bio-Rad) se esterilizaron con etanol 100 % y se dejaron secar en el flujo laminar. Un disco de ruptura por disparo se sumergió en isopropanol, e inmediatamente retirado del mismo se ensambló en la rosca soporte (Rupture Disk Retaining Cap) sellando la cámara de alta presión de helio. Se colocaron una malla de detención (Stopping Screen, Bio-Rad) y el macrotransportador cargado con la mezcla de partículas de oro y ADN, en la bandeja de detención (Stopping Plate). La distancia

entre el disco de ruptura y la cubierta del macrotransportador (Macrocarrier Cover Lid) fue de 0,625 cm (1/4 de pulgada) y la distancia entre el macrotransportador y la malla de retención de 11 mm. La bandeja con la placa de petri conteniendo la hoja a bombardear se colocó a una distancia de 9 cm para *N. tabacum* cv Petit Havana y de 6 cm para *N. benthamiana* en la bandeja de detención. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta alcanzar una presión de 28 mmHg. A continuación, se permitió el ingreso de helio con una presión de 1350 psi hasta que se produjo el disparo. Se liberó el vacío y las hojas bombardeadas se incubaron en oscuridad a 26ºC durante 48 horas. Como control el primer disparo siempre se hizo utilizando un macrotransportador no cargado con partículas.

Transcurrida la incubación y luego de eliminar la nervadura central, cada hoja se cortó en fragmentos de 2 a 4 cm^2, que se transfirieron a medio RMOP suplementado con espectinomicina 500 mg/L. La mitad de los discos de la hoja sometida al primer disparo sin partículas se transfirieron a medio RMOP suplementado con espectinomicina (control de selección) y la otra mitad a medio RMOP sin agente selectivo (control de regeneración). Los discos se incubaron a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Al cabo de un mes comenzaron a aparecer los primeros brotes que se transfirieron a medio MS con sacarosa 3%, sin hormonas, y suplementado con espectinomicina 500 mg/L. De las plantas que desarrollaron raíces en medio selectivo se cortaron discos de hoja y se volvieron a cultivar en medio RMOP y espectinomicina (segunda ronda de regeneración). Las plantas transformadas se sometieron al menos a dos rondas de regeneración en medio selectivo antes de ser transferidas a tierra.

9.3 Transformación de cloroplastos de papa por biobalística.

El protocolo para la preparación de las micropartículas de oro de 0,6µm y su recubrimiento con ADN es similar al utilizado para la transformación de cloroplastos de tabaco.

- **Bombardeo de hojas de papa**

El protocolo se basa en el publicado por Nguyen y col., 2005 [199], con algunas diferencias. Hojas jóvenes de plantas de *S. tuberosum* var. Desiree crecidas in vitro durante 1 mes se cortaron, y se colocaron con la cara abaxial hacia arriba sobre un papel de filtro estéril, en una placa conteniendo medio inductor de callos [CIM: sales MS (Phytotech-Lab) + 1,6% glucosa (Sigma-Aldrich) + agar 0,8% (Phytotech-Lab) + 2mg/L 2,4-D (Sigma-Aldrich) + 0,9mg/L trans-ZeatinRibósido (Sigma-Aldrich)] durante las 24 horas previas a realizar el experimento de bombardeo. Todos los elementos necesarios para el bombardeo se prepararon de forma

similar a lo descripto para tabaco. Entre 7 y 8 µl de los microtransportadores recubiertos con el ADN, se distribuyeron sobre la zona central de los macrotransportadores y se dejaron secar en el flujo laminar.

El bombardeo se hizo utilizando el dispositivo para biobalística PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad), con discos de ruptura de 1.100 psi. La distancia entre el disco de ruptura y la cubierta del macrotransportador fue de 1/4 de pulgada, y la distancia entre el macrotransportador y la malla de retención de 11 mm. La bandeja con la placa de petri conteniendo la hoja a bombardear se colocó a una distancia de 6 cm de la bandeja de detención. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta alcanzar una presión de 28 mmHg. A continuación se permitió el ingreso de helio con una presión de 1350 psi hasta que se produjo el disparo. Se liberó el vacío y las hojas bombardeadas se incubaron en oscuridad a 26ºC durante 48-72 horas. Como control el primer disparo siempre se hizo utilizando un macrotransportador no cargado con partículas. Transcurrida la incubación, cada hoja se cortó en fragmentos de 3 a 5 mm^2, que se transfirieron a medio CIM suplementado con espectinomicina 300 mg/L. La mitad de los discos de la hoja sometida al primer disparo sin partículas se transfirieron a medio CIM suplementado con espectinomicina (control de selección) y la otra mitad a medio CIM sin agente selectivo (control de regeneración). Los discos se incubaron a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Al cabo de un mes los explantos se repicaron a un medio inductor de brotes [SIM: MS + 1,6% glucosa + agar 0,8% + 3 mg/L ZR + 2 mg/L ácido indol acético (AIA, Sigma-Aldrich) + 1 mg/L ácido giberélico (GA3, Sigma Aldrich) + 300 mg/L espectinomicina)]. Un mes después comenzaron a aparecer los primeros brotes y callos. Los primeros se transfirieron a medio MS sacarosa 2% suplementado con espectinomicina 400 mg/L.

Rusticación

Para su pasaje a tierra, las raíces de cada planta se lavaron cuidadosamente con agua corriente para eliminar los restos de medio y se plantaron en macetas conteniendo una mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita. Durante la primera semana, las plantas se mantuvieron cubiertas con un film de polietileno para evitar su deshidratación en el proceso de adaptación a las nuevas condiciones de humedad. El crecimiento se hizo en un invernadero cerrado con un fotoperíodo controlado de 14/10 horas luz/oscuridad y a una temperatura de entre 25 y 30ºC.

Esterilización y germinación de semillas de tabaco in vitro.

Se sumergieron las semillas en etanol 70 % y luego se traspasó a una solución 1:10 de lavandina comercial, en la que se incubaron durante 3 minutos. A continuación, se hicieron cinco pasajes sucesivos por agua estéril para eliminar los restos de lavandina, se secaron y sometieron a un período de vernalización (48hs a 4°C en oscuridad). Posteriormente se sembraron en medio MS sólido para germinar, a 26ºC con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

10. Análisis de ADN

10.1 Aislamiento del ADN de plantas de tabaco.

- **Preparación de ADN total para PCR.**

Se molieron en un tubo de microcentrífuga 50 mg de hoja con la ayuda de un vástago plástico de punta cónica y se agregaron 350 µl de solución de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA disódico 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 1% y 2-mercaptoetanol 10 mM). Se resuspendió por agitación y se incubó a 65ºC durante 10 minutos. Luego se agregaron 150 µl de acetato de potasio 3 M, pH 5,5 frío, agitando por inversión e incubando en hielo durante 20 minutos. Transcurrida la incubación se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a 4ºC y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 µl de ribonucleasa A 100 µg/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos. El ADN se precipitó con 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con etanol 80 %, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 25 µl de H_2O bidestilada.

- **Preparación de ADN total para *Southern blot*.**

Se utilizó una modificación del protocolo de purificación de ADN desarrollado por Dellaporta [200]. Se molió 1 gramo de tejido vegetal fresco con nitrógeno líquido en un mortero hasta formar un polvo fino. Se agregaron 5 ml de buffer CTAB (CTAB, bromuro de hexadecil trimemil amonio, Sigma Chemical) 2 %, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA disódico 20 mM pH 8 y 2-mercaptoetanol 0,2 %) pre-calentado a 65ºC y se incubó a esa misma temperatura en un tubo de polipropileno entre 30 minutos y 1 hora agitando cada 10 minutos. Posteriormente, se agregó un volumen de cloroformo y se agitó con vortex. Luego de centrifugar a 5.000 g durante 10 minutos a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo. Se adicionó ribonucleasa A, a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 37ºC durante 30 minutos. Luego de la incubación se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol

frío y se mezcló suavemente por inversión. Cuando se formó el ovillo de ADN, este se tomó con un ansa y se transfirió a un tubo de microcentrífuga conteniendo 1 ml de etanol 70 %. Cuando el ovillo no se formó, se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos y el precipitado se lavó con etanol 70 %. En ambos casos el precipitado se secó y se resuspendió a 4ºC toda la noche, con agitación suave, en 1 ml de H_2O bidestilada.

10.2 PCR para chequeo de plantas transgénicas.

Una primera evaluación de las plantas transformadas con *A. tumefaciens* se hizo mediante la amplificación por PCR de las secuencias específicas LasI o RhlI utilizando los oligonucleótidos LasI Fw y LasI Rv_XhoI y RhlI Fw y RhlI Rv_XhoI, respectivamente. El tamaño de los fragmentos esperados fue de 615 pb. Aproximadamente 100 ng del ADN purificado, contenidos en un volumen final de 25 µl de H_2O, se desnaturalizaron a 95ºC durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se colocaron los tubos en hielo y se agregó a cada uno, 25 µl de la mezcla de reacción para PCR conteniendo 100 ng de cada oligonucleótido iniciador, 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 0,4 mM de una mezcla de los cuatro dNTPs y 3 mM $MgCl_2$, en el buffer suministrado con la enzima. Se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 40 segundos a 62ºC y 2 minutos a 72ºC en un termociclador Mastercycler (Eppendorf), con una incubación previa a 94ºC durante 5 minutos y una final a 72ºC durante 10 minutos, para completar la polimerización.

10.3 PCR para chequeo de plantas transplastómicas.

La integración del ADN en el genoma plastídico se verificó por amplificación por PCR. Dependiendo de las plantas analizadas, se utilizaron distintos oligonucleótidos específicos. En todos los casos, 2,5 ng del ADN extraído, se llevaron a 25 µl con H_2O y se desnaturalizaron a 95ºC durante 5 minutos. Transcurrida la incubación se colocaron los tubos en hielo y se agregaron a cada uno, 25 µl de la mezcla de reacción para PCR conteniendo 150 ng de cada oligonucleótido iniciador, 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 0,4 mM de una mezcla de los cuatro dNTPs y 3 mM $MgCl_2$, en el buffer suministrado con la enzima. Se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 55ºC (este paso varía según las características de cada par de oligonucleótidos) y 2 minutos a 72ºC en un termociclador Mastercycler (Eppendorf), con una incubación previa a 94ºC durante 5 minutos y una final a 72ºC durante 10 minutos, para completar la polimerización.

10.4 Ensayo de *Southern blot*.

La integración del transgén en las plantas transgénicas nucleares y la integración y homoplastía en las plantas transplastómicas se evaluaron en ensayos de Southern blot. Extracciones de ADN total (7 µg) de las plantas transformadas a nivel nuclear, se incubaron durante una hora con 40 unidades de la enzima correspondiente, utilizado el buffer sugerido. Luego se agregó espermidina (Sigma Chemical) a una concentración final de 1 mM y se volvió a incubar a 37°C, durante toda la noche. En el caso de las plantas transplastómicas, 2 µg de ADN total se cortaron con 20 unidades de Nco I (New England Biolabs), en el buffer sugerido por la empresa, a 37°C durante toda la noche, con el agregado de espermidina 1 mM final luego de la primer hora de incubación. Como controles se utilizaron extracciones de ADN total de *N. tabacum* cv Petit Havana y *N. benthamiana* sin transformar, cortado con las mismas enzimas.

- **Electroforesis y transferencia del ADN a membranas de nylon.**

El ADN cortado se separó por electroforesis en geles de agarosa 0,8 % en TAE 1X, a 30 mA de corriente constate durante toda la noche. Los geles se lavaron con agua, se incubaron en HCl 0,25 M durante 10 minutos, y luego en 10 volúmenes de solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M) durante 20 minutos, con agitación suave. El ADN se transfirió por capilaridad con NaOH 0,4 M a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences).

- **Hibridación y lavados.**

Las membranas conteniendo el ADN se incubaron en 15 ml de solución de hibridación Church (SDS 7 %, BSA 1 %, buffer sodio fosfato 1 M pH 7,2, 0,2 % y EDTA-Na_2 1 mM, pH 8) durante 2 horas a 65ºC en un horno de hibridación rotatorio. Luego de esta pre-hibridación, se reemplazó la solución por una fresca, a la cual se agregó la sonda previamente desnaturalizada por incubación a 100°C durante 5 min.y; se incubó toda la noche a 65ºC. Al otro día, se descartó la solución con la sonda y se hizo un lavado con una solución de SSC 2X, SDS 0,1 % seguido de tres lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con 1): SSC 2X, SDS 0,1 % a temperatura ambiente, 2): SSC 2X, SDS 0,1 % a 65ºC y 3): SSC 0,2X, SDS 0,1 % a 65ºC. (20X SSC: Citrato de Sodio 300 mM pH 7, NaCl 3 M). Las membranas se expusieron a placas radiográficas (Kodak X-Omat, Kodak) a -70ºC por períodos de tiempo variables. En todos los casos se utilizó una pantalla amplificadora de la señal. Cuando fue necesario rehibridizar una

membrana, la sonda se eliminó de la membrana sumergiéndola en una solución de SDS 0,1 %, precalentada a 100ºC y se incubó hasta que ésta alcanzó la temperatura ambiente.

- **Preparación de los moldes para las sondas.**

Molde para la sonda aadA.

El fragmento molde para la sonda aadA, se obtuvo por amplificación por PCR de la secuencia aadA (800 pb) del plásmido pPZP200, utilizando como iniciadores los oligonucleótidos aadA5 y aadARev.

Molde para la sonda trnI/A.

La sonda trnI/A se obtuvo por purificación del fragmento de 815 pb obtenido a partir del plásmido pBS16S-23S por corte con las enzimas BamH I y Bgl II correspondientes a las posiciones 104805 y 105620 respectivamente del genoma plastídico de tabaco.

Molde para la sonda uidA.

El fragmento molde para la sonda uidA (570 pb), se obtuvo por amplificación por PCR del vector pBSW5´UTRGUS, utilizando los iniciadores psbA AU-box y Gus5´Rev_2015.

Molde para la sonda RhlR.

El fragmento molde para la sonda de RhlR se obtuvo por amplificación por PCR de la secuencia RhlR (730pb) sobre el plásmido UTR-QS-RhlR, utilizanco como iniciadores los oligonucleótidos RhlR Rv_Noe y RhlR Rv 6.

Molde para la sonda LasR.

La sonda LasR (730pb) se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando como iniciadores los oligonucleótidos LasR-Rv y LasRRv_Noe utilizando como molde el plasmido UTR-QS-LasR.

Molde para la sonda AP24 y Glucanasa

Se cortó el plásmido UTR AP24/Glucanasa con las enzimas de digestión SalI y EcoRI y se purificaron las bandas de 602 y 1039 pb correspondientes a las sondas AP24 y Glucanasa.

- **Marcado radiactivo de las sondas.**

Las sondas utilizadas en los ensayos de *Southern* y *northern blot* se prepararon mediante el sistema de iniciación al azar Prime-a-gene (Promega). 25 ng de fragmento molde se desnaturalizaron por incubación a 95ºC durante 5 minutos y se mezclaron con 400 µg/ml de seroalbúmina bovina, 5 unidades de Klenow ADN polimerasa I, 20 µM de dATP, dGTP y dTTP, 50 µCi (333 nM) de α- 32 P dCTP 3000 Ci/mmol y el buffer de marcación 5X, que contiene los oligonucleótidos iniciadores, en un volumen final de 50 µl. Esta mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La reacción se detuvo calentando a 95ºC 2 minutos y por agregado de EDTA a una concentración final de 20 mM.

- **Purificación por columnas comerciales.**

Se utilizaron columnas microSpin HR200 (Amersham Biosciences) siguiendo los protocolos sugeridos por los fabricantes.

Todo el trabajo con material radiactivo se hizo en un cuarto aislado destinado a tal fin y de acuerdo con las normativas establecidas por el Ente Regulador de la Energía Atómica.

11. Análisis de ARN

11,1 Extracción del ARN total de plantas de tabaco.

El ARN total de las plantas transformadas y de los controles sin transformar se purificó por extracción con TRIzol (Invitrogen Life Technologies).

Se congelaron 200 mg de hojas de tabaco en N_2 líquido y se molieron en un mortero previamente lavado con una solución de SDS 1 %. Se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a 4ºC y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,5 ml de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguidos de una

centrifugación a 15000 g durante 10 minutos a 4ºC. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75 %, se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de H_2O incubando a 60ºC durante 10 minutos.

11.2 Ensayo de *northern blot.*

- **Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.**

Entre 5 y 20 µg de ARN se sembraron en geles de agarosa 1,5 % en condiciones desnaturalizantes La muestra se preparó incubando 15 µl de la extracción de ARN con 54 µl de mezcla de siembra (MOPS 10X 166 µl, formaldehído 37 % 300 µl y formamida 830 µl) a 65ºC durante 10 minutos, seguidos de 2 minutos en hielo. Se agregó entonces bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml y buffer de siembra 1X (glicerol 5 %, azul de bromofenol 0,02 %), ambos libres de ribonucleasas. Para armar el gel desnaturalizante, se fundieron 1,5 gramos de agarosa en 72 ml de H 2 O, se dejó enfriar, y antes de que comience a gelificar, se agregaron 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehído 37 %. La electroforesis se realizó a 65 V constantes en una solución conteniendo 100 ml de MOPS 10X, 180 ml de formaldehído 37 % y 720 ml de H_2O (MOPS 10X: MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,05 M, EDTA disódico 0,01 M, pH7).

- **Transferencia a membranas de nylon.**

Una vez finalizada la electroforesis los geles se lavaron con agua y el ARN se transfirió por capilaridad a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences), utilizando como buffer de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0,3 M, pH 7).

- **Hibridación y marcación de sondas.**

La hibridación de las membranas y la marcación radioactivas de las sondas para los *northern blot* se realizaron utilizando los mismos protocolos que para las membranas de *Southern blot* descriptos anteriormente. Sin embargo, para algunos de los *northern blot* mostrados utilizamos el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science), a continuación se detalla su protocolo de uso. Con este método se marcaron las sondas AP24, glucanasa, LasR, RhlR y TrnI/A.

- **Pre-hibridación, hibridación y revelado utilizando kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection**

La pre-hibridación, hibridacíon y revelado se hicieron utilizando el protocolo y los reactivos provistos en el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection (Roche Applied Science). Pre-hibridamos la membrana en buffer DIG Easy Hyb a 42°C con agitación en un horno de hibridación (MARCA) por 2 horas. En simultáneo, desnaturalizamos la sonda marcada con digoxigenina (DIG) hirviendo por 5 minutos y luego enfriando en hielo y luego agregamos un volumen adecuado de buffer DIG Easy Hyb para llevar la sonda a la concentración deseada. Una vez concluidas las dos horas de pre-hibridación, adicionamos el buffer con sonda a la membrana y dejamos hibridando a 42°C por aproximadamente 18 horas/toda la noche. Una vez concluido el tiempo de hibridación, se guardó el buffer con sonda y se lavó la membrana dos veces en una solución de SSC 2X y SDS 0,1% a temperatura ambiente, luego una vez en SSC 0,5X y SDS 0,1% y una vez en SSC 0,2X y SDS 0,1%, ambos lavados a 68°C. Una vez concluidos estos lavados, se lavó la membrana brevemente con buffer de lavado (0,1 M ácido málico, 0,15 M NaCl, 0,3% v/v Tween 20, pH 7,5) y se incubó por 30 minutos en la solución de bloqueo incluida en el kit, con agitación. Concluidos los 30 minutos de bloqueo, se pasó a incubar la membrana por 30 minutos en una solución con anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina, incluida en el kit. Una vez concluida la incubación con el anticuerpo, se lavó la membrana dos veces con buffer de lavado y se pasó a un buffer de detección (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) para equilibrarla antes de iniciar la reacción de detección. La membrana se transfirió a un folio y se reveló agregando 1 ml de CPSD un sustrato quimioluminiscente. Se registró la emisión de luz a 477 nm producto de la desfosforilación enzimática del CSPD llevada a cabo por la fosfatasa alcalina con un equipo GeneGenome XRQ (Syngene).

- **Marcación y determinación de la eficiencia de marcación de la sonda DIG**

Se sintetizaron sondas marcadas con digoxigenina-dUTP a partir de los fragmentos molde amplificados por PCR mencionados previamente. Se agregaron 300 ng de ADN molde y se llevaron a un volumen de 16 µl. Se desnaturalizó el ADN hirviendo por 10 minutos, se lo enfrio en hielo y se agregaron 4 µl de una solución incluida en el kit DIG-High Prime con todos los reactivos necesarios para la marcación. La reacción se incubó por 20 horas a 37°C y luego se detuvo calentando a 65°C por 10 minutos. Para la determinación de la sonda, se realizaron diluciones seriadas tanto de la sonda como de una muestra de DNA de concentración conocida y se sembraron en una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences). Luego de fijar las muestras a la membrana por crosslinking con UV, se reveló la membrana siguiendo el

protocolo provisto en el Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection (Roche Applied Science). Comparando la intensidad observada para las distintas diluciones de la sonda con la de las diluciones de concentración conocida de DNA se pudo determinar la concentración efectiva de la sonda sintetizada. Con este método se marcaron las sondas aadA y Gus.

12. Análisis de proteínas

12.1 Extracción de proteínas.

- **Extracción de proteínas totales de hojas de tabaco**

Entre 10 y 50 mg de tejido vegetal se molieron con N_2 líquido y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X pH 7,2 (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO 4 14,4 g/l, KH_2PO_4 2 g/l) con o sin el agregado de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM). Estos homogenatos se usaron directamente para medir proteínas totales. Para los ensayos de western blot, se agregó buffer de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 0,2 %, azul de bromofenol 0,02 mg/ml) a las extracciones en PBS, directamente al tejido vegetal molido.

- **Extracción de proteínas totales de E. coli.**

Se cosecharon por centrifugación entre 1 y 2 ml de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche a 37°C. El sedimento de bacterias se resuspendió en 500 µl de buffer de extracción (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, EDTA-Na 2 10 mM, PMSF 1 mM), se congeló a –70ºC durante 15 minutos y se sonicó en 3 pulsos de 30 segundos cada uno. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15000 g durante 30 minutos a 4ºC y el sobrenadante se utilizó directamente para medir proteínas totales, para ensayos de ELISA o para ensayos de western blot.

- **Cuantificación de proteínas totales.**

Las proteínas totales contenidas en los extractos de plantas y de bacterias se cuantificaron utilizando el sistema BCA protein assay (Pierce), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como estándar se utilizó una curva realizada con distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (Sigma Chemical).

12.2 Electroforesis de proteínas.

- **Geles de SDS - poliacrilamida para electroforesis en buffer Tris-Glicina.**

Se prepararon geles de poliacrilamida desnaturalizantes de 10 x 10 cm y de 1 ó 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema armador SE 260 Mini Vertical Unit (Hoeffer) de acuerdo a los protocolos publicados [201].

Las muestras se prepararon en buffer de siembra 1X o buffer de siembra 1X no reductor y calentadas a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar totalmente las proteínas. La electroforesis se realizó a 25 mA constantes en buffer Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

- **Tinción con Coomasie Brillant Blue.**

Los geles se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche en solución de tinción (Coomasie Brillant Blue R250 0,05 %, metanol 40 %, ácido acético 10 %). Luego esta solución se reemplazó por solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %) y se incubó a temperatura ambiente.

12.3 Ensayo de *Western blot.*

- **Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.**

Se utilizó el sistema de transferencia Mini Trans-Blot (Bio-Rad) y membranas de nitrocelulosa Hybond C (Amersham Biosciences). La transferencia se llevó a cabo a 80V constantes, durante 45 minutos usando como buffer de transferencia Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20 %.

- **Inmunodetección de las proteínas electrotransferidas.**

Luego de la transferencia, se incubaron las membranas en solución de bloqueo (4 % de leche descremada en buffer TTBS: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (o toda la noche a 4ºC) y con agitación suave. Transcurrida la incubación, se agregó a la solución el primer anticuerpo, diluido en TTBS con 4% de leche, y se incubó una hora más a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con TTBS y se agregó una solución de leche 4 % en TTBS conteniendo el segundo

anticuerpo según corresponda: anti-IgG de ratón 1/1000 (Gibco BRL) o anti-IgG de conejo 1/5000 (Gibco BRL) conjugados a fosfatasa alcalina. Se incubó durante una hora y se hicieron luego otros dos lavados de 5 minutos cada uno con TTBS y un lavado de 5 minutos con TBS (TTBS sin el agregado de Tween).

- **Revelado con NBT/BCIP.**

Los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina se revelaron utilizando como sustrato cromogénico una mezcla de NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma Chemical) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Sigma Chemical). Luego del último lavado con TTBS se hizo una incubación durante 10 minutos en buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM). Transcurrida la incubación, cada membrana se reveló en oscuridad, con 10 ml de buffer fosfatasa conteniendo 30 µl de BCIP (30 mg/ml en dimetilformamida 100 %) y 30 µl de NBT (50 mg/ml, en dimetilformamida 70 %).

13. Ensayos de inducción del sistema de QS

13.1 Inducción del sistema de QS en plantas transplastómicas

Las plantas se germinaron y crecieron en medio MS en condiciones de esterilidad. Luego de 26 dias posteriores a la germinación se aplicaron sobre las hojas, mediante un spray o pincelando, las moléculas inductoras del sistema (AHLs). Luego las plantas permanecieron durante 48 hs en condiciones de fotoperiodo y temperatura controladas. Para los diferentes tiempos se tomaron 3 plantas y se colocaron en la solución histoquímica para detectar actividad β-glucuronidasa. Las AHLs, N-(3-oxododecanoil)-L-homoserín lactona (3O-C12-HSL) y N-(butiril)-homoserín lactona (C4-HSL) de Sigma-Aldrich se prepararon en DMSO y luego se llevaron a la concentración de trabajo con medio MS diluido al medio.

13.2 Induccion *in vitro* de machacado de hojas

Se tomaron 6 discos de hojas de plantas adultas de tierra y se macharon en 400µl de PBS 1X con inhibidor de proteasas PMSF (1 mM). A este machacado se le agregó 100µl de 3O-C12-HSL y C4-HSL y se dejó incubando en agitación durante 24 y 48hs. Luego de esos tiempos se midio la actividad β-glucuronidasa mediante un ensayo fluorométrico.

14. Ensayos de infección de plantas transplastómicas de tabaco

Los ensayos se realizaron con las plantas transplastómicas utrAP24/Glucanasa 2 y 6. En todos los casos se utilizaron como controles positivos de infección plantas *wild-type* y plantas transplastómicas utrGus.

- **Inoculación con *Rhizoctonia solani***

Se cultivaron las plantas de tabaco transgénico y plantas control (*N. tabacum* cv. Petit Havana SR1) en macetas y se mantuvieron en cámaras de crecimiento a 23°C. Se utilizó un aislado agresivo perteneciente al grupo de anastomosis n. 3 de *R. solani* (caracterizado por secuenciación de regiones ITS que coincide con el aislado AG3, GenBank accession number HQ241274.1).

El aislamiento se creció en medio agar dextrosa de papa a temperatura ambiente (22-25°C) durante 5 días. Se retiraron los inóculos a partir del agar colonizados y se transfirieron a un recipiente que contenía granos de arroz autoclavados. Se permitió que el patógeno colonizara los granos de arroz por aproximadamente 2 semanas a temperatura ambiente y los granos se utilizaron luego para inocular la tierra. Plantas de tabaco de dos semanas de edad fueron inoculadas con seis granos sobre la superficie del suelo de acuerdo con Elliott et al. (2008) [202]. Los síntomas típicos causados por *R. solani* se evaluaron visualmente una semana después de la inoculación (wpi). El crecimiento de *R. solani* en tabaco se estimó por PCR cuantitativa en tiempo real una semana después de la inoculación. El grado de colonización (biomasa del hongo) se determinó analizando el gen de β-actina de *R. solani* que se expresa constitutivamente usando los iniciadores 5´CTTCTCACCGAGGCTCCACT´3 y 5´TGGAACCGTATGCGTCACTC´3. Los productos de amplificación se secuenciaron y confirmaron que correspondían a la β-actina de *R. solani* (número de acceso: KC285905.1). La incidencia de la enfermedad, porcentaje de plantas que mostraron muerte, se evaluó después de un wpi de acuerdo con Elliott et al. (2008) [202]. Se realizó una transformación de arcsine en todos los datos de porcentaje de incidencia antes del análisis estadístico con el fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional utilizando GraphPad Prism Software Inc. (La Jolla, CA, EE.UU.). La diferencia significativa entre los valores medios se determinó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey $P<0,0001$.

- **Infección con *Phytophthora parasitica var. nicotianae***

El patógeno *P. parasitica* var. *Nicotianae* raza 0 utilizado en este estudio se aisló de plantas de tabaco infectadas naturalmente en el campo en La Habana, Cuba. El aislamiento fue identificado y clasificado a través de secuenciación de la región ITS la cual coincidió con la secuencia de GenBank número de acceso DQ059571.1.

Para determinar el rendimiento de las plantas de tabaco en condiciones de campo, se realizaron ensayos con tabacos en un suelo con una alta incidencia de *P. parasitica* var. *Nicotianae*. Las líneas transgénicas y las plantas de control se evaluaron sembrando noventa plantas de dos semanas de edad de cada línea. El desarrollo de lesiones en el vástago se evaluó utilizando una escala lineal de 1-10, donde 1 se corresponde con ausencia de enfermedad y 10 corresponde a una planta muerta de acuerdo con Csinos (1999) [203]. Las mediciones se tomaron en tallos a los cinco días después de la inoculación. Además, el crecimiento de *P. parasitica* var. Nicotianae en tabaco se estimó mediante PCR cuantitativa en tiempo real 10 días después de la siembra. El grado de colonización se determinó mediante la cuantificación de un gen expresado constitutivamente en el patógeno usando los cebadores 5'TTCACATCCAGGGTTGGTCAG3' y 5 'CACGGACCGAGTCCATTGTA3', respectivamente. Se secuenciaron los productos de amplificación y se confirmó que correspondían a la *P. parasitica* var. Nicotianae (número de acceso: DQ059571.1). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional utilizando GraphPad Prism Software Inc. (La Jolla, CA, EE.UU.). La diferencia significativa entre los valores medios se determinó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey P <0.0001.

- **Infección con *Peronospora hyoscyami* f. sp*. tabacina***

P. hyoscyami f. Sp. *Tabacina* fue aislado de un campo de tabaco cerca de La Habana, se identificó y clasificó a través de la secuenciación de la región ITS que coincide con el aislado perteneciente al número de acceso DQ067898.1. Para determinar el rendimiento de las plantas de tabaco en condiciones de campo, se realizaron los ensayos en el área de La Habana que presenta una alta concentración de inóculo donde *P. hyoscyami* f. Sp. *Tabacina* es un problema importante para la producción de tabaco cada año. Durante la estación fría y húmeda, las líneas transgénicas y las plantas de control fueron evaluadas plantando noventa plantas de tabaco de 8 semanas de edad de cada línea en el área. Las plantas fueron plantadas con un diseño aleatorio para observar los efectos de posición en el campo y se realizaron cinco repeticiones. Se determinaron los porcentajes de plantas sanas a los 35 días posteriores a la siembra, donde más de tres manchas azules por hoja se consideraron como una planta poco saludable. Además, el crecimiento de *P. hyoscyami* f. *Sp. Tabacina* en las plantas de tabaco se estimó por PCR cuantitativa en tiempo real. El grado de colonización

(biomasa fúngica) se determinó mediante el estudio del gen ARN ribosomal 18S que se expresa constitutivamente usando los iniciadores 5'GCTGCTGGCATCTTTTTGCT3' y 5'TTCATCGATGTGCGAGCCTA3', respectivamente. Los productos de amplificación se secuenciaron y confirmaron que correspondían a *P. hyoscyami* f. Sp. *tabacina* (número de acceso: DQ067899.1). Se realizó una transformación de arcseno en todos los datos porcentuales antes del análisis estadístico con el fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional utilizando GraphPad Prism Software Inc. (La Jolla, CA, EE.UU.). La diferencia significativa entre los valores medios se determinó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey P <0.0001.

- **Extracción y cuantificación de ADN de hongos y oomicetos**

Las muestras de plantas (500 mg) se trituraron en un homogeneizador TissueLyser II (Qiagen, Alemania). Las muestras se recogieron e inmediatamente se pusieron en nitrógeno líquido. El ADN total se extrajo de acuerdo con el método de Qiagen kit (Qiagen, Maryland, EE.UU.). Las preparaciones de ADN se ajustaron a 100 ng de ADN / µl y se almacenaron a -20ºC. Para la PCR en tiempo real, se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Maryland, EE.UU.). La reacción de SYBR Green se realizó en una mezcla de reacción de 25 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó una máquina de PCR Rotor - Gene 3000 (Corbett, Australia) con el siguiente programa para la amplificación: una etapa inicial de desnaturalización a 95ºC durante 15 min, seguido de desnaturalización durante 15 segundos a 95ºC, hibridación durante 30 segundos a 60ºC, y extensión durante 30 segundos a 72°C, se realizaron 40 ciclos. Para la detección de la biomasa de hongos y oomicetes las secuencias de oligonucleótidos iniciadores se diseñaron utilizando el software Primer 3 (http://simgene.com/Primer3). El procedimiento de detección se validó realizando una curva estándar utilizando un fragmento de ADN generado para cada patógeno durante la validación. Cada muestra de ADN utilizada en la reacción de PCR en tiempo real se realizó por triplicado y la cuantificación absoluta se analizó con el software Rotor-Gene 3000 (Corbett, Australia). Todos los productos de qPCR generados fueron secuenciados para validar la identidad. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA bidireccional utilizando GraphPad Prism Software Inc. (La Jolla, CA, EE.UU.). La diferencia significativa entre los valores medios se determinó por comparación utilizando el test Bonferroni de comparaciones múltiples a P <0,0001.

Bibliografia

1. Oerke, E.C., *Crop losses to pests.* The Journal of Agricultural Science, 2006. **144**(1): p. 31-43.
2. FAO, *How to Feed the World in 2050.* 2009.
3. FAOSTAT. *Disponible en el vínculo http://www.potato2008.org/*. 2008.
4. Reynolds, M.P., et al., *Global crop improvement networks to bridge technology gaps.* J Exp Bot, 2012. **63**(1): p. 1-12.
5. Doebley, J.F., B.S. Gaut, and B.D. Smith, *The molecular genetics of crop domestication.* Cell, 2006. **127**(7): p. 1309-21.
6. Strange, R.N. and P.R. Scott, *Plant disease: a threat to global food security.* Annu Rev Phytopathol, 2005. **43**: p. 83-116.
7. Chakraborty, S. and A.C. Newton, *Climate change, plant diseases and food security: an overview.* Plant Pathology, 2011. **60**(1): p. 2-14.
8. Caldiz, D.O., *Producción, cosecha y almacenamiento de papa en la Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.* 2007.
9. FAOSTAT. *Disponible en el vínculo http://www.potato2008.org*. 2008.
10. Miller, P., *Multilingual Compendium of Plant Diseases.* Am. Phytopathol. Soc., St. Paul Minnesota, 1976.
11. Bouzo, C.A., *El cultivo de la Papa en Argentina* Documento publicado en el marco del Curso Cultivos Intensivos II, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Litoral, Argentina., 2009.
12. Andreu, A.B., D.O. Caldiz, and G.A. Forbes, *Phenotypic Expression of Resistance to Phytophthora infestans in Processing Potatoes in Argentina.* American Journal of Potato Research, 2010. **87**(2): p. 177-187.
13. Glazebrook, J., *Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.* Annu Rev Phytopathol, 2005. **43**: p. 205-27.
14. Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones, *Biochemistry & molecular biology of plants*. 2000, Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists. xxxix, 1367 p.
15. Veronese, P., et al., *In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy.* Plant Physiol, 2003. **131**(4): p. 1580-90.
16. Zipfel, C., *Pattern-recognition receptors in plant innate immunity.* Curr Opin Immunol, 2008. **20**(1): p. 10-6.
17. Zipfel, C. and G. Felix, *Plants and animals: a different taste for microbes?* Curr Opin Plant Biol, 2005. **8**(4): p. 353-60.
18. Macho, A.P. and C. Zipfel, *Plant PRRs and the activation of innate immune signaling.* Mol Cell, 2014. **54**(2): p. 263-72.
19. Liu, J., J.M. Elmore, and G. Coaker, *Investigating the functions of the RIN4 protein complex during plant innate immune responses.* Plant Signal Behav, 2009. **4**(12): p. 1107-10.
20. Monaghan, J. and C. Zipfel, *Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane.* Curr Opin Plant Biol, 2012. **15**(4): p. 349-57.
21. Win, J., et al., *Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2012. **77**: p. 235-47.
22. Jones, J.D. and J.L. Dangl, *The plant immune system.* Nature, 2006. **444**(7117): p. 323-9.
23. Ron, M. and A. Avni, *The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato.* Plant Cell, 2004. **16**(6): p. 1604-15.
24. Thomma, B.P., T. Nurnberger, and M.H. Joosten, *Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy.* Plant Cell, 2011. **23**(1): p. 4-15.
25. Lee, S.W., et al., *From the Academy: Colloquium review. Unique characteristics of Xanthomonas oryzae pv. oryzae AvrXa21 and implications for plant innate immunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18395-400.
26. Spoel, S.H. and X. Dong, *How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 89-100.

27. Vlot, A.C., D.F. Klessig, and S.W. Park, *Systemic acquired resistance: the elusive signal(s).* Curr Opin Plant Biol, 2008. **11**(4): p. 436-42.
28. Durrant, W.E. and X. Dong, *Systemic acquired resistance.* Annu Rev Phytopathol, 2004. **42**: p. 185-209.
29. van Loon, L.C., M. Rep, and C.M. Pieterse, *Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.* Annu Rev Phytopathol, 2006. **44**: p. 135-62.
30. Park, S.W., et al., *Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance.* Science, 2007. **318**(5847): p. 113-6.
31. Kiefer, I.W. and A.J. Slusarenko, *The pattern of systemic acquired resistance induction within the Arabidopsis rosette in relation to the pattern of translocation.* Plant Physiol, 2003. **132**(2): p. 840-7.
32. Fu, Z.Q., et al., *NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants.* Nature, 2012. **486**(7402): p. 228-32.
33. Pink, D. and I.I. Puddephat, *Deployment of disease resistance genes by plant transformation - a 'mix and match' approach.* Trends Plant Sci, 1999. **4**(2): p. 71-75.
34. Stuiver, M.H. and J.H. Custers, *Engineering disease resistance in plants.* Nature, 2001. **411**(6839): p. 865-8.
35. Jach, G., et al., *Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco.* Plant J, 1995. **8**(1): p. 97-109.
36. Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones, eds. *Biochemistry & molecular biology of plants*. 2015, American Society of Plant Physiologists: Rockville, Md.
37. Daniell, H., et al., *Complete chloroplast genome sequences of Solanum bulbocastanum, Solanum lycopersicum and comparative analyses with other Solanaceae genomes.* Theor Appl Genet, 2006. **112**(8): p. 1503-18.
38. Wirth, S., et al., *Accumulation of hEGF and hEGF-fusion proteins in chloroplast-transformed tobacco plants is higher in the dark than in the light.* J Biotechnol, 2006. **125**(2): p. 159-72.
39. Segretin, M.E., et al., *Transformation of Solanum tuberosum plastids allows high expression levels of beta-glucuronidase both in leaves and microtubers developed in vitro.* Planta, 2012. **235**(4): p. 807-18.
40. Morgenfeld, M., et al., *Potato virus X coat protein fusion to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast.* Mol Biotechnol, 2009. **43**(3): p. 243-9.
41. Lentz, E.M., et al., *High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants.* Planta, 2010. **231**(2): p. 387-95.
42. Lentz, E.M., et al., *Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco.* Planta, 2012. **236**(2): p. 703-14.
43. Daniell, H., et al., *Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 88-92.
44. Svab, Z., P. Hajdukiewicz, and P. Maliga, *Stable transformation of plastids in higher plants.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8526-30.
45. De Cosa, B., et al., *Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals.* Nat Biotechnol, 2001. **19**(1): p. 71-4.
46. Oey, M., et al., *Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic.* Plant J, 2009. **57**(3): p. 436-45.
47. Flavell, R.B., *Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3490-6.
48. Dougherty, W.G. and T.D. Parks, *Transgenes and gene suppression: telling us something new?* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(3): p. 399-405.
49. Daniell, H., et al., *Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome.* Nat Biotechnol, 1998. **16**(4): p. 345-8.

50. DeGray, G., et al., *Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi.* Plant Physiol, 2001. **127**(3): p. 852-62.
51. Mittler, R. and L. Rizhsky, *Transgene-induced lesion mimic.* Plant Mol Biol, 2000. **44**(3): p. 335-44.
52. Tomasz, A., *Control of the competent state in Pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria.* Nature, 1965. **208**(5006): p. 155-9.
53. Nealson, K.H., T. Platt, and J.W. Hastings, *Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system.* J Bacteriol, 1970. **104**(1): p. 313-22.
54. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria.* Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 165-99.
55. Fuqua, C., M.R. Parsek, and E.P. Greenberg, *Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing.* Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 439-68.
56. Galiana, E., S. Fourre, and G. Engler, *Phytophthora parasitica biofilm formation: installation and organization of microcolonies on the surface of a host plant.* Environ Microbiol, 2008. **10**(8): p. 2164-71.
57. Harding, M.W., et al., *Can filamentous fungi form biofilms?* Trends Microbiol, 2009. **17**(11): p. 475-80.
58. Xavier, K.B. and B.L. Bassler, *LuxS quorum sensing: more than just a numbers game.* (1369-5274 (Print)).
59. Beck von Bodman, S. and S.K. Farrand, *Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in Erwinia stewartii require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer.* J Bacteriol, 1995. **177**(17): p. 5000-8.
60. Welch, M., et al., *N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in Erwinia.* EMBO J, 2000. **19**(4): p. 631-41.
61. Finney, A.H., et al., *Role of the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in LuxR-dependent transcriptional activation of the lux operon during quorum sensing.* J Bacteriol, 2002. **184**(16): p. 4520-8.
62. Laue, B.E., et al., *The biocontrol strain Pseudomonas fluorescens F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase.* Microbiology, 2000. **146 (Pt 10)**: p. 2469-80.
63. Pearson, J.P., C. Van Delden, and B.H. Iglewski, *Active efflux and diffusion are involved in transport of Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signals.* J Bacteriol, 1999. **181**(4): p. 1203-10.
64. Passador, L., et al., *Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication.* Science, 1993. **260**(5111): p. 1127-30.
65. Brint, J.M. and D.E. Ohman, *Synthesis of multiple exoproducts in Pseudomonas aeruginosa is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family.* J Bacteriol, 1995. **177**(24): p. 7155-63.
66. Pearson, J.P., et al., *Structure of the autoinducer required for expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 197-201.
67. Pearson, J.P., et al., *A second N-acylhomoserine lactone signal produced by Pseudomonas aeruginosa.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1490-4.
68. Jones, S., et al., *The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in Erwinia carotovora and Pseudomonas aeruginosa.* EMBO J, 1993. **12**(6): p. 2477-82.
69. Davies, D.G., et al., *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.* Science, 1998. **280**(5361): p. 295-8.
70. de Kievit, T.R. and B.H. Iglewski, *Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships.* Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4839-49.
71. Seed, P.C., L. Passador, and B.H. Iglewski, *Activation of the Pseudomonas aeruginosa lasI gene by LasR and the Pseudomonas autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy.* J Bacteriol, 1995. **177**(3): p. 654-9.

72. Ochsner, U.A. and J. Reiser, *Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in Pseudomonas aeruginosa.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6424-8.
73. Latifi, A., et al., *A hierarchical quorum-sensing cascade in Pseudomonas aeruginosa links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS.* Mol Microbiol, 1996. **21**(6): p. 1137-46.
74. Pearson, J.P., E.C. Pesci, and B.H. Iglewski, *Roles of Pseudomonas aeruginosa las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes.* J Bacteriol, 1997. **179**(18): p. 5756-67.
75. Whiteley, M., M.R. Parsek, and E.P. Greenberg, *Regulation of quorum sensing by RpoS in Pseudomonas aeruginosa.* J Bacteriol, 2000. **182**(15): p. 4356-60.
76. Winzer, K., et al., *The Pseudomonas aeruginosa lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS.* J Bacteriol, 2000. **182**(22): p. 6401-11.
77. Borghi, L., *Inducible Gene Expression Systems for Plants*, in *Plant Developmental Biology: Methods and Protocols*, L. Hennig and C. Köhler, Editors. 2010, Humana Press: Totowa, NJ. p. 65-75.
78. Lü, H., et al., *Construction of chimeric inducible promoters by elicitors of rice fungal blast pathogen and their expression in transgenic rice.* Chinese Science Bulletin, 2000. **45**(3): p. 242-246.
79. You, Y.S., et al., *Use of bacterial quorum-sensing components to regulate gene expression in plants.* Plant Physiol, 2006. **140**(4): p. 1205-12.
80. Lossl, A., et al., *Inducible trans-activation of plastid transgenes: expression of the R. eutropha phb operon in transplastomic tobacco.* Plant Cell Physiol, 2005. **46**(9): p. 1462-71.
81. Lossl, A., et al., *Polyester synthesis in transplastomic tobacco (Nicotiana tabacum L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction.* Plant Cell Rep, 2003. **21**(9): p. 891-9.
82. Caddick, M.X., et al., *An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism.* Nat Biotechnol, 1998. **16**(2): p. 177-80.
83. Tungsuchat, T., et al., *Gene activation in plastids by the CRE site-specific recombinase.* Plant Mol Biol, 2006. **61**(4-5): p. 711-8.
84. Muhlbauer, S.K. and H.U. Koop, *External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial lac repressor.* Plant J, 2005. **43**(6): p. 941-6.
85. Buhot, L., et al., *Hybrid transcription system for controlled plastid transgene expression.* Plant J, 2006. **46**(4): p. 700-7.
86. Verhounig, A., D. Karcher, and R. Bock, *Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6204-9.
87. Ling, E.A., M.L. Ellison, and E.C. Pesci, *A novel plasmid for detection of N-acyl homoserine lactones.* Plasmid, 2009. **62**(1): p. 16-21.
88. Fray, R.G., et al., *Plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones communicate with bacteria.* Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 1017-20.
89. Toth, I.K., et al., *Potato plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones increase susceptibility to soft rot erwiniae.* Mol Plant Microbe Interact, 2004. **17**(8): p. 880-7.
90. Scott, R.A., et al., *Long- and short-chain plant-produced bacterial N-acyl-homoserine lactones become components of phyllosphere, rhizosphere, and soil.* Mol Plant Microbe Interact, 2006. **19**(3): p. 227-39.
91. Steindler, L. and V. Venturi, *Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors.* FEMS Microbiol Lett, 2007. **266**(1): p. 1-9.
92. Staub, J.M. and P. Maliga, *Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids.* Plant J, 1994. **6**(4): p. 547-53.
93. Eibl, C., et al., *In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency.* Plant J, 1999. **19**(3): p. 333-45.

94. Zou, Z., C. Eibl, and H.U. Koop, *The stem-loop region of the tobacco psbA 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency.* Mol Genet Genomics, 2003. **269**(3): p. 340-9.
95. Newell, C.A., et al., *Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts.* Transgenic Res, 2003. **12**(5): p. 631-4.
96. Zhou, F., D. Karcher, and R. Bock, *Identification of a plastid intercistronic expression element (IEE) facilitating the expression of stable translatable monocistronic mRNAs from operons.* Plant J, 2007. **52**(5): p. 961-72.
97. McClean, K.H., et al., *Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones.* Microbiology, 1997. **143 (Pt 12)**: p. 3703-11.
98. Cha, C., et al., *Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria.* Mol Plant Microbe Interact, 1998. **11**(11): p. 1119-29.
99. Sainsbury, F., E.C. Thuenemann, and G.P. Lomonossoff, *pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants.* Plant Biotechnol J, 2009. **7**(7): p. 682-93.
100. Angel, C.A. and J.E. Schoelz, *A survey of resistance to Tomato bushy stunt virus in the genus Nicotiana reveals that the hypersensitive response is triggered by one of three different viral proteins.* Mol Plant Microbe Interact, 2013. **26**(2): p. 240-8.
101. Loon, L.V., *Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins.* See Ref., 1999. **29**: p. 1–19.
102. van Loon, L.C., M. Rep, and C.M.J. Pieterse, *Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants.* Annual Review of Phytopathology, 2006. **44**(1): p. 135-162.
103. Edreva, A., *Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years*. Vol. 31. 2005. 1-2.
104. Loon, L.C.v., M. Rep, and C.M.J. Pieterse, *Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants.* Annual Review of Phytopathology, 2006. **44**(1): p. 135-162.
105. Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2015: Wiley.
106. Lay, F.T. and M.A. Anderson, *Defensins--components of the innate immune system in plants.* Curr Protein Pept Sci, 2005. **6**(1): p. 85-101.
107. Thomma, B.P., B.P. Cammue, and K. Thevissen, *Plant defensins.* Planta, 2002. **216**(2): p. 193-202.
108. Epple, P., K. Apel, and H. Bohlmann, *Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against Fusarium oxysporum.* Plant Cell, 1997. **9**(4): p. 509-20.
109. Bohlmann, H. and W. Broekaert, *The Role of Thionins in Plant Protection.* Critical Reviews in Plant Sciences, 1994. **13**(1): p. 1-16.
110. Bulcke, M.V.D., et al., *Characterization of vacuolar and extracellular β(1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(8): p. 2673.
111. Ohme-Takagi, M. and H. Shinshi, *Structure and expression of a tobacco β-1,3-glucanase gene.* Plant Molecular Biology, 1990. **15**(6): p. 941-946.
112. Memelink, J., et al., *Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns.* Plant Mol Biol, 1990. **14**(2): p. 119-26.
113. Neale, A.D., et al., *Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation.* Plant Cell, 1990. **2**(7): p. 673-84.
114. Leubner-Metzger G, M.F.J., *Functions and regulation of plant b-1,3-glucanases (PR2).* . Vol. 49–76. 1999: Datta SK, Muthukrishnan S, eds. Pathogenesis-related proteins in plants. Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC
115. Casasoli, M., et al., *Identification by 2-D DIGE of apoplastic proteins regulated by oligogalacturonides in Arabidopsis thaliana.* PROTEOMICS, 2008. **8**(5): p. 1042-1054.

116. Martinez-Esteso, M.J., et al., *Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (Vitis vinifera cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors.* (1876-7737 (Electronic)).
117. Salzman, R.A., et al., *Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape.* Plant Physiol, 1998. **117**(2): p. 465-72.
118. Kononowicz, A.K., et al., *Regulation of the Osmotin Gene Promoter.* Plant Cell, 1992. **4**(5): p. 513-524.
119. Larosa, P.C., et al., *Stable NaCl Tolerance of Tobacco Cells Is Associated with Enhanced Accumulation of Osmotin.* Plant Physiol, 1989. **91**(3): p. 855-61.
120. Singh, N.K., et al., *Characterization of osmotin : a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells.* Plant Physiol, 1987. **85**(2): p. 529-36.
121. Zhu, B., T.H. Chen, and P.H. Li, *Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato.* Plant Mol Biol, 1995. **28**(1): p. 17-26.
122. Newton, S.S. and J.G. Duman, *An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade Solanum dulcamara.* Plant Mol Biol, 2000. **44**(5): p. 581-9.
123. Zhu, B., T.H. Chen, and P.H. Li, *Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in Solanum commersonii.* Plant Mol Biol, 1993. **21**(4): p. 729-35.
124. Yun, D.J., et al., *Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility.* Mol Cell, 1998. **1**(6): p. 807-17.
125. Abad, L.R., et al., *Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization.* Plant Science, 1996. **118**(1): p. 11-23.
126. Nelson, D.E., et al., *Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene.* Plant Mol Biol, 1992. **19**(4): p. 577-88.
127. Ruiz-Medrano, R., et al., *Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection.* Plant Mol Biol, 1992. **20**(6): p. 1199-202.
128. Woloshuk, C.P., et al., *Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward Phytophthora infestans.* Plant Cell, 1991. **3**(6): p. 619-28.
129. Mundt, C.C., *Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests.* Infect Genet Evol, 2014. **27**: p. 446-55.
130. Wiesner-Hanks, T. and R. Nelson, *Multiple Disease Resistance in Plants.* Annual Review of Phytopathology, 2016. **54**(1): p. 229-252.
131. Lof, M.E. and W. van der Werf, *Modelling the effect of gene deployment strategies on durability of plant resistance under selection.* Crop Protection, 2017. **97**(Supplement C): p. 10-17.
132. Punja, Z.K., *Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens—a review of progress and future prospects.* Canadian Journal of Plant Pathology, 2001. **23**(3): p. 216-235.
133. Christou, P. and R.M. Twyman, *The potential of genetically enhanced plants to address food insecurity.* Nutr Res Rev, 2004. **17**(1): p. 23-42.
134. Broglie, R. and K. Broglie, *The production and uses of genetically transformed plants - Chitinase gene expression in transgenic plants: a molecular approach to understanding plant defence responses.* Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1993. **342**(1301): p. 265.
135. Anand, A., E.A. Schmelz, and S. Muthukrishnan, *Development of a lesion-mimic phenotype in a transgenic wheat line overexpressing genes for pathogenesis-related (PR) proteins is dependent on salicylic acid concentration.* Mol Plant Microbe Interact, 2003. **16**(10): p. 916-25.
136. Nishizawa, Y., et al., *Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible beta-glucanase gene Gns1.* Plant Mol Biol, 2003. **51**(1): p. 143-52.
137. Zhang, J., et al., *Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection.* Trends Biotechnol, 2017.
138. Dufourmantel, N., et al., *Generation and Analysis of Soybean Plastid Transformants Expressing Bacillus thuringiensis Cry1Ab Protoxin.* Plant Molecular Biology, 2005. **58**(5): p. 659-668.
139. Wang, Y.P., et al., *Chloroplast-expressed MSI-99 in tobacco improves disease resistance and displays inhibitory effect against rice blast fungus.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(3): p. 4628-41.

140. Ruhlman, T.A., K. Rajasekaran, and J.W. Cary, *Expression of chloroperoxidase from Pseudomonas pyrrocinia in tobacco plastids for fungal resistance.* Plant Sci, 2014. **228**: p. 98-106.
141. Kuroda, H. and P. Maliga, *Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(4): p. 970-5.
142. Knapp, S., M.W. Chase, and J.J. Clarkson, *Nomenclatural changes and a new sectional classification in Nicotiana (Solanaceae).* Taxon, 2004. **53:73-82**.
143. Bally, J., et al., *The extremophile Nicotiana benthamiana has traded viral defence for early vigour.* Nat Plants, 2015. **1**: p. 15165.
144. Goodin, M.M., et al., *Nicotiana benthamiana: its history and future as a model for plant-pathogen interactions.* Mol Plant Microbe Interact, 2008. **21**(8): p. 1015-26.
145. Davarpanah, S.J., et al., *Stable Plastid Transformation in Nicotiana benthamiana.* J. Plant Biol., 2009. **52:244–250**.
146. Chen, P.J., et al., *Transplastomic Nicotiana benthamiana plants expressing multiple defence genes encoding protease inhibitors and chitinase display broad-spectrum resistance against insects, pathogens and abiotic stresses.* Plant Biotechnol J, 2014. **12**(4): p. 503-15.
147. Bally, J., et al., *In-Plant Protection against Helicoverpa armigera by Production of Long hpRNA in Chloroplasts.* Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 1453.
148. Alfano, E.F., et al., *Expression of the Multimeric and Highly Immunogenic Brucella spp. Lumazine Synthase Fused to Bovine Rotavirus VP8d as a Scaffold for Antigen Production in Tobacco Chloroplasts.* Front Plant Sci, 2015. **6**: p. 1170.
149. Verma, D. and H. Daniell, *Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications.* Plant Physiology, 2007. **145**(4): p. 1129.
150. Martin Avila, E., M.F. Gisby, and A. Day, *Seamless editing of the chloroplast genome in plants.* BMC Plant Biology, 2016. **16**(1): p. 168.
151. Choi, S.H. and E.P. Greenberg, *Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the Vibrio fischeri LuxR protein.* (0021-9193 (Print)).
152. Choi, S.H. and E.P. Greenberg, *The C-terminal region of the Vibrio fischeri LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(24): p. 11115-11119.
153. Shadel, G.S., J.H. Devine, and T.O. Baldvvin, *Control of the lux regulon of Vibrio fischeri.* Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 1990. **5**(2): p. 99-106.
154. Slock, J., et al., *Critical regions of the Vibrio fischeri luxR protein defined by mutational analysis.* (0021-9193 (Print)).
155. Egland, K.A. and E.P. Greenberg, *Quorum sensing in Vibrio fischeri: elements of the luxl promoter.* (0950-382X (Print)).
156. Stevens, A.M. and E.P. Greenberg, *Quorum sensing in Vibrio fischeri: essential elements for activation of the luminescence genes.* (0021-9193 (Print)).
157. Devine, J.H., T.O. Shadel Gs Fau - Baldwin, and T.O. Baldwin, *Identification of the operator of the lux regulon from the Vibrio fischeri strain ATCC7744.* (0027-8424 (Print)).
158. Luo, Z.-Q. and S.K. Farrand, *Signal-dependent DNA binding and functional domains of the quorum-sensing activator TraR as identified by repressor activity.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(16): p. 9009-9014.
159. Gray, K.M., et al., *Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of Vibrio fischeri and Pseudomonas aeruginosa.* (0021-9193 (Print)).
160. Welch, M., et al., *N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in Erwinia.* The EMBO Journal, 2000. **19**(4): p. 631-641.
161. Zhu, J. and S.C. Winans, *The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(4): p. 1507.
162. Qin, Y., S.K. Luo Zq Fau - Farrand, and S.K. Farrand, *Domains formed within the N-terminal region of the quorum-sensing activator TraR are required for transcriptional activation and direct interaction with RpoA from agrobacterium.* (0021-9258 (Print)).

163. Rhodius, V.A. and S.J. Busby, *Positive activation of gene expression.* (1369-5274 (Print)).
164. West, D., et al., *Interactions between the Escherichia coli cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase at class II promoters.* (0950-382X (Print)).
165. Zhou, Y., et al., *The functional subunit of a dimeric transcription activator protein depends on promoter architecture.* The EMBO Journal, 1994. **13**(19): p. 4549-4557.
166. West, D., et al., *Interactions between the Escherichia coli cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase at class II promoters.* Mol Microbiol, 1993. **10**(4): p. 789-97.
167. Schuster, M., M.L. Urbanowski, and E.P. Greenberg, *Promoter specificity in Pseudomonas aeruginosa quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(45): p. 15833.
168. González, J.F. and V. Venturi, *A novel widespread interkingdom signaling circuit.* Trends in Plant Science, 2013. **18**(3): p. 167-174.
169. Serino, G. and P. Maliga, *RNA Polymerase Subunits Encoded by the Plastid rpo Genes Are Not Shared with the Nucleus-Encoded Plastid Enzyme.* Plant Physiology, 1998. **117**(4): p. 1165-1170.
170. Suzuki, J.Y. and P. Maliga, *Engineering of the rpl23 gene cluster to replace the plastid RNA polymerase alpha subunit with the Escherichia coli homologue.* Curr Genet, 2000. **38**(4): p. 218-25.
171. Moosa, A., et al., *Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success.* Israel Journal of Plant Sciences, 2017: p. 1-17.
172. Anand, A., et al., *Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal.* Mol Plant Microbe Interact, 2004. **17**(12): p. 1306-17.
173. Silva, H., et al., *Characterization of a New Arabidopsis Mutant Exhibiting Enhanced Disease Resistance.* Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999. **12**(12): p. 1053-1063.
174. Xue, X., et al., *Overexpression of OsOSM1 Enhances Resistance to Rice Sheath Blight.* Plant Disease, 2016. **100**(8): p. 1634-1642.
175. Datta, K., et al., *Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to Rhizoctonia solani causing sheath blight disease.* Theoretical and Applied Genetics, 1999. **98**(6): p. 1138-1145.
176. Veronese, P., et al., *Pathogenesis-related proteins for the control of fungal diseases of tomato*, in *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance: Proceedings of the XV EUCARPIA Congress, Viterbo, Italy, September 20–25, 1998*, G.T.S. Mugnozza, E. Porceddu, and M.A. Pagnotta, Editors. 1999, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 15-24.
177. Chen, W. and Z. Punja, *Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (Daucus carota L.) plants obtained through Agrobacterium-mediated transformation.* Plant Cell Reports, 2002. **20**(10): p. 929-935.
178. Das, M., et al., *High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, Morus indica cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin.* Transgenic Research, 2011. **20**(2): p. 231-246.
179. Dong, S., et al., *Resistance of transgenic tall fescue to two major fungal diseases.* Plant Science, 2007. **173**(5): p. 501-509.
180. Borkowska, M., et al., *Transgenic potato plants expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to Phytophthora infestans.* 1998(0939-5075 (Print)).
181. Wróbel-Kwiatkowskaa, M., et al., *Expression of b-1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi.* Physiological and Molecular Plant Pathology, 2004. **65**.
182. Sundaresha, S., et al., *Enhanced protection against two major fungal pathogens of groundnut, Cercospora arachidicola and Aspergillus flavus in transgenic groundnut over-expressing a tobacco в 1–3 glucanase.* Eur J Plant Pathol, 2010. **2010**(126).
183. Zhu, Q., et al., *Enhanced Protection Against Fungal Attack by Constitutive Co–expression of Chitinase and Glucanase Genes in Transgenic Tobacco.* Bio/Technology, 1994. **12**: p. 807.

184. Jongedijk, E., et al., *Synergistic activity of chitinases and β-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants.* Euphytica, 1995. **85**(1): p. 173-180.
185. Linthorst, H.J.M. and L.C. Van Loon, *Pathogenesis-related proteins of plants.* Critical Reviews in Plant Sciences, 1991. **10**(2): p. 123-150.
186. Wawra, S., et al., *The fungal-specific β-glucan-binding lectin FGB1 alters cell-wall composition and suppresses glucan-triggered immunity in plants.* Nature Communications, 2016. **7**: p. 13188.
187. Tian, M., et al., *A Phytophthora infestans Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease.* Plant Physiology, 2007. **143**(1): p. 364.
188. Rose, J.K.C., et al., *Molecular Cloning and Characterization of Glucanase Inhibitor Proteins.* The Plant Cell, 2002. **14**(6): p. 1329.
189. Szabo, L.J. and W.R. Bushnell, *Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(14): p. 7654-7655.
190. Schippers, J.H.M., et al., *Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence.* Plant Physiology, 2015. **169**(2): p. 914.
191. Otegui, M.S., *Vacuolar degradation of chloroplast components: autophagy and beyond. .* 2017(1460-2431 (Electronic)).
192. Sidorov, V.A., et al., *Technical Advance: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker.* Plant J, 1999. **19**(2): p. 209-216.
193. Ruhlman, T., et al., *Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts--oral administration protects against development of insulitis in non-obese diabetic mice.* Plant Biotechnol J, 2007. **5**(4): p. 495-510.
194. Holsters, M., et al., *Transfection and transformation of Agrobacterium tumefaciens.* Mol Gen Genet, 1978. **163**(2): p. 181-7.
195. Coego A., V.R., Alfonso J., Coll Y., Pujol M., Menéndez E., López M., Molina P., Hernández L., Bencomo B., de la Riva G., y Selman G. , ed. *Effect of promoter-stimulatory element combination on transient reporter gene expression in tobacco protoplast using*

PEG-treatment. Vol. 13: 147-152. 1996, Biotecnología Aplicada.
196. Van der Hoorn, R.A., et al., *Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis.* Mol Plant Microbe Interact, 2000. **13**(4): p. 439-46.
197. Horsch R.B., F.J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., y Fraley R.T. , *A simple and general method for transferring genes into plants.* Vol. 227: 1229-1231. 1985: Science.
198. Murashige, T.a.S., F. , *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Vol. 15, 473-497. 1962: Physiologia Plantarum
199. Thi Nguyen, T., et al., *Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (Solanum tuberosum L.)*. Vol. 168. 2005. 1495-1500.
200. Dellaporta S.L., W.J.y.H.J.B., *A plant DNA minipreparation: version II.* Vol. 1: 19-21. 1983: Plant Molecular Biology Reports.
201. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. , *Molecular Cloning. A laboratory manual*, ed. n. edition. 1989: Nolan, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
202. Elliott, P.E., et al., *Evaluation of Tobacco Germplasm for Seedling Resistance to Stem Rot and Target Spot Caused by Thanatephorus cucumeris.* Plant Disease, 2008. **92**(3): p. 425-430.
203. Csinos, A.S., *Stem and Root Resistance to Tobacco Black Shank.* Plant Disease, 1999. **83**(8): p. 777-780.