

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**



**Análisis funcional del gen *PpCOR413* identificado en  
*Physcomitrella patens* que codifica una proteína de la familia  
WCOR413, de función desconocida**

TESIS DE POST GRADO PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE MAGISTER  
SCIENTIARUM EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉTICAS, MENCIÓN:  
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ELABORADO POR:**

**Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal**

**La Paz - Bolivia**  
**2017**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**



**Análisis funcional del gen *PpCOR413* identificado en *Physcomitrella patens* que codifica una proteína de la familia WCOR413, de función desconocida**

Elaborado por: Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal

TESIS DE POST GRADO PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉTICAS, MENCIÓN: GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TUTORA DE TESIS: Volga Iñiguez Rojas Ph. D.  
Facultad de Ciencias Puras y Farmacéuticas, I.B.M.B.  
Universidad Mayor de San Andrés

DIRECTORA CIENTÍFICA DE TESIS: Sabina Vidal Machi Ph. D.  
Facultad de Ciencias, L.B.M.V.  
Universidad de la República

La Paz - Bolivia  
2017

### **Tribunales Internacionales:**

Cecilia Ruibal Croce Ph. D.

Asistente de Laboratorio de Biología Molecular Vegetal - Facultad de Ciencias  
Universidad la Republica, Uruguay

Alexandra Castro Ph. D.

Asistente de Laboratorio de Biología Molecular Vegetal - Facultad de Ciencias  
Universidad la Republica, Uruguay

Juan Pablo Gallino Ph. D.

Postdoc - Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA)/  
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal-Facultad de Ciencias  
Universidad la Republica, Uruguay

### **Financiamiento:**

El presente trabajo fue financiado por el Programa ICGEB-TWAS Joint Plant Biotechnology del International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology y The World Academy of Sciences, a través del proyecto "Identification of key genes involved in salt and osmotic stress tolerance in the model plant *Physcomitrella patens* and *Prosopis strombulifera*" con participación de laboratorios pertenecientes a la Universidad de la República - Uruguay, Universidad Mayor de San Andrés - Bolivia, Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina e Institute of Plant Biology - Hungría.

Asimismo, contó también con el apoyo financiero de TWAS (The World Academy of Sciences) Fellowship for Research and Advanced Training.

**Ambiente de Investigación:**

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Iguá # 4225

Teléfono: 598 - 2 - 5258618 ext. 7 232

Fax: 598 - 2 - 5258617

Montevideo - Uruguay

Unidad de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología

Facultad de Ciencias Puras y Naturales - Universidad Mayor de San Andrés

Campus Universitario de Cota cota

Cota cota, calle # 27 S/N

Teléfono: 591 - 2 - 2612815

La Paz - Bolivia

***Dedicatoria***

*A mis amad@s hij@s Gladys y Diego, que son la razón de mi vida*

*A mi amada esposa Sonia, por ser siempre mi gran apoyo y*

*A mi amada mamá Gladys(†), que por ella soy lo que soy*

## ***Agradecimientos***

*A Dios por ser mi guía, permitiendome cumplir mis metas trazadas y colmandome de bendiciones siempre.*

*A The World Academy of Sciences (TWAS) y a International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), por el apoyo para poder realizar la presente investigación.*

*A mi familia por apoyarme y soportarme para la culminación de esta y todas las etapas de mi vida.*

*A mi Asesora Sabina Vidal por sus enseñanzas, confianza, dedicación y amistad.*

*A mi Tutora Volga Iñiguez por la orientación, importantes sugerencias y enseñanzas, empuje y amistad.*

*A todo el personal (Estudiantes, Tesistas, Investigadores, Administrativos y Docentes) que ha sido parte del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal, por brindarme su amistad, confianza y apoyo incondicional.*

*Al equipo de investigadores del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal quienes me guiaron con su conocimiento, apoyo logístico, técnico y humano, y me brindaron su amistad.*

*A la Maestría de Ciencias Biológicas y Biomédicas, por su predisposición y colaboración durante el proceso de mi formación post grado y en especial a la Dra. Ninoska Flores Q. por su empuje, dedicación, paciencia y amistad.*

*A todas las personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo.*

## RESUMEN

En los últimos años, se ha generado una creciente evidencia que apoya el papel de las proteínas pertenecientes a la familia COR (cold-regulated) en la respuesta al estrés abiótico en plantas. *PpCOR413* es un gen proveniente del musgo *Physcomitrella patens* que codifica una proteína similar a una proteína cloroplastídica de la familia WCOR413, las cuales se acumulan en respuesta a las bajas temperaturas en las variedades de trigo de invierno. Con el fin de evaluar la función del gen *PpCOR413*, se construyó el plásmido pGW5COR que cuenta con la región codificante de *PpCOR413* fusionada al gen reportero GFP, regulado bajo la expresión del promotor constitutivo CaMV 35S. Este plásmido pGW5COR se incorporó en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar *Arabidopsis thaliana* a través del método de inmersión floral. Se seleccionaron dos líneas de plantas transgénicas sobreexpresantes de PpCOR413:GFP nombrados COR-GFP 10 y COR-GFP 22, las cuales fueron evaluadas para determinar la localización de la proteína PpCOR413:GFP. Con el uso de un microscopio de fluorescencia confocal, se encontró que la proteína fusionada está localizada en cloroplastos del mesófilo y en los plástidos de las raíces.

El análisis fenotípico de las plantas transgénicas que sobreexpresan PpCOR413:GFP incluyó la evaluación de dos parámetros: longitud de la raíz y el peso fresco de la planta, desarrollados bajo condiciones normales (25 °C) y de frío (4 °C). Se utilizó como control vitroplantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia de tipo salvaje (wt, wild type). A pesar del hecho de que las plantas transgénicas mostraron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas wt, no se observaron diferencias significativas entre las plantas transgénicas bajo condiciones de frío y normales. Los resultados obtenidos en este estudio indican la necesidad de una evaluación adicional de otras condiciones de estrés asociados con el gen *PpCOR413* en futuros estudios.

Además de estos hallazgos, un plásmido pKO-COR fue desarrollado, el mismo que alberga una construcción de reemplazo alélico, para realizar un *knockout* para el gen *PpCOR413*. Así, protoplastos de *Physcomitrella patens* se transformaron con el plásmido pKO-COR para obtener un mutante *knockout* para el gen *PpCOR413*. Finalmente se generó el mutante *knockout* para *PpCOR413* denominado KO-COR5. Este mutante se puede utilizar en futuros estudios para evaluar la resistencia a estrés en *Physcomitrella patens*.

## ABSTRACT

In recent years, there has been increasing evidence supporting the role of the proteins to the COR (cold-regulated) family in the abiotic stress response in plants. *PpCOR413* is a gene of the moss *Physcomitrella patens* that encoding a protein similar to a chloroplast protein to the WCOR413 family, which accumulate in response to low temperatures in winter wheat varieties. In order to evaluate the function of the *PpCOR413* gene a plasmid pGW5COR was constructed harboring the coding region of *PpCOR413* fused to GFP reporter gene and the constitutive promoter CaMV 35S. This pGW5COR plasmid was then inserted into *Agrobacterium tumefaciens* to transform *Arabidopsis thaliana* through the method of floral dip. Two transgenic plant lines overexpressing PpCOR413:GFP called COR-GFP 10 and COR-GFP 22 were selected and evaluated further for localization of the PpCOR413:GFP protein. Using a confocal fluorescence microscope, the fused protein was found localized in chloroplasts of mesophyll cells and the plastids of the roots.

Phenotypic analysis of transgenic plants overexpressing PpCOR413:GFP included the evaluation of two traits: root length and fresh weight of the whole plant grown under normal (25 °C) and cold conditions (4 °C). *A. thaliana* wild type ecotype Columbia was used as a control. Despite the fact, that transgenic plants displayed phenotypic differences with respect to wild plants (wild type), no significant differences were observed among transgenic plants under normal and cold conditions. The results obtained from this study indicate a need for further evaluation of other stress conditions associated with the *PpCOR413* gene in future studies.

In addition to these findings, a pKO-COR plasmid was developed harboring a *PpCOR413* gene *knockout* construct. Protoplasts of *Physcomitrella patens* were transformed with pKO-COR plasmid to obtain a *knockout* mutant for the *PpCOR413* gene. The mutant denominated KO-COR5 was finally obtained. This mutant can be used in future studies to evaluate stress resistance in *Physcomitrella patens*.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	Introducción .....	1
2.	Marco teórico .....	3
2.1.	Biotecnología y Mejoramiento Vegetal .....	3
2.2.	Generación de la construcción génica.....	4
2.3.	Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	6
2.4.	Mecanismos de respuesta a estrés o estrés abiótico vegetal.....	8
2.4.1.	El ácido abscísico (ABA) y la tolerancia a estrés .....	9
2.4.2.	Estrés hídrico .....	10
2.4.3.	Estrés Salino .....	10
2.4.4.	Estrés por altas temperaturas.....	10
2.4.5.	Estrés por bajas temperaturas.....	11
2.5.	Familia de proteínas COR .....	12
2.6.	<i>Physcomitrella patens</i> .....	13
3.	Objetivos.....	16
3.1.	Objetivo general.....	16
3.2.	Objetivos específicos.....	16
3.3.	Hipótesis.....	16
4.	Materiales y métodos.....	17
4.1.	Localización.....	17
4.2.	Material biológico y condiciones de crecimiento.....	17
4.3.	Cepas y cultivos de microorganismos .....	19
4.4.	Generación de construcciones génicas en vectores binarios conteniendo el ADNc completo de <i>PpCOR413</i> fusionado en marco al gen de GFP y expresados bajo el control de un promotor constitutivo. ....	20
4.5.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> y caracterización molecular de las líneas transgenicas. ....	22
4.6.	Análisis fenotípico de transformantes ante factores de estrés abiótico.....	23
4.7.	Localización de la proteína PpCOR413 en líneas transgenicas de <i>A. thaliana</i> . ....	23
4.8.	Diseño de construcciones para la interrupción génicas del gen <i>PpCOR413</i> en <i>P. patens</i> .....	23
4.9.	Generación y caracterización molecular de mutantes <i>knockout</i> en <i>P. patens</i> . ....	24

4.10.	Northern blot.....	25
4.11.	Análisis fenotípico de estos mutantes <i>knockout</i> .....	27
4.12.	Estrategia.....	27
5.	Resultados y Discusión .....	29
5.1.	Consideraciones generales. ....	29
5.2.	Generación de una construcción génica en un vector binario conteniendo la región codificante de PpCOR413 fusionada al gen de GFP.....	32
5.3.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción génica de 35S-PpCOR413.....	32
5.4.	Análisis fenotípico de transformantes ante factores de estrés abiótico.....	33
5.5.	Determinación de la localización subcelular de la proteína de fusión PpCOR413-GFP por microscopia de fluorescencia.....	38
5.6.	Generación de construcciones génicas para la disrupción del gen <i>PpCOR413</i> en <i>Physcomitrella patens</i> .....	40
5.7.	Transformación de protoplastos en <i>Physcomitrella patens</i> . ....	45
5.8.	Caracterización molecular de transformantes.....	49
5.9.	Análisis fenotípico de mutante <i>knockout</i> (línea 5 ó KO-COR 5). ....	51
6.	Conclusiones.....	53
7.	Referencias bibliográficas .....	54

<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO 1. Composición del medio Hoagland's (Arnon and Hoagland 1950). (Sigma-Aldrich)</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO 2. Composición del Medio MS (Murashige y Skoog 1962). (Duchefa Biochemie 2012)</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO 3. Región genómica de <i>Physcomitrella patens</i> utilizada para realizar construcciones, con las respectivas secuencias correspondientes a los primers</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO 4. Protocolo de PCR estandarizado</b> .....	<b>64</b>
<b>ANEXO 5. Protocolo de PCR estandarizado</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXO 6. Protocolo de Transformación de protoplastos de <i>Physcomitrella patens</i></b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXO 7. Análisis de varianza de peso fresco del desarrollo de vitroplantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> cultivados en tratamientos de estrés con Ácido Salicílico y PEG 18%</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXO 8. Análisis de varianza de peso fresco del desarrollo de vitroplantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> cultivados en diferentes tratamientos de estrés y respectivo control (tratamiento sin estrés)</b> .....	<b>69</b>
<b>ANEXO 9. Análisis de varianza de peso fresco y largo de raíz de vitroplantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> previo a ser llevadas a tratamiento de frío (2 días a 4 °C)</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXO 10. Análisis de varianza del largo de raíz de vitroplantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> inmediatamente después de recibir el tratamiento de frío y sin ningún tratamiento (1 semana más 2 días a 4 °C)</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXO 11. Análisis de varianza de peso fresco y largo de raíz de vitroplantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>, tratadas y sin tratamiento (Control), 5 días después del tratamiento de frío (2 días a 4 °C), es decir 2 semanas después de la siembra</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXO 12. Resultados de secuenciación de pKO-COR</b> .....	<b>72</b>

## 1. Introducción

El estrés causado por factores ambientales ha venido cobrando mayor importancia, principalmente debido a los procesos climáticos globales que se han estado manifestando en las últimas décadas. Es así que en este escenario será indispensable contar con herramientas de mejoramiento genético que permitan desarrollar genotipos adaptados a las consecuencias de estos cambios climáticos, dentro de los cuales los más conocidos son la sequía, temperaturas extremas, inundaciones y otros edáficos como la salinidad del suelo, son factores abióticos que limitan el crecimiento e incluso la sobrevivencia de las plantas, y por lo tanto la productividad de los cultivos agrícolas.

A la fecha, se han obtenido escasos resultados a través de los programas de mejoramiento genético de cultivos para aumentar la tolerancia a diversos factores de estrés abiótico. Así, muchos programas de mejoramiento genético ya sea convencional o molecular, están enfocados en la identificación de genes asociados a la tolerancia a estrés abiótico, ya sea para el desarrollo de marcadores moleculares que asistan la evaluación del grado de tolerancia de un genotipo en particular, como para el mejoramiento de un cultivo mediante enfoques biotecnológicos (Papdi *et al.* 2009).

En plantas superiores, las respuestas moleculares al estrés abiótico se han estudiado particularmente en el principal modelo de estudio vegetal *Arabidopsis thaliana*. De esta manera, varios análisis de expresión génica, han permitido la identificación de muchos genes cuya expresión es inducida bajo condiciones de estrés. Adicionalmente en esta planta se cuenta con la disponibilidad de su genoma completo, que da lugar nuevos cuestionamientos, entre los que se destacan la identificación de las funciones que desempeñan estos genes identificados.

En función a todo lo descrito anteriormente se concluye la gran importancia que tiene el profundizar en el análisis funcional de los genes de la familia WCOR413, así como evaluar la posibilidad de utilizarlos como marcadores funcionales de tolerancia a distintas condiciones de estrés abiótico. La incorporación de estos genes a programas de mejora genética podría dar paso a identificar de manera más precisa y temprana genotipos que a pesar de encontrarse en condiciones ambientales adversas puedan presentar rendimientos estables.

De esta manera, con el propósito de evaluar la relevancia funcional del gen *PpCOR413*, en la respuesta al estrés abiótico en plantas, este estudio planteó tres objetivos principales.

- 1) Determinar la localización subcelular de la proteína PpCOR413. Para ello, se realizó la sobreexpresión de esta proteína fusionada con la proteína fluorescente (GFP), en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.
- 2) Evaluar fenotípicamente plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan *PpCOR413* en la respuesta a estrés.
- 3) Contribuir a dilucidar la función del gen *PpCOR413* en *P. patens*, mediante genética reversa y fenotipado de los mutantes obtenidos bajo estrés.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**

La selección, mejoramiento genético y desarrollo de plantas, puede ser trazada desde tiempos prehistóricos, cuando el hombre se hizo agricultor y comenzó la domesticación de las plantas (Minnis *et al.* 2006). En el siglo XX, con la incorporación de los cruzamientos sexuales, el conocimiento de la biología floral de las especies, el desarrollo de la genética y de la estadística experimental, entre otros avances, se conformaron los métodos de mejoramiento actualmente utilizados. Recientemente se desarrollaron métodos de manipulación de ADN y de transferencia de genes que no implican cruzamientos y con ello el surgimiento de la ingeniería genética que ha permitido introducir en plantas genes provenientes no solo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales. Asimismo, a través de esta tecnología es posible modificar la expresión de genes presentes en el genoma de la planta, permitiendo de esta manera superar las limitaciones propias de la reproducción sexual y abriendo nuevas perspectivas en el mejoramiento de las plantas (Díaz *et al.* 2010).

Así, desde la producción de la primera planta transgénica estable a inicios de los 80s y la primera planta transgénica comercializada en 1995, la biotecnología vegetal a revolucionado la agricultura (Brookes 2008). Tanto así que, desde 1996 hasta la actualidad se han cultivado 2 mil millones de hectáreas de tierra arable con cultivos biotecnológicos (Clive 2015).

El actual interés agropecuario en el mejoramiento genético apoyado con biotecnologías, se encuentran la obtención de plantas con resistencia a estreses bióticos (virus, insectos, hongos y bacterias), a estreses abióticos (salinidad, sequía, etc.), tolerancia a herbicidas para facilitar el control de malezas y modificación de la calidad nutricional de los cultivos entre otras. La transformación genética también constituye una herramienta útil para estudios básicos que permiten conocer y/o profundizar acerca de la estructura y función de genes específicos, aspecto particularmente relevante en la era genómica (Díaz *et al.* 2010).

Por otro lado, las nuevas tecnologías para el análisis genómico (microarreglos de ADN, genética directa y reversa) produjeron una revolución en el análisis genético de las especies y permitieron cambiar el enfoque de análisis, yendo desde estudios de un solo gen a estudios que abarcan todo el genoma (Puebla and Del Viso 2004). La genética reversa tiene como objetivo identificar la función de un gen, con secuencia conocida, por análisis fenotípico de células u organismos en los cuales se

altera la función de este gen específico (Perry *et al.* 2003 y Rogers *et al.* 2009). Utilizando tanto macro como microarreglos de ADN (Lin *et al.* 2003; Seki *et al.* 2001; Seki *et al.* 2002a; Seki *et al.* 2002b; Kawasaki *et al.* 2001; Oono *et al.* 2003) se estudiaron genes inducidos o suprimidos en condiciones de estrés abiótico (frío, sequía, salinidad). La mayor parte de estos estudios se realizaron en el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* debido al hecho, entre otros factores, de que su genoma y la planta en sí son pequeñas, su ciclo de vida es corto, son sencillas de transformar y su genoma ha sido completamente secuenciado, facilitando así la construcción de los microarreglos y el análisis de las secuencias obtenidas (Puebla and Del Viso 2004; Finer and Dhillon 2008). Adicionalmente, se cuenta con una colección de mutantes insercionales de la mayoría de los genes de esta especie (O'Malley *et al.* 2015).

## **2.2. Generación de la construcción génica**

En biología molecular, un vector de clonación es una molécula de ADN que lleva fragmentos de ADN, extraño o incluso propio, a una célula huésped y que se permita su replicación (Curtis 2008). De esta manera, para introducir un transgen es necesario que el mismo sea incorporado previamente en un vector, como por ejemplo un plásmido (ADNs bacterianos circulares extracromosomales, no genómicos) (Prieto E. 2005). Para ello, mediante la tecnología del ADN recombinante, se digiere inicialmente clonar por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) el ADN extraído de un organismo, cualquiera sea su origen, seguidamente con enzimas de restricción que reconocen una secuencia específica de ADN compuestas por pocos nucleótidos, cortar la cadena generando dos fragmentos escalonados con extremos cohesivos o con extremos romos (Curtis 2008). Los fragmentos de restricción así obtenidos pueden ser ligados enzimáticamente a vectores de clonado, obteniéndose, de este modo, clones de ADN recombinante. Alternativamente, se puede utilizar una tecnología de clonado basada en el mecanismo de recombinación sitio-específico del fago lambda conocida como sistema Gateway<sup>TM</sup> de Invitrogen (Díaz *et al.* 2010).

La tecnología Gateway<sup>TM</sup> proporciona una manera rápida y altamente eficiente para mover secuencias de ADN en múltiples sistemas de vectores para el análisis funcional y la expresión de proteínas (Hartley *et al.* 2000). Gateway<sup>TM</sup> utiliza la recombinación sitio-específico del bacteriófago lambda que facilita su integración en el cromosoma de *E. coli* y el intercambio entre las vías líticas y lisogénicas (Ptashne, 1992 citado por Invitrogen 2008c), eliminando efectivamente el requisito de trabajar con enzimas de restricción y la ligasa después de que el clon de entrada inicial se construye (Cullis 2004). Para la clonación con Gateway<sup>TM</sup>, los sitios att del plásmido se han modificado de manera que la orientación de los fragmentos de ADN se puede mantener durante el proceso de

escisión y la integración. Asimismo, para seleccionar el producto de recombinación correcto, se emplea una combinación de marcadores seleccionables positivos y negativos. La selección positiva es la que ofrece un antibiótico alternativo, mientras que la selección negativa producida por el gen *ccdB*, cuyo producto inhibe la actividad de la ADN girasa, lo que conduce en última instancia a la muerte celular. Así bacterias transformadas de *E. coli* con vectores que contienen el gen *ccdB*, no pueden crecer y sólo las bacterias que contienen la construcción recombinante deseado que carece del gen *ccdB* y contiene el gen marcador de resistencia a antibiótico apropiado puede sobrevivir (Curtis 2008).

Por otro lado, además de la importancia del gen de interés, los promotores pueden ser modificados con el fin de aumentar la expresión de los genes que regulan. Por otra parte, el nivel y patrón de expresión del gen también puede estar afectado por la posición del mismo en el genoma de la planta, fenómeno conocido como “efecto de posición”. Esto puede deberse a la presencia de otras secuencias regulatorias cercanas como intensificadores y silenciadores, a la estructura de la cromatina, al patrón de metilación, etc. Este aspecto es particularmente relevante considerando que con los métodos de transformación genética nuclear utilizados actualmente, las inserciones de los transgenes en el genoma de la planta son al azar. Así, la cantidad de proteína producida por un transgen comúnmente varía más de 100 veces entre individuos transformantes obtenidos en el mismo experimento (Díaz *et al.* 2010).

Los genes de selección otorgan a las células transgénicas a través de su expresión una importante ventaja, con respecto a las células no transgénicas, al permitirles crecer en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo correspondiente (Díaz *et al.* 2010). De estos genes los más comúnmente utilizados son los de resistencia a antibióticos, entre estos los de mayor uso son neomicina fosfotransferasa e higromicina fosfotransferasa que confieren resistencia a la kanamicina e higromicina respectivamente (Finer and Dhillon 2008) .

Generalmente para determinar la función de un gen de interés se utilizan los genes reporteros que codifican para proteínas que no están presentes en las células vegetales y producen un fenotipo característico de fácil y rápida observación, tales como un nuevo color o la emisión de fluorescencia o fosforescencia (Finer and Dhillon 2008). Así, el gen *gus A* proveniente de *E. coli* codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, que en presencia de un sustrato específico esta enzima cataliza la producción de un precipitado azul-índigo de fácil visualización (Díaz *et al.* 2010). El gen de la proteína fluorescente verde, GFP (green fluorescent protein), aislado de una medusa, se ha convertido en un gen marcador visualizable *in vivo* muy utilizado, de esta manera cuando se ilumina

con luz ultravioleta de alta energía o luz azul, tejidos que contienen células que expresan este gen, se observa un brillo verde fluorescente. (Díaz *et al.* 2010 y Finer and Dhillon 2008)

Es importante resaltar que el desarrollo de la técnica de PCR en 1985, por Kary Mullis, revolucionó la manipulación del ADN, facilitando la inserción de sitios de restricción en posiciones que flanquean un gen, o su promotor, lo que facilita la clonación, así como la eliminación de sitios de restricción internos, mientras se mantiene la integridad del gen (Curtis 2008).

Se han desarrollado muchos métodos de transformación, entre ellos se encuentran los de "transferencia directa de ADN" que incluyen la transformación de protoplastos utilizando polietilenglicol (PEG) o electroporación, bombardeo de partículas y la microinyección (Twyman *et al.* 2002).

Si bien la primer metodología de transformación genética de plantas desarrollada fue mediada por *A. tumefaciens*, no resultó inicialmente de utilidad para abordar la transformación de especies de gran importancia económica como los cereales, debido a que éstos no son hospedantes naturales de esta bacteria, situación que condujo al desarrollo de métodos físicos de transformación, como los indicados inicialmente (Díaz *et al.* 2010). Sin embargo, la capacidad de *Agrobacterium* para transformar genéticamente una amplia variedad de especies vegetales, le ha ganado un lugar de honor en la investigación básica y la biotecnología vegetal moderna (Citovsky *et al.* 2007). Por ello hoy en día, el método de elección para la mayoría de los esfuerzos de transformación de plantas es a través de *Agrobacterium* (Finer and Dhillon 2008).

### **2.3. Transformación mediada por *Agrobacterium***

Existen dos especies de *Agrobacterium* capaces de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Así, *A. tumefaciens* causa tumores (agallas), enfermedad que se conoce como "agalla de la corona" y *A. rhizogenes* induce la proliferación de raíces dando lugar a la enfermedad denominada "raíz en cabellera" (Díaz *et al.* 2010). La característica más importante de estas bacterias es que, durante la patogénesis un fragmento de sus plásmidos (Ti y Ri respectivamente) llamado T-ADN (por transfer-DNA), es transferido a la célula vegetal, donde se integra al ADN cromosómico (Prieto E. 2005 y Díaz *et al.* 2010).

De esta manera, el sistema mediado por *A. tumefaciens* es el más estudiado y utilizado en la transformación de plantas. El T-ADN está delimitado por dos repeticiones directas imperfectas de 25 pares de bases (pb) que lo flanquean, llamadas bordes derecho e izquierdo. Estos bordes son los únicos elementos en cis necesarios para dirigir el procesamiento del T-ADN. Cualquier fragmento

de ADN ubicado entre estos bordes puede ser transferido a la célula vegetal. A este nivel, es conocido a mucho detalle la etapa de la patogénesis que ocurre en la bacteria (Gelvin 2003; Citovsky *et al.* 2007).

Este mecanismo de ingeniería genética natural es aprovechado para la transferencia de genes de interés a las plantas (Finer and Dhillon 2008). Para ello, los oncogenes y los genes de síntesis de opinas (compuestos aminoácidos derivados de arginina) presentes en el T-ADN, son reemplazados por un marcador seleccionable y el gen a transferir (Prieto E. 2005).

De esta manera, los plásmidos Ti sin oncogenes se denominan "desarmados", son de gran tamaño y resulta difícil introducir genes en su T-ADN usando técnicas habituales de ADN recombinante. Por esta razón, se han desarrollado dos sistemas de vectores para introducir genes en *Agrobacterium*: los vectores cointegrados, y los binarios (Díaz *et al.* 2010). Los vectores cointegrados han sido en gran parte sustituidos por vectores binarios, en los que genes *vir* y el T-ADN no oncogénico son clonados en plásmidos separados (Twyman *et al.* 2002 y Díaz *et al.* 2010).

Este sistema de transformación permite transferir fragmentos de ADN de hasta 150 Kb, facilitando la introducción de bibliotecas génicas y la introducción simultánea de muchos genes en un vector cointegrado (Twyman *et al.* 2002 y Díaz *et al.* 2010). El análisis por hibridación molecular de plantas transgénicas y su progenie ha demostrado que el T-ADN se incorpora al ADN cromosómico y se hereda en forma estable.

Los métodos de transformación más utilizados actualmente se basan en la obtención de células transgénicas vegetales y posterior recuperación de plantas completas y fértiles, a partir de las mismas, a través del cultivo y selección *in vitro* (Díaz *et al.* 2010). Sin embargo, con esta técnica en la actualidad no se pueden regenerar plantas enteras de todos los tipos de células, ni en todas las especies vegetales. Son pocas especies vegetales en las que se ha desarrollado esta técnica para muchos de sus diferentes tipos de células. Así, un tejido vegetal blanco ideal, sería el óvulo fertilizado o incluso el polen que da lugar al embrión fertilizado. Desafortunadamente, estos tejidos objetivo ideales no parecen ser accesibles para todas las plantas, con la excepción de algunas especies como las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula*, además de otras conocidas como el trigo y *Dendrobium* (Finer and Dhillon 2008; Pinthong 2015; Trieu *et al.* 2000; Zale *et al.* 2009).

De esta manera, la técnica de transformación por inmersión de las inflorescencias de *A. thaliana* desarrollada por (Clough and Bent 1998) tiene grandes ventajas como no requerir del cultivo *in*

*in vitro* para el desarrollo de los plantines transformados, trabajo reducido, equipo relativamente barato, pocos reactivos especializados, fácilmente escalable y por lo tanto permite la producción de un gran número de líneas transgénicas de *Arabidopsis* independientes (Zhang *et al.* 2006). A través de esta técnica se obtiene la generación de semillas transgénicas independientes, probablemente como resultado de la transformación mediada por *Agrobacterium* del gametofito femenino u ovario. Usualmente cada semilla proviene de un evento diferente de transformación. (Finer and Dhillon 2008).

#### **2.4.Mecanismos de respuesta a estrés o estrés abiótico vegetal**

La radiación, la temperatura, el agua y los nutrientes son factores del medio ambiente que afectan el crecimiento y el desarrollo de las especies vegetales. La distribución de las plantas sobre la tierra depende, por lo tanto, de la existencia e intensidad de estos factores (Puebla and Del Viso 2004). En este contexto, se define a los estreses ambientales como cambios en las condiciones del medio que reducen o cambian desfavorablemente el crecimiento o desarrollo de las plantas (Levitt 1980). Constituyéndose, los estreses abióticos como la principal causa de pérdidas en los cultivos. Estas pérdidas de productividad superan a veces, según cálculos estimativos, el 50% (Del Viso *et al.* 2010).

Los factores de estrés ambiental provocan en las plantas respuestas complejas que se manifiestan a nivel celular, fisiológico y del desarrollo (Levitt 1980) y son caracteres de variación continua (cuantitativos), controlados por un importante número de genes aditivos y probablemente sinérgicos (Bohnert *et al.* 1995). En las plantas en general, el estrés abiótico induce respuestas fisiológicas y bioquímicas que involucran cambios en la expresión génica y modificaciones en el metabolismo de las células. Actualmente se sabe que la variación genética de las plantas contribuye a la tolerancia fisiológica al estrés, mediante la regulación de cuatro procesos fisiológicos principales, que incluyen el control de la homeostasis, el ajuste metabólico y la regulación hormonal, el control del crecimiento, y el control del daño celular (Zhu 2002).

Los recientes avances en el estudio molecular y genético de las respuestas a estreses abióticos llevaron a la identificación de un gran número de loci cualitativos únicos, QTLs y genes relacionados con la tolerancia a este tipo de estrés. Estos nuevos conocimientos posibilitarán modificar la forma de seleccionar en el mejoramiento de cultivos importantes, desde una selección fenotípica a una genotípica (a través de selección asistida por marcadores), aumentando así las posibilidades de mejoras genéticas en los cultivos. En este sentido, los genes inducidos bajo condiciones de estreses abióticos, tales como las bajas temperaturas, la salinidad y la sequía,

codifican proteínas que tienen funciones de señalización, transducción de señales y protección celular (Puebla and Del Viso 2004).

Muchos trabajos se han centrado en el análisis de los perfiles de expresión transcripcional de genes de respuesta a la sequía, la salinidad y al frío (Seki *et al.* 2003; Rabbani *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). Los productos de los genes identificados pueden ser clasificados en cuatro grupos, en base a la función que se presume cumplen sus proteínas. El primer grupo de genes codifica proteínas estructurales que cumplirían directamente una función protectora de la célula en condiciones de estrés. El segundo grupo representa aquellos genes de proteínas que regulan la expresión génica o participan en la transducción de señales en las respuestas al estrés (Bray 1997; Hasegawa *et al.* 2000). El tercer grupo estaría constituido por enzimas involucradas en la biosíntesis de compuestos osmoprotectores, lípidos de membrana y por enzimas que participan de la respuesta antioxidante. Por último, en el cuarto grupo se hallaría integrado por numerosos genes que codifican proteínas de función desconocida (Jenks and Hasegawa 2013).

#### **2.4.1.El ácido abscísico (ABA) y la tolerancia a estrés**

El ABA posee muchas funciones durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero la principal función es la de regular el balance de agua y la tolerancia a estrés osmótico (Puebla and Del Viso 2004). La tolerancia al estrés abiótico es una característica multifactorial que depende de la combinación de muchos genes, proteínas y vías metabólicas, en donde el ABA cumple una función reguladora central. A su vez, varios estudios han demostrado que la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas desencadenan varias respuestas fisiológicas y moleculares en común. En primer lugar, el ABA juega un papel significativo en la tolerancia a estos tres tipos de estrés (P M Chandler and Robertson 1994; Zeevaart and Creelman 1988). Los patrones de expresión de los genes inducibles por estrés abióticos son complejos y muchos de ellos son inducidos también por la aplicación exógena de ABA. A su vez, se ha comprobado que las vías de transducción de señales inducidos por estrés osmótico, ABA y bajas temperaturas, interactúan y convergen, activando la expresión de genes en común (Ishitani *et al.* 1997). Existen, sin embargo, algunos genes inducibles por estreses abióticos que no responden a esta hormona. Esto sugiere que entre la señal inicial de sequía, salinidad o estrés por frío y la expresión de genes específicos existen cascadas de señales de transducción dependientes e independientes de ABA (Puebla and Del Viso 2004).

### **2.4.2. Estrés hídrico**

La disponibilidad de agua es el factor más importante que afecta los cultivos. La sequía causa deshidratación celular por remoción de agua hacia los espacios extracelulares resultando en la reducción del volumen vacuolar y citosólico. Asimismo, causa reducción del crecimiento vegetativo por disminución de la tasa fotosintética, y en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) que afectan negativamente las estructuras celulares y el metabolismo (Del Viso *et al.* 2010). Es así que el estrés hídrico, en su sentido más amplio, incluye tanto a la sequía como a la salinidad, generalmente inhibe el crecimiento celular y las evidencias indirectas sugieren que existen señales de división celular y expansión relacionadas con las kinasas dependientes de ciclinas (Zhu 2002).

Por otro lado, las plantas sufren deshidratación o estrés hídrico, no sólo durante la sequía o las altas concentraciones de sales sino también durante condiciones de bajas temperaturas. Durante la exposición de las plantas a temperaturas de congelamiento la formación de hielo extracelular impone una fuerza deshidratadora a la solución no congelada intracelular. La formación de hielo lleva a una rápida concentración de los solutos extracelulares y el cambio de potencial químico y osmótico provoca que el agua líquida se mueva hacia fuera de la célula. (Puebla and Del Viso 2004)

### **2.4.3. Estrés Salino**

Las altas concentraciones salinas en los suelos afectan a las plantas en al menos dos formas. En primer lugar dificultan a las raíces la extracción de agua del suelo y en segundo lugar resultan tóxicas para toda la estructura vegetal. Las diferentes especies varían en su tolerancia al estrés salino. Los efectos causados por el estrés salino son esencialmente la disrupción del equilibrio osmótico e iónico por exceso de sodio ( $\text{Na}^+$ ), y la producción de EROS (Especies Reactivas de Oxígeno). Niveles tóxicos de  $\text{Na}^+$  afectan la actividad de diversas enzimas y causan la desorganización de las membranas, la reducción del crecimiento, y la inhibición de la expansión y la división celular (Del Viso *et al.* 2010).

### **2.4.4. Estrés por altas temperaturas**

Está determinado tanto por el aumento de la temperatura ambiental sobre la óptima inherente a cada especie, como por la radiación solar. Las hojas son los órganos que más sufren este tipo de estrés. Así, las altas temperaturas, al igual que las bajas, afectan la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares y conducen a la apertura estomática para refrigerar la hoja (Del Viso *et al.* 2010).

#### 2.4.5. Estrés por bajas temperaturas

Las especies vegetales adaptadas a climas templado-fríos, como los cereales de invierno, toleran bajas temperaturas (0 – 15 °C), y aún temperaturas de congelamiento si son expuestas a un proceso conocido como aclimatación. En contraste, las especies de climas tropicales y subtropicales, como el maíz o el tomate, son sensibles a las bajas temperaturas y en su mayoría carecen de mecanismos de aclimatación (Del Viso *et al.* 2010). De esta manera, las plantas capaces de aclimatarse al frío perciben las bajas temperaturas sobre cero durante el avance del invierno y disparan procesos bioquímicos específicos que resultan en la tolerancia, aún, de temperaturas de congelamiento (Thomashow 1999). En este sentido, la aclimatación al frío está asociada a un número de cambios bioquímicos, fisiológicos y a la expresión de novo de genes, síntesis de proteínas y varios cambios fisiológicos (Guy 1990; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1996). Los mecanismos que contribuyen a la tolerancia incluyen la prevención de la desnaturalización de proteínas inducida por bajas temperaturas, la prevención de la precipitación de moléculas y la atenuación de las consecuencias de la formación de hielo intercelular (Puebla and Del Viso 2004). De esta manera, estos mecanismos de adaptación a condiciones ambientales adversas son controlados por redes moleculares involucradas en la percepción del estrés, la transducción de las señales, y la regulación de la expresión de genes efectores (Del Viso *et al.* 2010).

La aclimatación al frío también puede inducir cambios en la composición lipídica de las membranas plasmáticas de las plantas, especialmente el aumento de la cantidad de ácido graso insaturado en las membranas; aumento de los niveles de ácido graso insaturado contribuyen a estabilidad de la membrana (Wada *et al.* 1990; Hitz *et al.* 1994). Además, varios otros factores, incluyendo la acumulación de azúcares solubles, aumento de los niveles de antioxidantes y la modulación de las actividades de diferentes enzimas metabólicas, también parecen jugar un papel importante en el alivio de daño celular inducido por congelación (Livingston and Henson 1998; Thomashow 1999). En éste sentido, no es sorprendente que la función clave de la aclimatación al frío es estabilizar las membranas contra el daño por congelamiento (Sun *et al.* 2007).

Se sabe que una vez que los sensores primarios perciben una señal de baja temperatura, las plantas generan segundos mensajeros, tales como fosfatos de inositol y especies reactivas de oxígeno, que mediante la modulación de niveles intracelulares de  $Ca_2^+$ , puede iniciar cascadas de fosforilación de proteínas, finalmente activan proteínas que proporcionan protección celular o factores de transcripción que controlan la expresión de conjuntos específicos de genes regulados por frío (COR - del inglés cold-regulated). Las proteínas codificadas por estos genes presentan regiones con

capacidad para formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas que podrían estar involucradas en la estabilización de las membranas durante las bajas temperaturas (Puebla and Del Viso 2004).

## 2.5. Familia de proteínas COR

En las últimas décadas, importantes esfuerzos se han dirigido a la identificación de genes regulados tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas (Chen *et al.* 2010). Numerosos estudios demostraron que cambios en la expresión génica se producen en *Arabidopsis* en respuesta a bajas temperatura (Thomashow 1999, Zhu 2001, Chinnusamy *et al.* 2007 y Janmohammadi *et al.* 2015). A estos genes se les dio varias designaciones que incluyen *COR* (cold-regulated), *LTI* (low-temperature-induced), *KIN* (cold-induced) y *RD* (responsive to dehydration) (Fowler *et al.* 2005). Así, los diversos genes de respuesta a estrés pueden clasificarse en términos generales como genes de inducción temprana y tardía. Los primeros genes son inducidos a pocos minutos de la percepción de señales de estrés, e incluyen a aquellos que codifican a diversos factores de transcripción y muchas otras proteínas reguladoras. Los genes de expresión tardía incluyen los principales genes de respuesta a estrés tales como *RD*, *KIN* y *COR*, que codifican y modulan la síntesis de proteínas necesarias para la tolerancia a estrés (Tuteja 2009).

La expresión de algunos genes *COR* ha demostrado ser crucial tanto para la tolerancia como la aclimatación al frío en plantas (Thomashow 1999 citado por Tuteja 2009). También se sabe que, la regulación de la expresión de estos genes involucra múltiples mecanismos, incluyendo las vías ABA-dependientes y ABA-independiente (Thomashow 2001; Xiong *et al.* 2002). A pesar de que la actividad funcional de la mayor parte de las proteínas *COR*, *LEA* y *dehidrinas* sigue siendo especulativa, hay pruebas de que el polipéptido codificado por *COR15a* ayuda en la estabilización de las membranas frente al congelamiento (Artus *et al.* 1996; Steponkus *et al.* 1998). Asimismo se han identificado genes *COR* de *Arabidopsis* que codifican proteínas, tales como *COR6.6*, *COR15a*, *COR78*, y *COR47*. Muchas de estas proteínas son polipéptidos hidrófilos que podrían tener un papel de criostabilidad de membrana, aunque ninguno ha demostrado ser proteínas de la membrana con dominios transmembrana (Kawamura and Uemura 2014). Sin embargo, (Thomashow 1999) sugiere como función de *COR* la estabilización de las membranas. Algunas proteínas *COR* son capaces de proteger otras proteínas contra la inactivación por congelación-descongelación *in vitro* (Bravo *et al.* 2003; Hara *et al.* 2003; Sanchez-Ballesta *et al.* 2004 citados por Fowler *et al.* 2005). También, se ha planteado la hipótesis de que las proteínas *COR* podrían actuar como un "tampón de hidratación", secuestrando iones y renaturalizando proteínas desplegadas (Bray 1993; Wise and

Tunnacliffe 2004). Se ha relacionado a COR 6.6 con la señalización del calcio (Knight *et al.* 1996; Tähtiharju *et al.* 1997).

WCOR413 es una familia proteica específica del reino vegetal (Breton *et al.* 2003 citado por Wang *et al.* 2006). Se ha propuesto dos posibles mecanismos de acción para las proteínas COR413 en plantas, el de protección de las membranas celulares durante el estrés y el de señalización para la activación de la respuesta al estrés.

Según Fowler y colaboradores 2005, la familia de genes *COR413* en *A. thaliana* comprende tres genes (*At1g29395*, *At2g15970* y *At1g29390*) que codifican proteínas transmembrana, proponiendo su localización subcelular cloroplástica (en plasma o membrana tilacoide). Presentando la posibilidad de jugar un papel estructural en la estabilización de las bicapas de lípidos de membrana a bajas temperaturas (Fowler *et al.* 2005). El grupo de Breton *et al.* 2003 mostró que en cereales y *Arabidopsis*, la expresión de esta familia está correlacionada con el desarrollo de tolerancia a las bajas temperaturas y sus genes estarían regulados por ABA y estrés hídrico. COR413 estaría conformada por proteínas de membrana plasmática y proteínas de membrana tilacoide, cuyas predicciones estructurales mostraron una alta similitud estructural entre COR413 y receptores acoplados a proteínas G (Breton *et al.* 2003). Esto llevó a este grupo de investigación a proponer un rol de señalización para estas proteínas en la respuesta al estrés abiótico. Sin embargo, a la fecha, son muy escasos los trabajos que aportan datos funcionales para la familia *COR413*. Uno de ellos reporta la identificación y caracterización del gen *XVSAPI* de la planta de resurrección *Xerophyta viscosa* (Garwe *et al.* 2003), que codifica una proteína con alta homología a WCOR413 de trigo. Este estudio mostró que el gen *XVSAPI* se induce en respuesta a la deshidratación, a las altas y bajas temperaturas y a la salinidad. La sobreexpresión del gen en *Arabidopsis* aumentó la tolerancia de las plantas transgénicas al estrés osmótico, salino y por altas temperaturas (Garwe *et al.* 2006), aportando este trabajo, la primera evidencia experimental sobre el rol de un miembro de la familia COR413 en la respuesta de tolerancia al estrés abiótico. Posteriormente (Okawa *et al.* 2008) demostraron que COR413 de *A. thaliana* estarían localizadas en la membrana interna envolvente del cloroplasto y no así en la membrana tilacoide como lo propusieron Breton *et al.* 2003

## **2.6. *Physcomitrella patens***

*P. patens*, se ha consolidado como un modelo para estudios funcionales de genes vegetales mediante genética reversa (Schaefer and Zryd 1997; Kamisugi *et al.* 2005). Se ha demostrado que *Physcomitrella* exhibe una alta tolerancia al estrés osmótico y salino (Saavedra *et al.* 2006; Frank *et al.* 2004) y a las bajas temperaturas (Oldenhof *et al.* 2006). El ABA induce en esta planta la

acumulación de proteínas homólogas a las que se acumulan en plantas superiores, y está asociado tanto con la respuesta como con la supervivencia al estrés hídrico y por bajas temperaturas (Saavedra *et al.* 2006; Frank *et al.* 2004; Kamisugi and Cuming 2005; Cuming *et al.* 2007). Estos resultados son esperables, ya que la tolerancia a la deshidratación es un fenómeno de adaptación al hábitat terrestre muy antiguo dentro del reino vegetal. Las briofitas habrían sido las primeras plantas adaptadas a la vida fuera del agua. Estas plantas ocupan nichos con ciclos de deshidratación y rehidratación y generalmente presentan tolerancia vegetativa a la deshidratación, la cual se manifiesta como supervivencia anhidrobiótica (Dilks and Proctor 1974).

Por lo tanto, las briofitas que habitan en regiones con cambios en la disponibilidad de agua, como *Physcomitrella*, tienen mecanismos muy eficientes de control y mitigación del daño celular que puede ser generado por déficits hídricos y por lo tanto, estas plantas son consideradas tolerantes a la deshidratación (Charron y Quatrano 2009). De hecho, *P. patens* puede sobrevivir en todo el mundo y son la vegetación dominante en algunas regiones ecológicas como la Antártida (Robinson *et al.* 2003). La amplia distribución de *P. patens* es debido a su capacidad para adaptarse con éxito fisiológicamente a varias condiciones ambientales extremadamente estresantes, incluyendo bajas temperaturas (Sun *et al.* 2007).

*Physcomitrella* tiene además características ideales para estudios de genética reversa en plantas. En plantas superiores, la genética reversa mediante la producción de mutantes *knockout* dirigidos a loci específicos es difícil dada la baja frecuencia de recombinación homóloga (RH) en estas plantas. La RH es el proceso en el que se intercambian dobles hebras de DNA en zonas donde existe una similitud substancial de las secuencias (es decir, homología). Mientras más largo sea el segmento homólogo, más posibilidad de recombinación habrá (Puchta and Hohn 1996). Este proceso es más común en bacterias y muy poco conocido en el genoma nuclear de plantas superiores. Sin embargo, *Physcomitrella* al pertenecer al grupo de las briofitas, incorpora ADN exógeno a su genoma fundamentalmente mediante el proceso de RH. Esto, conjuntamente con el hecho de que su genoma haya sido secuenciado (Rensing *et al.* 2008), permite diseñar construcciones para la disrupción de genes específicos generando mutaciones *knockout* en loci de interés. A su vez, su ciclo de vida es predominantemente haploide, lo que facilita la caracterización fenotípica de los mutantes (Sun *et al.* 2007).

En este sentido, el equipo de la Dra. Sabina Vidal en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Uruguay, generó una biblioteca de ADNc (ADN copia) enriquecida en secuencias correspondientes a genes inducidos por ABA (Ácido abscísico) en el musgo *Physcomitrella patens*, que es un modelo vegetal tolerante a la

deshidratación, salinidad, estrés oxidativo y al frío, y que ha probado ser muy útil para estudios funcionales de genes mediante genética reversa. A partir de esta biblioteca, se realizaron estudios de expresión de estos clones y se identificó una serie de genes regulados diferencialmente en condiciones de estrés abiótico. Uno de los genes identificados (*PpCOR413*- Phypa\_28204), codifica para una proteína similar a WCOR413, una proteína cloroplástica deducida a partir de un gen identificado originalmente en trigo, que se induce por bajas temperaturas en variedades de trigo de invierno (Breton *et al.* 2003). Esta proteína también estaría involucrada en la crioprotección del plasmalema y protección ante la deshidratación (Danyluk *et al.* 1996 citados por Lee *et al.* 2008) e inducidas por deshidratación, estrés salino, bajas y altas temperaturas y alta intensidad lumínica en plantas de resurrección (Garwe *et al.* 2003). A su vez, varios genes WCOR413, en diferentes especies vegetales, están regulados por ABA y estrés hídrico (Frank *et al.* 2004 citados por Wang *et al.* 2008). Según Ruibal Croce 2015, se identificó otras secuencias de proteínas WCOR413 en el genoma de *P. patens* denominadas PpCOR1 (Phypa\_181142), PpCOR2 (Phypa\_105296), PpCOR3 (Phypa\_122476), PpCOR4 (Phypa\_137869), PpCOR5 (Phypa\_122476) y PpCOR6 (Phypa\_137869) y de acuerdo a la relación filogenética entre estas proteínas de *P. patens* y las de otras plantas, incluyendo *A. thaliana*, trigo y *B. distachyon*, claramente separan a PpCOR413 del resto de las proteínas WCOR413 de *P. patens*, y la posicionan en el mismo grupo de *Brachypodium* y trigo (Ver Figura 1).

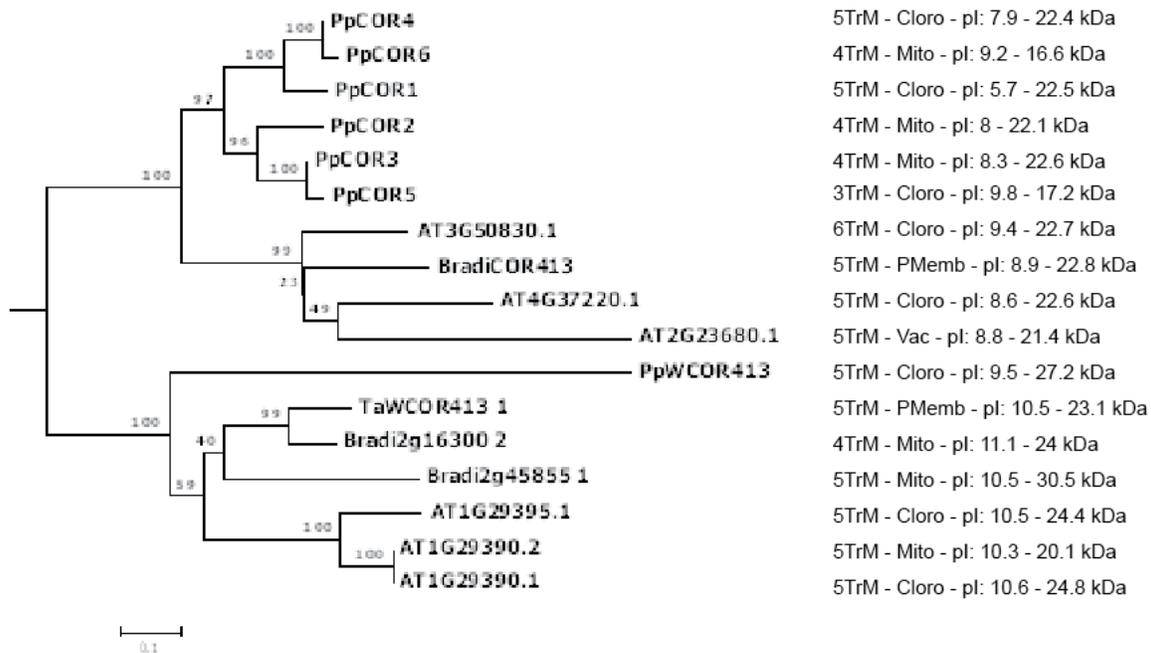


Fig. 1. Relación filogenética entre proteínas WCOR413 de *P. patens* (Pp), *A. thaliana* (At) y *B. distachyon* (Bradi). Fuente (Ruibal Croce 2015).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

- Analizar la contribución potencial de la proteína COR413 de *Physcomitrella patens* en la tolerancia al estrés abiótico.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Generar un vector de expresión de *PpCOR413* y analizar el impacto de su sobreexpresión heteróloga en el desarrollo de plantas (peso y largo de raíz) de *Arabidopsis thaliana*, en condiciones de estrés abiótico.
- Determinar la localización subcelular de la proteína COR413 de *Physcomitrella patens* en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Generar líneas de *Physcomitrella patens* que contengan el gen *PpCOR413* disrupcionado, para su posterior caracterización fenotípica.

#### 3.3. Hipótesis

La proteína COR413 de *Physcomitrella patens* contribuye en la tolerancia a estrés abiótico en al menos uno de los factores estudiados (salinidad, frío, potencial osmótico y oxidación).

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Localización

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Instituto de Química Biológica, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, en Montevideo, Uruguay. También llegó a desarrollarse tratamientos en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, dependiente de la Carrera de Biología de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales, de la Universidad Mayor de San Andrés, en La Paz, Bolivia.

### 4.2. Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizó *Physcomitrella patens* Grandsen tipo salvaje (wt - wild type) y su mutante KO-COR 5 (Knockout para *PpCOR413*), tanto en estado de protonema como de gametofito folioso (en forma de colonias), bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Schaefer *et al.* 1991).

Medio de crecimiento: Medio basal Hoagland's (Composición puede observarse en el anexo 1) para 1 litro (Arnon and Hoagland 1950) + BCDAT (1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5; 10 mM KNO<sub>3</sub>; 45 μM FeSO<sub>4</sub>; 4 mM tartrato de amonio) + 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 g/l de agar, sobre discos de celofanes estériles según fue descrito por Ashton and Cove (1977). Para la micropropagación, en condiciones estériles, se cortaron las colonias y se transfirieron a medio nuevo. La generación de protonema se realizó mediante la maceración en mortero estéril con 2 ml de agua bidestilada estéril. Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad, con iluminación fluorescente (50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) y una temperatura promedio de 22° C.

Para realizar el experimento se dividió en dos cada placa y se sembró el clon KO-COR 5 en un lado y wt en el otro, como se puede observar en la figura 2, de esta manera se obtuvieron placas en las que se realizaron evaluaciones de su respuesta fenotípica. De manera de asegurarse que el tratamiento se exprese en ambos genotipos por igual. Seguidamente, después de un transcurso de 3 semanas, se procedió a observar el desarrollo de los clones y finalmente se evaluó su peso fresco y seco tanto de KO-COR 5 como del wt.



Fig. 2. Respuesta fenotípica de *Physcomitrella patens* wt y KO-COR 5 en placas Petri en condiciones de cultivo estándar.

Vitroplantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia (Col) y transformantes (T2) que sobreexpresarían *PpCOR413-GFP* (COR-GFP 22 y COR-GFP 10), desarrolladas a partir de germinación *in vitro* de sus semillas. Estas semillas inicialmente, se esterilizaron durante 15 minutos en una solución 7% de hipoclorito de sodio + 0.05% Tween-20, se lavaron varias veces con agua destilada y se dejaron en agua a 4°C durante 3 días, para romper la dormición e imbibir y luego se traspasaron a placas de petri estériles con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962, su composición puede observarse en el anexo 2) a la mitad de su concentración con 5 g/l de sacarosa, 0.5 g/l ácido Monohydrate 2-ethanesufonic (MES), 10% agar y pH 5.7 (denominado medio ½AR), suplementado con con 50 µg/ml de kanamicina para el caso de los tranformantes. Las plantas crecieron bajo condiciones normales de la sala de crecimiento, que corresponde a una temperatura promedio de 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas y una iluminación fluorescente de 120 µmol<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>. La producción de semillas se obtuvo mediante el traspaso de las vitroplantas a macetas con tierra, donde crecieron durante 40 días aproximadamente a 24 °C en promedio, con un fotoperiodo de 16 horas y una iluminación incandescente de 200 µmol<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>. Para los análisis fenotípicos, vitroplantas de 1 semana de germinadas fueron transferidas a placas de 140 x 20 mm con medio ½AR, realizandose varios tratamientos (Ver figura 3): asperjadas con una solución estéril de 10 mM de Methyl viologen (Paraquat - PQ), suplementadas con 150 mM, asperjadas con una solución estéril de 5 mM Ácido Salicílico, suplementadas con NaCl 300 mM de Manitol, placas de agar con una infusión de polyethylene glycol (PEG 6000, 18% y PEG 6000, 30%) según lo descrito por Verslues *et al.* 2006. Para los tratamientos de estrés térmico, estas placas con vitroplantas, fueron llevadas a una sala fría temporizada a 6 °C durante dos semanas, posteriormente se modificó este tratamiento, llevandolas a 4 °C por 48 horas, bajo las mismas condiciones de iluminación de la sala de crecimiento, seguidamente se llevaron a condiciones normales de la sala de crecimiento por 5 días, para proceder a su evaluación, de acuerdo a lo descrito por Chen *et al.*

2010. Los controles para cada tratamiento correspondieron al desarrollo y crecimiento de estas vitropiantas en condiciones normales de temperatura e iluminación.

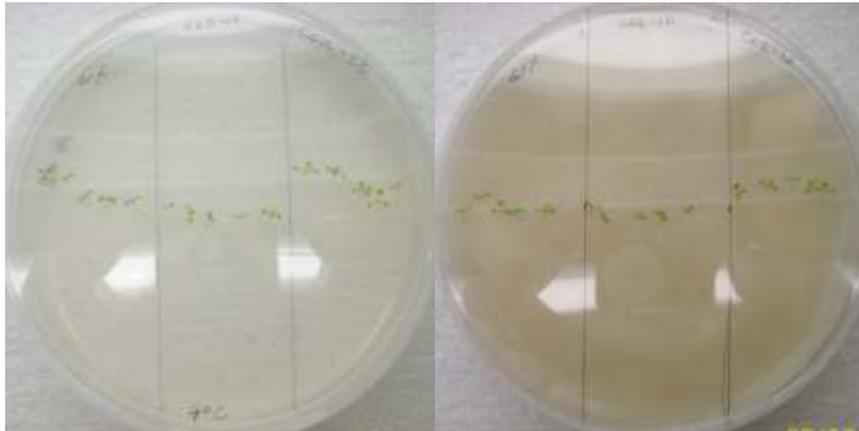


Fig. 3. Tratamientos de respuesta fenotípica a 4 °C y 30 % de PEG 6000 para *Arabidopsis thaliana* wt y transgénicos sobreexpresantes COR 10 y COR 22 en placas Petri con medio ½AR.

Seguidamente, después de 10 días a las plantas de todos los tratamientos se les midió el peso fresco.

Para el segundo tratamiento de estrés térmico, que se realizó posteriormente, adicionalmente se pudo evaluar el largo de raíces de las vitropiantas a través de imágenes a los 7, 9 y 14 días mediante el software ImageJ ([rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij)). Asimismo, para este tratamiento también se midió el peso fresco a 7 y 14 días.

Para el análisis estadístico de las evaluaciones realizadas, se utilizó un diseño completamente al azar. Todos los datos fueron tabulados en MS-Excel y procesados en MSTAT-C versión 1.41 para realizar los respectivos análisis de varianza y prueba de Duncan con un  $\alpha=0.05$ , para identificar las diferencias mostradas a través del análisis de varianza.

### 4.3. Cepas y cultivos de microorganismos

*Escherichia coli*: Se utilizaron las cepas TOP10, DH5 $\alpha$  y DB3.1. Los cultivos de *Escherichia coli* (*E. coli*) se incubaron en medio Luria-Bertani (LB) que contiene 1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, líquido o sólido (LB 1% agar). Para la obtención de células competentes se incubaron en medio SOC (2% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% (10mM) NaCl, 2.5mM KCl, 0.01mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2mM glucosa). Las células de *E. coli* transformadas fueron incubadas en LB con Ampicilina 100 $\mu$ g/ml (LB/Amp), Spectinomomicina 50 $\mu$ g/ml (LB/Sp) y Kanamicina 30 $\mu$ g/ml (LB/Kn).

- *Agrobacterium tumefaciens*: Se utilizó la cepa GV3101. Esta cepa creció en medio YEP (1% extracto de levadura, 1% peptona, 0.5% NaCl) líquido o sólido (YEP 1% agar). Para la transformación de estas células se agregó 1µg de ADN plasmídico y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Se agregó 1ml de medio YEP líquido y se incubó 1 hora a 28°C con agitación. Las células transformadas fueron incubadas a 28°C en medio YEP sólido con Spectinomicina 100µg/ml (YEP/Sp).

#### **4.4. Generación de construcciones génicas en vectores binarios conteniendo el ADNc completo de *PpCOR413* fusionado en marco al gen de GFP y expresados bajo el control de un promotor constitutivo.**

A partir de la secuencia génica ya conocida de *PpCOR413* se diseñaron primers (ver Anexo 3) nombrados en función de la enzima de restricción para la que se diseñaron, el vector y la dirección de lectura de los mismos, de esa manera los primers se nombraron de la siguiente manera, forward Spentr-kpncor (5' tgatggtaccgatggcctctcacatcgt 3') (por ejemplo este primer tiene la dirección de lectura Forward o Sense (S), para el vector pENTR2B (pentr), con sitios de corte de la enzima *KpnI*) y reverse ASpentr-Xhocor (5' atatctcgagtgaacaccataccaggaa 3') (que generan un producto de 776 pb), enfocados en el desarrollo de construcciones génicas para sobreexpresar el gen *PpCOR413* fusionado al gen reportero GFP en *Arabidopsis thaliana*.

Se estandarizó un protocolo de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) para amplificar el gen *PpCOR413* sin codon de parada (STOP), a partir de ADN genómico, debido a que el tamaño del gen es reducido y la secuencia genómica no presenta intrones, no requiriéndose por ello iniciar con ADNc y su amplificación. El detalle del mencionado protocolo puede observarse en el Anexo 4.

Se procedió a clonar el producto de PCR (*PpCOR413*), a través del TA Cloning® Kit de Invitrogen, procediendo al protocolo de ligación especificado en el manual del mismo (Invitrogen 2008a), de esta manera se logró introducir este producto en el vector pCR®2.1 (ver figura 4a), obteniendo el vector pCR-COR. Para esta secuencia codificante de la proteína PpCOR413 se utilizó el sistema de clonado de Gateway. Para ello, este fragmento, fue clonado utilizando las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* en el vector de entrada pENTR2B (Gateway, Life Technologies), que se representa gráficamente en la figura 4b.

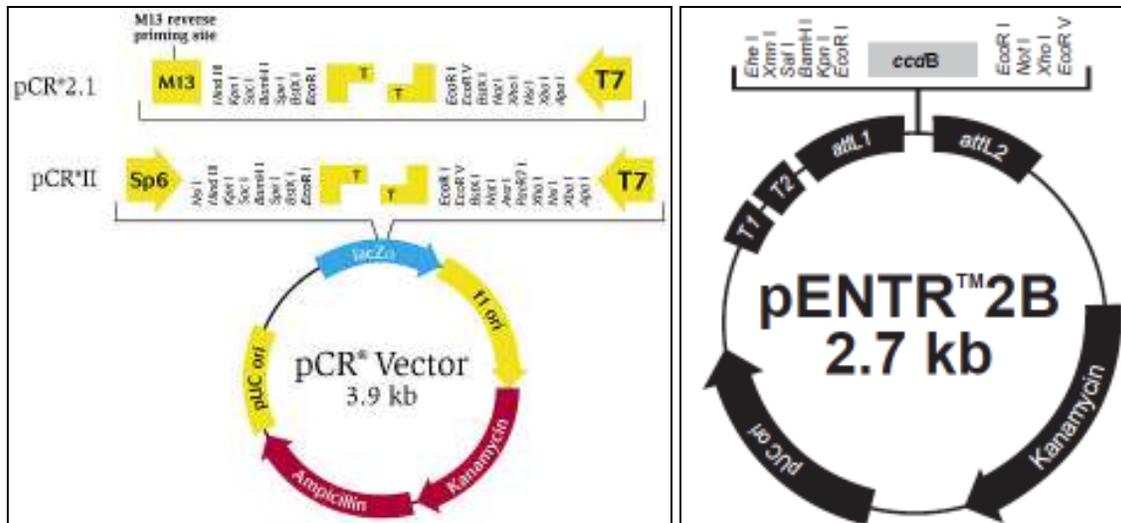


Fig. 4. Representación gráfica de plásmidos a) pCR®2.1 de 3.929 pb con sus respectivos sitios de corte y las enzimas de restricción a utilizar. Fuente (Invitrogen 2008a). b) pENTR™2B de 2.718 pb con sus respectivos sitios de corte y las enzimas de restricción a utilizar. Fuente (Invitrogen 2008b).

Esta construcción inmersa en pCR-COR fue posteriormente recombinada utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen) en el vector binario de destino pGW5, el cual contiene la secuencia codificante para GFP regulada bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. De esta manera, la secuencia de *PpCOR413* se fusiona en marco en el extremo 5' de GFP, resultando un gen quimérico 35S:PpCOR413:GFP, así mismo este vector también confiere resistencia a Spectinomycin (ver figura 5). A partir de este procedimiento se generó un nuevo plásmido que se denominó pGW5COR, que contiene el promotor y terminador constitutivo de CaMV 35S flanqueando al fragmento PpCOR413, además presenta resistencia a kanamicina y spectinomycin, y los extremos LB y RB.

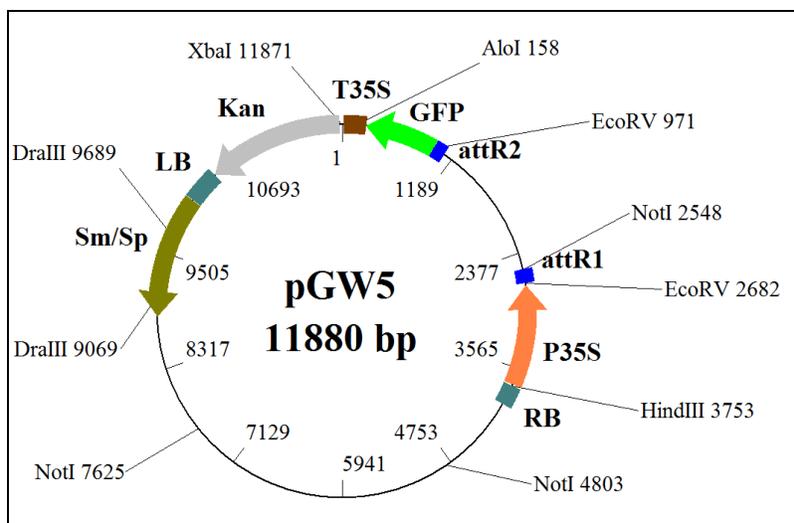


Fig. 5. Representación gráfica de plásmido de sobreexpresión + GFP pGW5 de 11.880 pb con sus respectivos sitios de corte y las enzimas de restricción a utilizar.

Posteriormente, este último plásmido (pGW5COR) fue introducido en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación.

#### 4.5. Transformación de *Arabidopsis thaliana* y caracterización molecular de las líneas transgénicas.

Se realizó la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo silvestre Columbia (Col-0), mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, transformado con la construcción 35S:COR:GFP del plásmido pGW5COR. El protocolo de transformación que se siguió fue el de infiltración por inmersión de las inflorescencias de acuerdo a lo descrito por Clough and Bent 1998.

Las semillas obtenidas de las plantas infiltradas (T1), se sembraron en medio  $\frac{1}{2}$ AR, suplementado con 50 mg/l de kanamicina. Seguidamente, 50 plantas resistentes de cada línea fueron transferidas a tierra para la producción de semillas. Las líneas homocigotas fueron luego producidas a partir de las plantas T2 resistentes y utilizadas para los siguientes análisis moleculares y fenotípicos.

Para la caracterización molecular de las líneas transgénicas, a plantas que sobreviven a la selección con el antibiótico se les extrajo ADN genómico, utilizando para ello material vegetal fresco tal como describen (Dellaporta *et al.* 1983) y ARN total, utilizando un protocolo basado en extracción fenol/cloroformo, seguido por precipitación con LiCl 10µg. Posteriormente con este ADN y ARN se realizaron procesos de PCR y RT-PCR respectivamente, de tal manera de seleccionar las plantas que contienen el transgen *PpCOR413*. Así se llegó a seleccionar los transformantes COR-GFP 22 y COR-GFP 10, para su uso en estudios posteriores fenotípicos.

#### **4.6. Análisis fenotípico de transformantes ante factores de estrés abiótico.**

Las plantas, que sobreexpresaron la proteína PpCOR413-GFP, fueron utilizadas para evaluar la función del producto del gen *PpCOR413* en la tolerancia al estrés abiótico en el contexto heterólogo de *A. thaliana*. Las plantas de *A. thaliana*, transformadas con la construcción génica que contenía la secuencia de ADN completa del gen fusionada al gen reportero GFP, bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S, fueron caracterizadas fenotípicamente frente a factores de estrés hídrico, salino, oxidativo y bajas temperaturas, como se describe en el acápite 4.2 (Material vegetal y condiciones de crecimiento).

#### **4.7. Localización de la proteína PpCOR413 en líneas transgénicas de *A. thaliana*.**

Para los análisis de localización subcelular se utilizaron plantas transgénicas T2 (COR-GFP 22) y wt de 7 días luego de germinadas. Este análisis se realizó a través de observaciones microscópicas de fluorescencia utilizando el microscopio láser confocal Olympus BX61, módulo confocal FV300, anulando la auto-fluorescencia que emiten los cloroplastos, aprovechando el filtro dicróico U-MWIBA2 Ex: 460-495nm Em: 510-550nm. (Alexa fluor 488, EGFP, YOYO 1) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, dependiente del Ministerio de Educación y Cultura de la República de Uruguay y ubicado en la Ciudad de Montevideo.

#### **4.8. Diseño de construcciones para la interrupción génicas del gen *PpCOR413* en *P. patens*.**

A partir de la secuencia génica de *PpCOR413*, ya conocida, se diseñaron primers (ver Anexo 3) nombrados en función de la enzima de restricción para la que se diseñaron y la dirección de lectura de los mismos, de esa manera los primers se nombraron de la siguiente manera, forward s5kpnrcor (5' ggggtaccgtgcatgggtcagg 3' para *kpnI*), reverse as5hindcor (5' aaagcttaccacagaccatactcgc 3' para *hindIII*) (que generan un producto de 802 pb), forward s3bamcor (5' cttggtaccgcttctctgggtatggtgt 3' para *bamHI*) y reverse as3xbacor (5' tgtctagagcaggagaggatggat 3' para *xbaI*) (que generan un producto de 771 pb), enfocados en el desarrollo de construcciones génicas para la generación de mutantes *knockout* del gen *PpCOR413* en *Physcomitrella patens*. De esta manera, se estandarizó un protocolo de PCR para clonar estos segmentos del gen. El detalle del mencionado protocolo puede observarse en el Anexo 5.

Se procedió a clonar cada producto de PCR, a través del TA Cloning® Kit de Invitrogen, procediendo al protocolo de ligación especificado en el manual del mismo (Invitrogen 2008a), de esta manera se logró introducir estos productos en el vector pCR®2.1 (ver figura 4a). Seguidamente para la generación de la construcción de reemplazo de *PpCOR413* se utilizó el vector

pUBW302 (ver figura 6a), clonándose un fragmento de 802 pb en el extremo 5', y un fragmento de 771 pb en el extremo 3' del plásmido flanqueando el casete de resistencia a kanamicina (*nptII*) que tiene este vector. El fragmento 5'COR (correspondiente a la secuencia -314 a 487) y el fragmento 3'COR (correspondiente a la secuencia 745 a 1511). Así, cuando se transforme *P. patens*, mediante recombinación homologa (Figura 6b), se sustituiría la región del genoma donde está PpCOR por esta construcción, de manera de que el gen quede interrumpido por la secuencia de resistencia

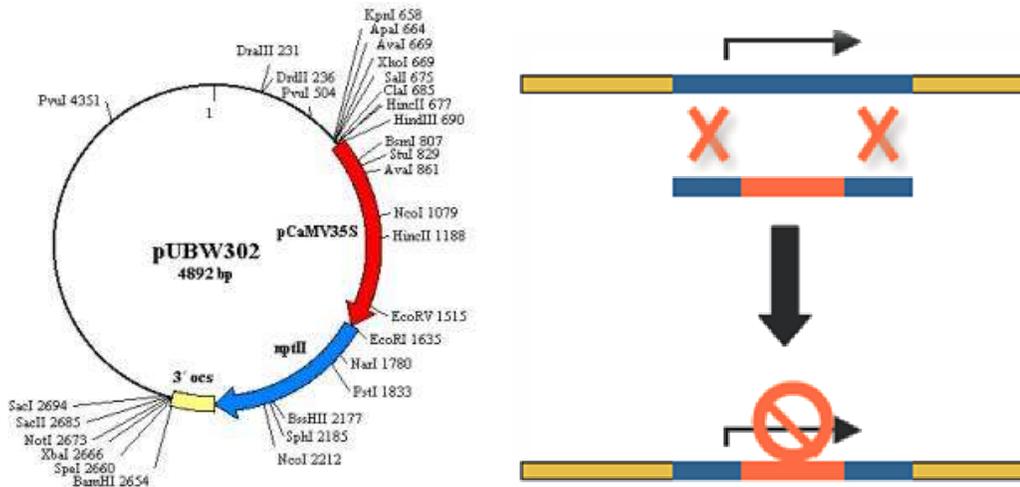


Fig. 6. a) Representación gráfica de plásmido usado para disrupción pUBW302 de 4.892 pb con sus respectivos sitios de corte y las enzimas de restricción a utilizar. b) Representación gráfica del proceso de recombinación homologa.

#### 4.9. Generación y caracterización molecular de mutantes *knockout* en *P. patens*.

Para iniciar el proceso de transformación de protoplastos de *P. patens*, se procedió a digerir el ADN plasmídico de la construcción *knockout* (pKO-COR) con *XbaI*, para linealizar el plásmido de tal manera que la transformación sea más eficiente. De acuerdo a lo descrito por Schaefer *et al.* 1991, a partir de protonemas de *P. patens* se aisló sus protoplastos y se los incubó junto al ADN del plásmido de la construcción *knockout* linealizado con la enzima *XbaI* (pKO-COR+*XbaI*) para proceder a la transformación mediante permeabilización de la membrana de las células por calor y con PEG (protocolo completo se detalla en el anexo 6). Los protoplastos transformados fueron llevados a la sala de crecimiento, donde el fotoperiodo está regulado a 16 horas luz/8 horas oscuridad, con un régimen de fotones de 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y temperatura a 22°C, durante 7 días y se transfirieron a medio Hoagland's con antibiótico de selección (kanamicina G418 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y nuevamente se los dejó crecer bajo las mismas condiciones durante 10 días. Las colonias emergentes resistentes fueron transferidas nuevamente durante 7 a 10 días a placas con medio

normal sin selección, para luego ser transferidas una vez más a medio con selección. Las colonias resistentes fueron finalmente analizadas en cuanto a la correcta incorporación de la construcción de reemplazo en el locus deseado.

La confirmación de la incorporación de la construcción de reemplazo en el locus PpCOR413 se realizó mediante PCR utilizando los siguientes primers (a) forward s5kpncor, (b) reverse as5hindcor que generan el producto 5'COR, y los primers (c) forward s3bamcor junto con el primer (d) reverse as3xbacor que generan el producto 3'COR. También se realizó un PCR con la combinación de los primers (a) + (d), para confirmar la presencia del inserto en el locus correcto. Por último realizó un análisis de la ploidía de las plantas mutantes y salvajes. Para entender mejor todo este proceso se puede observar una representación gráfica del mismo en la figura 7. Para verificar la expresión nula del gen PpCOR413, personal de Laboratorio de Biología Molecular Vegetal aisló ARN total de plantas salvajes y mutantes controles y tratadas con ABA 50µM durante 24 horas, y se realizaron análisis por Northern blot. Como sonda se utilizó el cDNA completo de PpCOR413 marcado con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

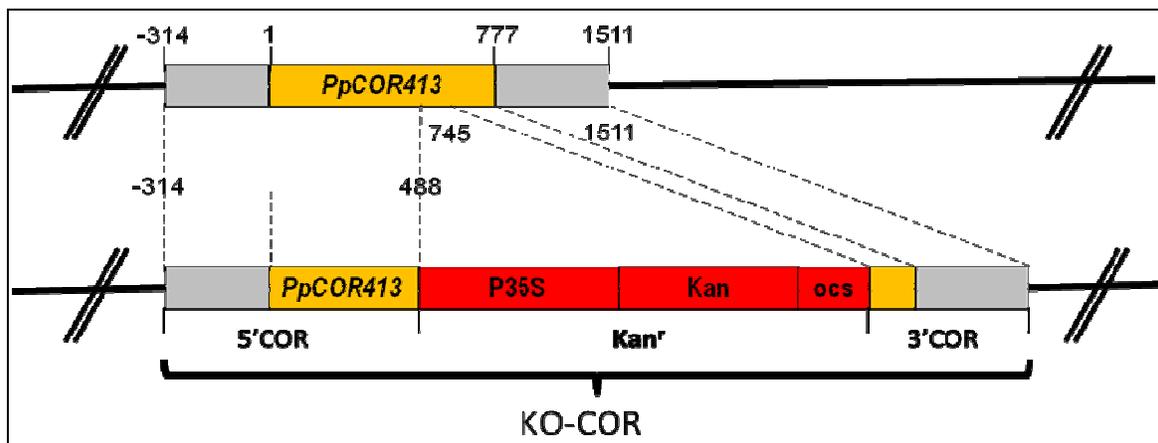


Fig. 7. Estructura genómica de PpCOR413 y su relación con su construcción de interrupción.

#### 4.10. Northern blot.

De acuerdo a lo descrito por Ruibal Croce 2015, ARN total fue separado en gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído y transferido a membrana de nylon (Hybond XL, Amersham Pharmacia Biotech). La membrana fue prehibridada a 65 °C en 5X SSPE, 5X Denhardt's, 0.2% SDS y 0.5 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado. Se dejó hibridando toda la noche a 65 °C. El fragmento de ADN correspondiente al cDNA completo de *PpCOR413* fue marcado con [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP utilizando el sistema de marcado Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech) y utilizado como sonda. La membrana fue lavada dos veces durante 30 minutos a 65 °C con 1 X SSC-0.5%

SDS y expuesta en film de autorradiografía. Se utilizó la tinción con bromuro de etidio del ARN como control de carga.

La muestra de ARN total fue resuspendida en solución con formaldehído 2.2 M, formamida al 50% (v/v), 1x buffer MOPS pH 7 [0.2 M MOPS (ácido 3-Nmorfolinopropansulfónico), 0.05 M NaAc, 0.01 M EDTA] y Bromuro de Etidio aproximadamente 70 ng/ml. Posteriormente fue desnaturalizada mediante incubación a 65 °C por 10 minutos y separada en gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído 2.2 M utilizando buffer MOPS 1 x para la corrida electroforética. 10 µg de ARN total se separaron en un gel de agarosa desnaturalizante. Se transfirió el ARN a membranas de nylon (Hybond-N+, GE Healthcare, Amersham), de acuerdo con Sambrook *et al.* 1989, en solución SSC 20X (3 M NaCl; 0.3 M citrato de sodio) durante toda la noche. El ARN transferido fue fijado a membranas mediante luz UV en un crosslinker.

La sonda utilizada fue digerida con enzimas de restricción a partir de la región de cDNA del gen clonado en plásmido. Estas sondas fueron marcadas utilizando el kit MegaPrime DNA Labelling System (GE Healthcare, Amersham). Se mezclaron 50 ng de sonda y 5 µl de solución de primers al azar en un volumen de 50 µl. Se desnaturalizó durante 5 minutos a 100 °C y se agregó 10 µl de buffer (con dNTP's incluidos) + 5 µl de  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP + 2 µl de enzima Klenow (UNIDADES). Se incubó durante 20 minutos a 37 °C y luego se purificó mediante columnas G-25 de GE Healthcare, Amersham.

La hibridación de la sonda en la membrana se realizó a 65°C durante toda la noche en solución de prehibridación (5X SSPE (43.83 g NaCl, 6.9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.85 g EDTA, 6.75 ml NaOH 10 M; pH 7.4), 0.2 % SDS, 5X Denharts (1 mg/ml Ficoll, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml PVP), 500 µg/ml ssDNA). Se lavó dos veces con SSC 5X, y dos veces con SSC 1X. Estas soluciones se realizaron a partir de SSC 20X (175.2g NaCl + 88.2g citrato- $\text{Na}_3$ , pH 7).

Se expusieron las membranas radioactivas en un casete durante un día y se revelaron en un fotoimager.

#### 4.11. Análisis fenotípico de estos mutantes *knockout*.

Se realizó la comparación del desarrollo del mutante knockour KO-COR 5 y el wt, bajo condiciones normales de cultivo, de acuerdo a lo que se describe en el acápite 4.2. De esta manera se puede definir si la falta de expresión del gen PpCOR413 en condiciones normales afecta el desarrollo de *P. patens*.

#### 4.12. Estrategia

Con el objetivo de analizar la contribución de la proteína COR413 de *Physcomitrella patens* en la tolerancia al estrés abiótico, este estudio planteó tres metas principales. Primero, evaluar la función del producto del gen *PpCOR413* en la tolerancia al estrés abiótico, en un contexto homólogo (*Arabidopsis thaliana*), a través de la generación de líneas que sobreexpresen la secuencia codificante del gen seleccionado. Segundo, identificar la localización de la proteína, a través de la generación de estos sobreexpresantes del gen, fusionado a la secuencia codificante del gen reportero GFP (*Green Fluorescent Protein*). Tercero, obtención de mutantes *knockout* del gen en estudio, a través de la generación de construcciones para la interrupción de *PpCOR413*, con el fin de evaluar el efecto que podría tener la ausencia del producto proteico del gen en estudio, en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Physcomitrella* sometidas a condiciones de estrés abiótico.

Es así que, en función a los Objetivos Específicos, mencionados se desarrollaron las siguientes actividades:

Para el Objetivo 1:

- a) Generación de construcciones génicas, conteniendo el gen completo de *PpCOR413* fusionado en marco al gen de GFP y expresados bajo el control de un promotor constitutivo.
- b) Transformación de *Arabidopsis thaliana* por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*.
- c) Caracterización molecular de las líneas transformantes de *A. thaliana*.
- d) Análisis fenotípico de estos transformantes ante factores de estrés abiótico.

Para el Objetivo 2:

- e) Localización de la expresión de *PpCOR413* a través de la proteína de fusión GFP por microscopia de fluorescencia.

Para el Objetivo 3:

- f) Generación de construcciones génicas para la disrupción del gen *PpCOR413* (*knockout*).
- g) Transformación de protoplastos en *Physcomitrella patens*.
- h) Caracterización molecular de transformantes.
- i) Análisis fenotípico de estos mutantes *knockout* ante factores de estrés abiótico.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Consideraciones generales.

El presente trabajo de investigación se dividió en dos secciones principales, ambas basadas en la generación de construcciones génicas.

La primera parte estuvo enfocada en la generación de construcciones para la sobreexpresión del gen *PpCOR413* (Fig. 8) a través del desarrollo de un plásmido binario (denominado pGW5COR) que contiene la proteína GFP fusionada a la región codificante de *PpCOR413*, bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Esta construcción fue introducida a *Agrobacterium tumefaciens* y utilizada para transformar *Arabidopsis thaliana* y obtener vitroplantas sobreexpresantes de *PpCOR413-GFP*.

La segunda parte se basó en la generación de una construcción de disrupción del gen *PpCOR413* (Fig. 9), por medio del desarrollo de un plásmido que contiene la región 5'COR (desde el extremo 5' hasta casi la mitad del gen *PpCOR413*, correspondiente a la secuencia -306 a 482) y la región 3'COR (desde el extremo 3' hasta casi la mitad del gen *PpCOR413*, correspondiente a la secuencia 754 a 1508) que flanquean a un casete de resistencia a kanamicina (*nptII*), que se denominó pKO-COR, utilizado para la transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens* por recombinación homologa para el remplazo alélico de *PpCOR413*, de manera de obtener mutantes *knockout* para este gen.

Finalmente, se realizaron evaluaciones preliminares de la respuesta a tratamientos de estrés abiótico tanto de los transgénicos de *A. thaliana* sobreexpresantes de *PpCOR413* como de los mutantes *knockout* de *PpCOR413* de *P. patens*.

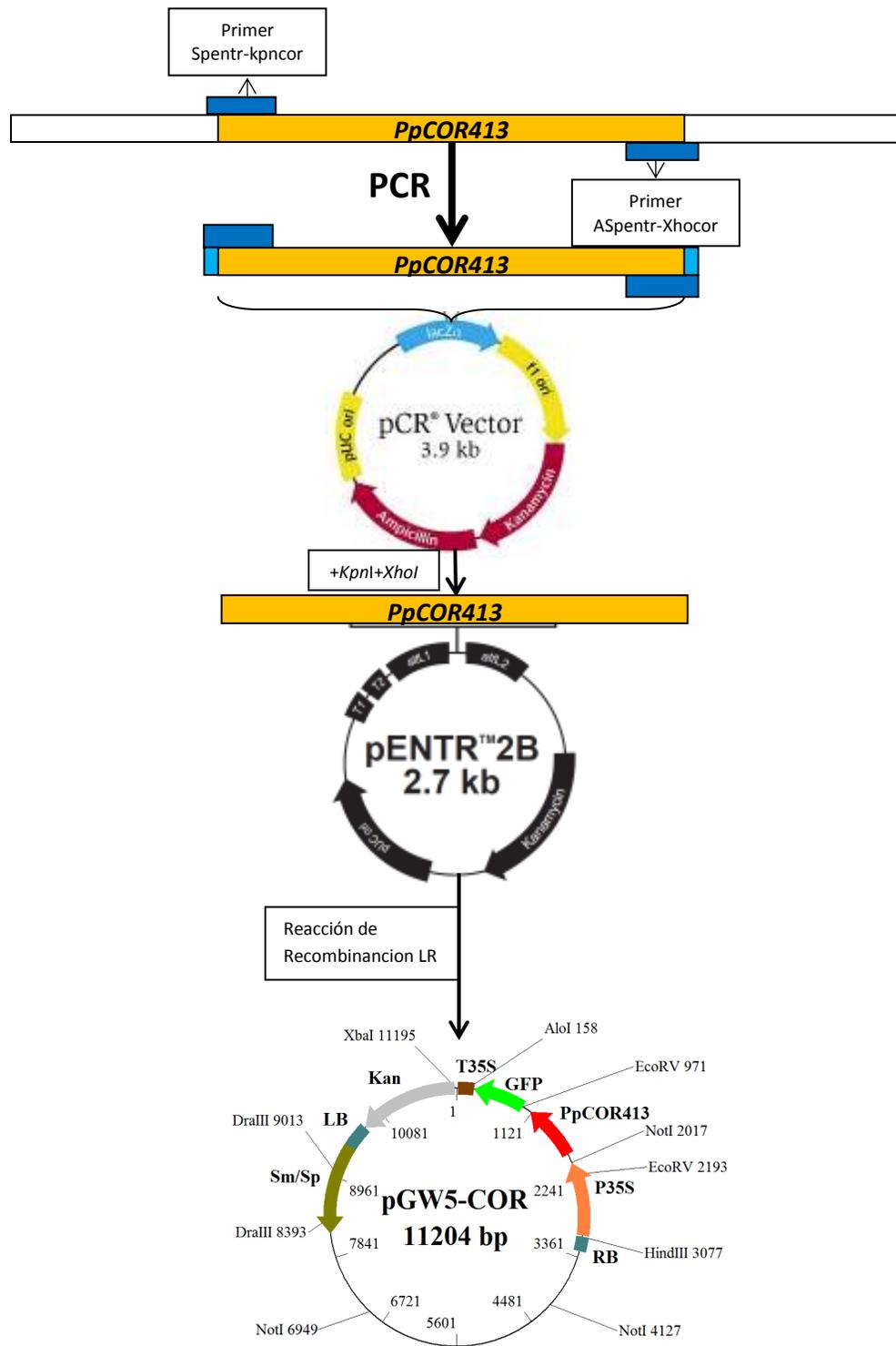


Fig. 8. Esquema del proceso de clonado para la generación de la construcción de sobreexpresión de *PpCOR413-GFP*.

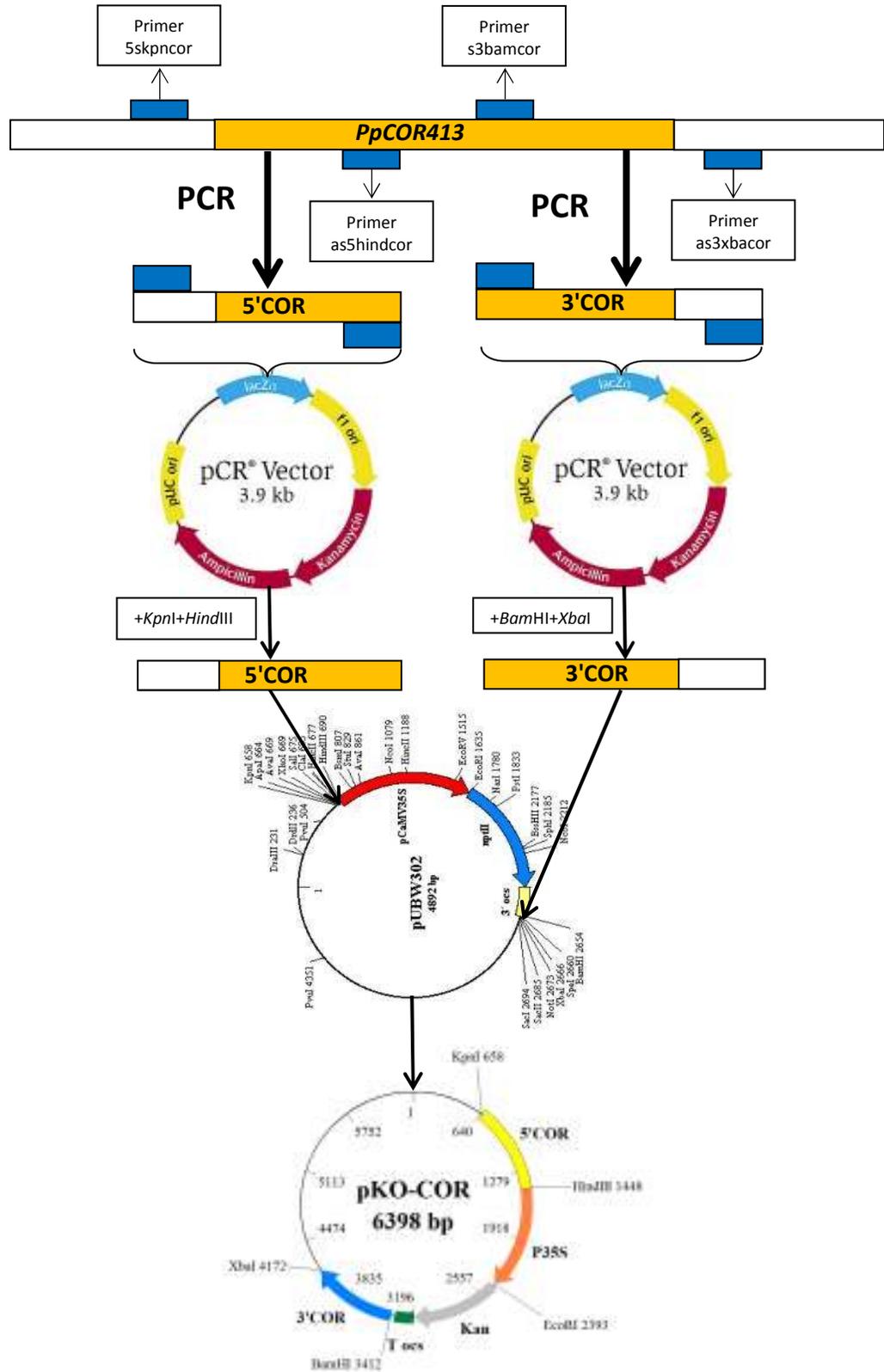


Fig. 9. Esquema del proceso de clonado para la generación de la construcción de disrupción del gen *PpCOR413*

## 5.2. Generación de una construcción génica en un vector binario conteniendo la región codificante de PpCOR413 fusionada al gen de GFP.

Personal del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal realizó la construcción de un vector de sobreexpresión del gen *PpCOR413* fusionado al gen reportero GFP, iniciando a través de la clonación por restricción y ligación de un fragmento de PCR correspondiente a la región codificante de este gen, amplificado con los primers Spentr-kpncor y ASpentr-Xhocor. A partir del producto de PCR obtenido, se realizó la clonación de este fragmento en un vector TA y se transformó *E. coli*. ADN plasmídico del vector pENTR<sup>TM</sup>2B y ADN plasmídico de colonias que mostraron la presencia del inserto fueron digeridos con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI* y se procedió seguidamente a la ligación del inserto PpCOR413 sin el codón STOP y del vector pENTR<sup>TM</sup>2B, aislando y seleccionando una colonia transformada con este nuevo vector, de la que se extrajo su ADN plasmídico para transferir el fragmento de interés al vector binario pGW5, mediante el uso de la reacción de recombinación tipo LR (Gateway® Life Technologies). Este confirió el promotor y terminador constitutivo de CaMV 35S flanqueando al fragmento PpCOR413, presenta resistencia a kanamicina y spectinomomicina, así como la proteína de fusión GFP y los extremos LB y RB y se denominó pGW5COR (Figura 10). Este plásmido fue utilizado para continuar con el trabajo de transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

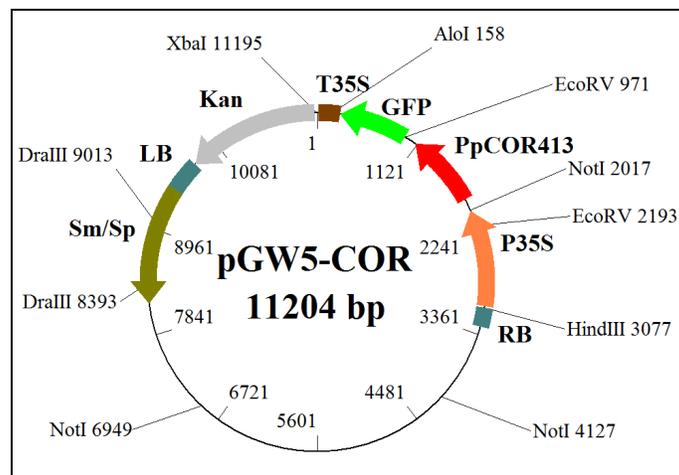


Fig. 10. Representación gráfica de plásmido de sobreexpresión de *PpCOR413* construido ya con la proteína de fusión GFP incluida y denominado pGW5COR de 11.242 pb.

## 5.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción génica de 35S-*PpCOR413*.

La construcción desarrollada en pGW5COR fue introducida en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* que tiene su plásmido Ti desarmado, mediante shock térmico (37 °C por 10 minutos)

llegándose a observar el desarrollo de colonias de *A. tumefaciens* transformadas y crecidas a 28 °C. Se comprobó la presencia del gen *PpCOR413* a través de un procedimiento de PCR de la región *PpCOR413*, utilizando los primers Spentr-kpncor y ASpentr-Xhocor. Seleccionando una colonia para continuar con los procedimientos posteriores.

Se eligió a la colonia 4 para continuar con los procesos que se explican posteriormente.

Ya que se trabajó a partir de ADN genómico en todas las construcciones y para comprobar si el producto génico de pGW5COR presentaba algún intron, además de revisar en la base de datos del genoma de *P. patens*, se realizó una comparación de los productos de amplificación del gen *PpCOR413* usando los primers Spentr-kpncor y ASpentr-Notcor para amplificar la región *PpCOR413* del ADN copia (ADNc) (que se contaba en el laboratorio) y contrarrestarlo con el producto de la amplificación del ADN del plásmido pGW5COR insertado en *Agrobacterium*. Como se observa en la figura 11, el producto de amplificación del plásmido mostró similar patrón al del ADNc de 791 pb (carriles 1 y 2 de la figura 11 respectivamente). Por lo tanto se determinó que la construcción presenta al gen completo, sin intrones.

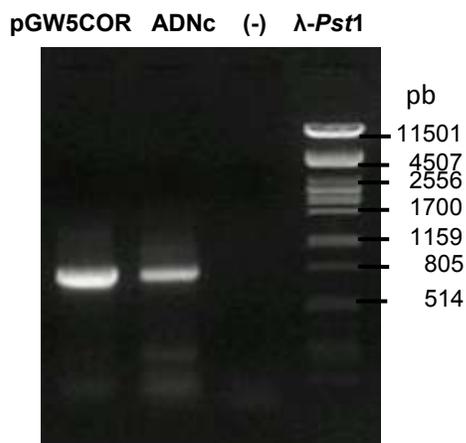


Fig. 11. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % de productos de PCR para la identificación de la secuencia *PpCOR413*, en ADN plasmídico de pGW5COR en colonia de *Agrobacterium tumefaciens* y ADN copia de la región COR 413 de *Physcomitrella patens*. Carril 1 producto de PCR del vector pGW5COR de 776 pb, carril 2 producto de PCR del ADN copia de la región COR413 de *P. patens* de 776 pb, carril 3 control negativo (-) de PCR y carril 4 marcador de peso molecular λ-*Pst1*.

#### 5.4. Análisis fenotípico de transformantes ante factores de estrés abiótico.

A partir de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el plásmido pGW5COR, se realizó la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo silvestre Columbia (Col-0),

mediante infiltración por inmersión de sus inflorescencias (Zhang *et al.* 2006). Las semillas obtenidas por autopolinización fueron sembradas y seleccionadas por su resistencia a kanamicina, durante dos generaciones (T2). Seguidamente, personal del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal analizó los transformantes por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR, del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) para comprobar la presencia del transgen a partir de la presencia de su ARNm (ARNm mensajero) en las plantas desarrolladas de *A. thaliana*. De esta manera, se seleccionaron dos transformantes de *A. thaliana* sobreexpresantes de *PpCOR413*, denominados COR-GFP 22 y COR-GFP 10.

Las líneas transgénicas de *A. thaliana* COR-GFP 22 y COR-GFP 10 como plantas wt fueron cultivadas en medio ½AR y colocadas bajo siete diferentes tratamientos de estrés de forma independiente (10 mM de paraquat, temperatura baja de 4 a 6 °C, 300 mM de Manitol, 18 % de Polietilenglicol PEG 6000, 30 % de PEG 6000, 150 mM NaCl y 5 mM Ácido Salicílico), junto con su control respectivo, con tres repeticiones por tratamiento.

Después de 10 días en los respectivos tratamientos de estrés, se evaluó el peso fresco de las plantas de *A. thaliana* desarrolladas *in vitro* con los tratamientos de estrés designados, observándose la presencia de diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ) al aplicar ácido salicílico 5 mM y diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con el tratamiento del 18% de Polietilenglicol (PEG) como se muestra en la tabla 1 (ver detalles en el anexo 7). Para ambos tratamientos (5 mM de ácido salicílico y 18% de PEG) las vitroplantas wt, presentaron mayor peso fresco (116,67 y 72,33 mg respectivamente) como respuesta al estrés en relación a las transgénicas sobreexpresantes de *PpCOR413* (COR-GFP 22 (98,33 y 71,00 mg respectivamente) y COR-GFP 10 (93,33 y 65,67 mg respectivamente)). Sin embargo, no se observó diferencias significativas entre los transgénicos (COR-GFP 22 y COR-GFP 10) y wt, para los tratamientos con manitol, paraquat, PEG 30%, NaCl y el control (tabla 2, detalles en el anexo 8). Actualmente estos ensayos en relación a tratamientos de estrés testados están siendo evaluados en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal en Uruguay, a través de la medición del largo de raíz, el peso seco y otras variables.

**Tabla 1. Análisis de varianza de peso fresco del desarrollo de vitroplantas de *Arabidopsis thaliana* en tratamientos con Ácido Salicílico 5 mM y PEG 18%.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>Ác. Salicílico 5 mM</b>	2	905.556	452.778	150.926	0.0000 **
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>PEG 18%</b>	2	514.889	257.333	10.480	0.0110 *

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Tabla 2. Análisis de varianza de peso fresco para tratamientos con manitol 0.5 M, paraquat 100 µM, PEG al 30 %, NaCl 15 mM y Control.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>Manitol 0.5 M</b>	2	642.667	321.333	1.225	0.3579 ns
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>paraquat 100 µM</b>	2	240.889	120.444	1.404	0.3161 ns
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>PEG al 30 %</b>	2	96.889	48.444	0.960	ns
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>NaCl 15 mM</b>	2	48.889	23.444	1.426	0.3115 ns
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10) - <b>Control</b>	2	42.889	21.444	0.235	ns

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

Posteriormente, se realizó una variación del tratamiento de condiciones de frío, desarrollando plantas en condiciones *in vitro* de *A. thaliana* wt, y sobreexpresantes de *PpCOR413-GFP* (COR-GFP 22 y COR-GFP 10) a partir de semillas durante 1 semana en condiciones de cultivo normales y sometidas estas a estrés consistente en 4 °C por 48 horas. Finalizado el tratamiento de estrés las vitroplantas fueron retornadas a condiciones de cultivo normales por 5 días, para proceder a la evaluación final.

Los resultados de este ultimo estudio, mostraron que antes del tratamiento térmico (1 semana del sembrado de las semillas) tanto en el análisis de varianza de peso fresco como de largo de raíz (realizados con 9 y 20 repeticiones respectivamente) que se encuentran a detalle en el anexo 9, se observó la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el wt y los sobreexpresantes de *PpCOR413*. En este sentido, se realizó la prueba de Duncan con  $\alpha=0.05$ , para ver las diferencias que se presentan, como se puede observar en las figuras 12a y 12b respectivamente.

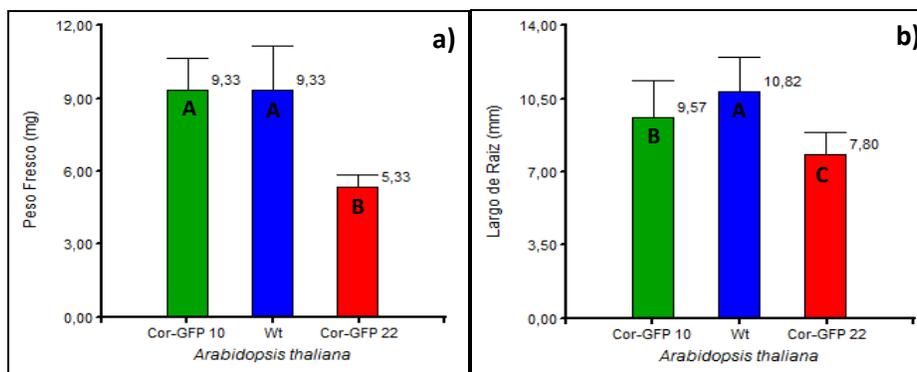


Fig. 12. Prueba de rangos de Duncan graficada con nivel de significancia  $\alpha=0,05$  donde letras distintas indican diferencias estadísticas para a) el peso fresco y b) el largo de raíz en mm de vitroplantas de *A. thaliana* después de 1 semana de germinadas y previo a su ingreso a tratamiento de frío (4 °C por 2 días).

Como se puede observar en las figuras 12a y 12b, el transgénico COR-GFP 22 presenta crecimiento y desarrollo reducido en relación a wt y a COR-GFP 10 para ambos parámetros de evaluación (peso fresco y largo de raíz), siendo wt el que mejor desarrollo presenta distinguiéndose principalmente en lo que corresponde al largo de sus raíces.

Se realizó una evaluación del largo de raíz (con 20 repeticiones por línea) inmediatamente después de haber pasado por el tratamiento de frío (2 días a 4 °C), tanto para el grupo que recibió el tratamiento como para el grupo control. Los análisis de varianza respectivos (anexo 10) mostraron la presencia de diferencias estadísticas, por ello se evaluaron estas diferencias a través del análisis de Duncan con  $\alpha=0.05$ , como se puede observar en la figura 13a y 13b.

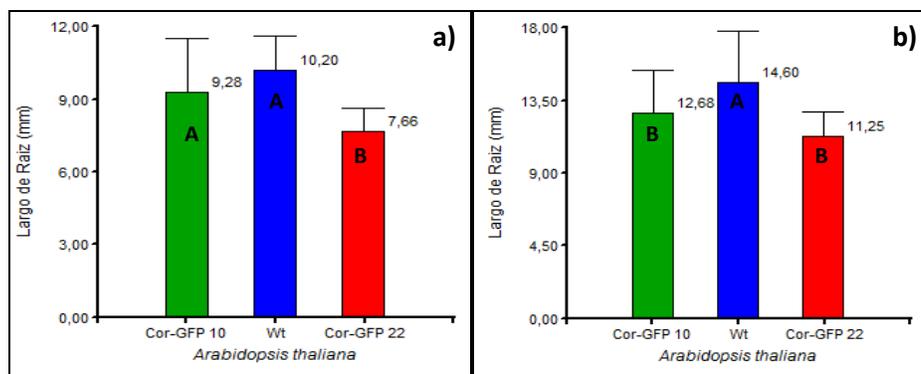


Fig. 13. Prueba de rangos de Duncan graficada con nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , donde letras diferentes representan diferencias estadísticas, a) para el largo de raíz en mm de vitroplantas de *A. thaliana* después de 1 semana de germinadas y 2 días de tratamiento de frío (4 °C), b) para el largo de raíz en mm de vitroplantas de *A. thaliana* después de 1 semana y 2 días de germinadas (Control).

En la figura 13a se puede observar que las vitroplantas de la línea COR-GFP 10 fueron las menos afectadas por el tratamiento de frío, mostrando una recuperación más rápida ya que para este momento su largo de raíz se igualó al de las wt, ya que en la primera evaluación (1ra semana), anterior al tratamiento de frío, las vitroplantas de ambos transgénicos (COR-GFP 10 y COR-GFP 22) presentaban menor largo de raíz que wt. Este comportamiento se evidencia de mejor manera, al comparar la evaluación del largo de raíz del control de la figura 13b (transgénicos y wt en condiciones de cultivo normales) en la que no se identifica ninguna variación en relación al anterior análisis (después de 1 semana de crecimiento) de la figura 12a, mostrando nuevamente que el wt es el que presenta mejor crecimiento de sus raíces en relación a los dos sobreexpresantes de *PpCOR413* bajo condiciones de frío.

Finalmente se realizó una evaluación después de 2 semanas de haber sido sembradas las plantas de *A. thaliana* en condiciones *in vitro*, es decir 5 días después de recibir el tratamiento de frío (2 días a

4 °C), tomando como parámetros de evaluación el peso fresco y largo de raíz de las vitroplantas de *A. thaliana* tanto para el grupo con tratamiento como para el grupo control (con 12 y 20 repeticiones por variable de evaluación respectivamente). Los análisis de varianza de ambas variables de evaluación mostraron la presencia de diferencias estadísticas entre el wt y los transgénicos sobreexpresantes de *PpCOR413* como se puede observar en el anexo 11. De esta manera, se realizaron las respectivas pruebas de Duncan con  $\alpha=0.05$ , para ver las diferencias que se presentan entre ellos, como se puede observar en la figura 14.

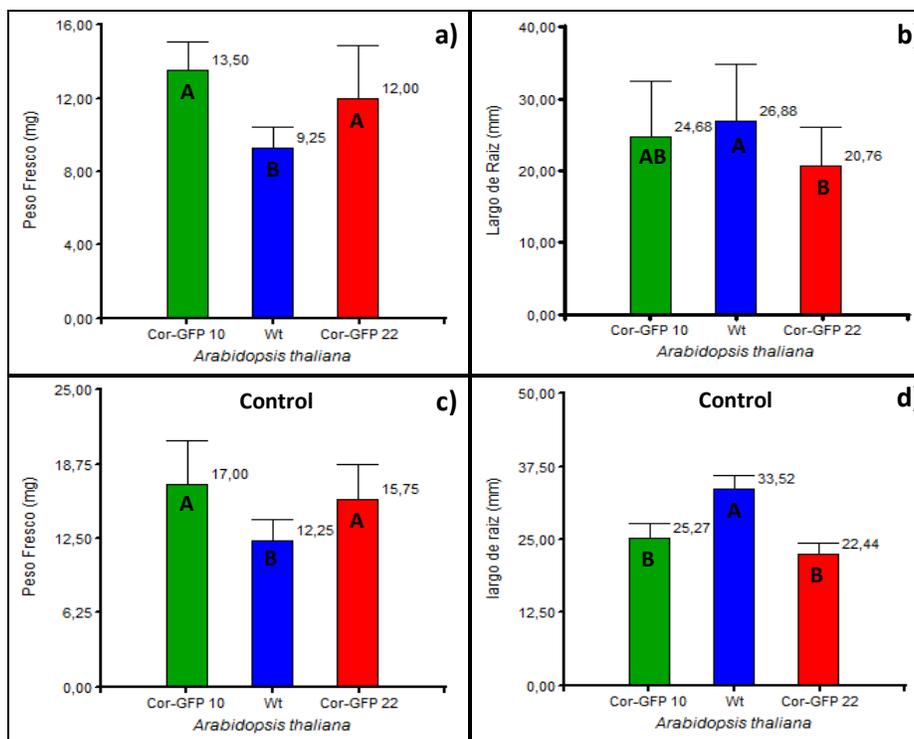


Fig. 14. Prueba de rangos de Duncan graficada con nivel de significancia  $\alpha=0,05$  donde letras distintas indican diferencias estadísticas para a) el peso fresco para líneas que recibieron tratamiento de frío, b) el largo de raíz para líneas que recibieron tratamiento de frío c) el peso fresco para líneas sin tratamiento (control) y d) el largo de raíz para líneas sin tratamiento (control), de vitroplantas de *A. thaliana*, después de 2 semanas de germinadas, es decir 5 días después del tratamiento de frío (4 °C por 2 días)

Como se puede observar en las figuras 14a y 14b las vitroplantas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *PpCOR413*, al parecer tuvieron un proceso de recuperación al tratamiento de frío superior al wt. Esto principalmente se puede observar en la relación del peso fresco, en el cual ambos transgénicos llegaron a superar al wt al presentar mayor peso fresco. Mientras que para la variable de largo de raíz, el wt solo muestra diferencias de crecimiento con el transgénico COR-GFP 22.

Lo más interesante de los resultados que se pueden observar en las figuras 14c y 14d es que las vitroplantas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *PpCOR413* y wt que no recibieron tratamiento de frío (control), ya para este momento, mostraron un comportamiento muy similar a las sometidas al tratamiento de frío en especial a la variable de respuesta de peso fresco, llegando ambos sobreexpresantes a presentar mayor peso fresco que wt (figuras 14a y 14c).

De acuerdo a estos resultados en general, a pesar de las diferencias estadísticas que se observan, se podría inferir que no se presenta una reacción diferencial del desarrollo del wt y los sobreexpresantes de *PpCOR413*, en relación al tratamiento de frío. Lo que sí, podría inferirse, es que inicialmente los sobreexpresantes muestran menor desarrollo para las variables evaluadas (peso fresco y tamaño de raíz) en comparación con el wt y con el tiempo, los sobreexpresantes de *PpCOR413* van mejorando su desarrollo, incluso superando al wt, independientemente del tratamiento de frío. Esta información del comportamiento de wt y los sobreexpresantes sin tratamientos de estrés (control), también podría explicar los primeros resultados de peso fresco, en los que se observa un aparente mejor comportamiento al estrés causado por 5 mM Ácido Salicílico y por PEG 18% del wt en relación a los sobreexpresantes, de los cuales COR-GFP 10 es el que mejor respuesta habría tenido especialmente para el tratamiento con PEG 18 ya que incluso en este tratamiento no mostró diferencias estadísticas en relación al wt (datos no mostrados). Estos resultados deberán en el futuro confirmarse con mayores evaluaciones.

Es importante destacar que en *A. thaliana* se identificaron dos genes altamente homólogos (COR413TM1 y COR413TM2) que codifican la proteína Cor413tm y que son fuertemente inducidos por bajas temperaturas (Breton *et al.* 2003; Maruyama *et al.* 2004). Así mismo, en relación a estos dos genes y la localización subcelular de sus productos Okawa *et al.* 2008, los renombraron como COR413IM1 y COR413IM2 por su presencia en la membrana interna del cloroplasto, sugiriendo que una copia simple del gen COR413IM es suficiente para conferir la tolerancia normal de *A. thaliana* a las heladas, al analizar esta tolerancia en mutantes con inserción de T-ADN en COR413IM. La retención en *Arabidopsis* de dos copias del gen COR413IM podría conferir una ventaja para la sobrevivencia bajo el estrés del congelamiento (helada).

#### **5.5. Determinación de la localización subcelular de la proteína de fusión PpCOR413-GFP por microscopia de fluorescencia.**

Para determinar la localización subcelular de la proteína PpCOR413, se generó una construcción para sobreexpresar la proteína de interés (bajo el control de promotor constitutivo CaMV 35S) fusionada a la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) 35s-PpCOR413-GFP. Seguidamente esta

construcción se utilizó para transformar *A. thaliana* y generar líneas estables. La segunda generación (T2) de los sobreexpresantes de PpCOR413: COR-GFP 10 y COR-GFP 22, al igual que el wt (*A. thaliana* accesión Columbia - creciendo sin antibiótico) se sembraron en condiciones *in vitro* con un antibiótico de selección (kanamicina), donde crecieron durante 5 días. A partir de estas plantas desarrolladas *in vitro* se extrajeron secciones de hojas y raíces, de tal manera de obtener imágenes con un microscopio de fluorescencia confocal, como se observa en la figura 15.

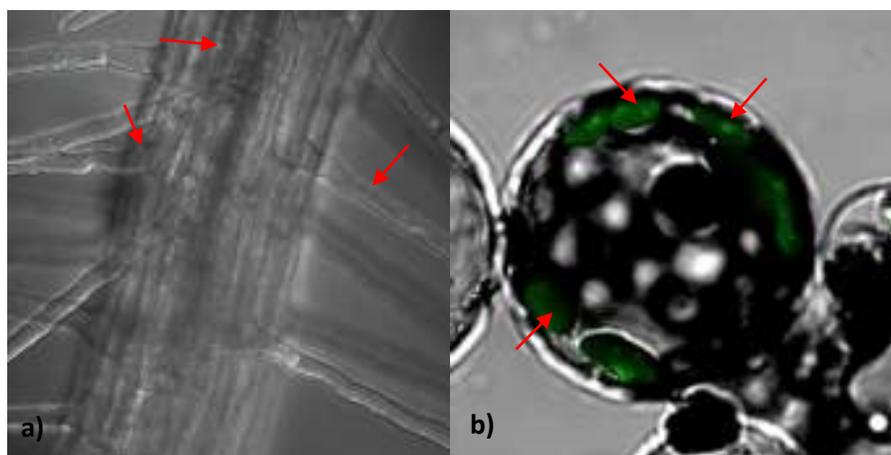


Fig. 15. Localización de PpCOR413-gren fluorescent protein (GFP) en *A. thaliana* transgénica. a) Corte de raíz con expresión de GFP. b) Protoplastos de tabaco transformados con la construcción PpCOR413-GFP (Fuente: Ruibal Croce 2015).

Como se puede observar en la figura 15a, en lo que respecta al tejido radicular, la señal de fluorescencia principalmente se detecta en los plástidos. En el trabajo de Chen *et al.* 2010, a través de un procedimiento similar, se observó la proteína BnCOR25 en el citoplasma y la periferia celular, sugiriendo que esta principalmente estaría localizada en la membrana plasmática y el citoplasma. Por otro lado, en el trabajo realizado a partir del mismo plásmido que generó estos transgénicos de *A. thaliana* (pGW5COR), por Ruibal Croce 2015, se confirmó que PpCOR413 se localiza en los cloroplastos cuando se transformaron protoplastos de tabaco (Figura 15 b). Esto concuerda con lo indicado por Okawa *et al.* 2008, quienes localizaron dos proteínas muy similares Cor413im1 y Cor413im2, como proteínas integrales de la membrana interna de los cloroplastos. En este sentido, varios estudios indican que las membranas celulares son el principal sitio de daño por congelación en plantas (Thomashow 1999). Por lo tanto, no es sorprendente que una función importante de la aclimatación al frío es la estabilización de las mismas (Sun *et al.* 2007). Estos daños en la membrana, al parecer son en gran parte debido a la deshidratación asociada con la congelación (Steponkus 1984; Levitt 1980; Thomashow 1999 citados por Sun *et al.* 2007 y Puebla and Del Viso 2004). Diversos factores de estrés abiótico tienen un impacto importante sobre los cloroplastos (Tuteja 2009). Se ha demostrado que las bajas temperaturas afectan el funcionamiento

de los diversos componentes del aparato fotosintético, como la fotoinhibición a nivel de fotosistema II (Aro *et al.* 1993; citado por Kawamura and Uemura 2014) y fotosistema I (Logan *et al.* 2003). Bajo esta condición de estrés, se ve afectada también la integridad de los orgánulos intracelulares, lo que lleva a la pérdida de la compartimentación y al deterioro de la fotosíntesis, por lo que la protección de estos organelos del daño generado por estrés, puede ser importante para conferir mayor tolerancia a estos factores (Tuteja 2009). Asimismo, estudios bioquímicos y genéticos sugieren que en particular, las proteínas de la envoltura del cloroplasto juegan un papel importante en la respuesta al estrés, en el caso de Cor413im estaría involucrada a la respuesta a bajas temperaturas. En este sentido, Xiong and Zhu 2001, indican que otros tipos de estrés ambiental como la sequía y la infección por patógenos, también pueden afectar a la aclimatación al frío y que habría una interacción entre las vías de transducción de señal que son responsables de varias respuestas al estrés. Finalmente, en relación al gen *PpCOR413*, estaría involucrado en la respuesta adaptativa a la luz, en particular al exceso de luz y posiblemente a la protección del aparato fotosintético durante el estrés por frío (Ruibal Croce 2015).

#### **5.6. Generación de construcciones génicas para la disrupción del gen *PpCOR413* en *Physcomitrella patens*.**

Para generar una construcción *knockout* del gen *PpCOR413* de *Physcomitrella patens*, se procedió inicialmente a clonar una región desde el extremo 5' con 802 pb que comprende una región anterior al inicio del gen hasta casi la mitad del mismo y otra región desde el extremo 3' de 771 pb hasta casi la mitad del gen (figura 16b). Ambas regiones flanquearán luego a un casete de resistencia a kanamicina (*nptII*). Como se observa en los carriles 2 y 3 de la figura 16a respectivamente, se generaron dos productos de PCR, el primero de 802 pb generado con los primers *s5kpcor* y *as5hindcor* y el segundo de 771 pb generado con los primers *s3bamcor* y *as3xbacor*.

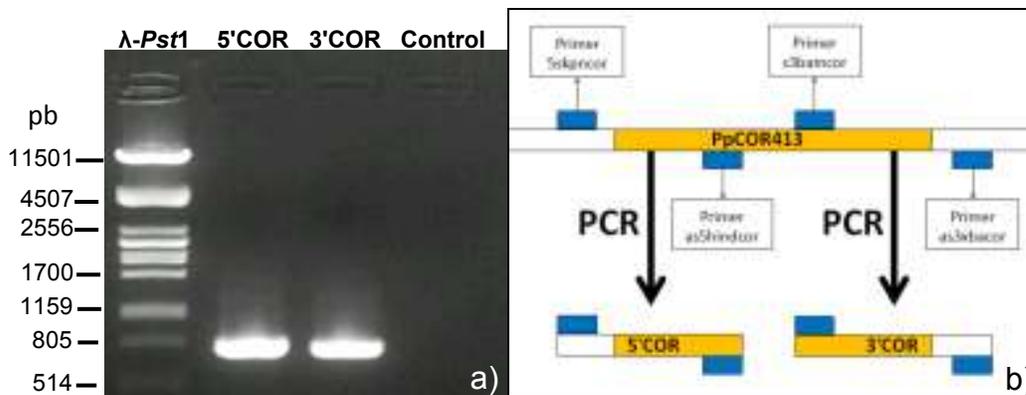


Fig. 16 a) Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % de productos de amplificación por PCR para la generación de segmentos génicos para la disrupción del gen *PpCOR413*. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst1*, carril 2 producto de 802 pb (5'COR), carril 3 producto de 771 pb (3'COR) y carril 4 control negativo. b) Esquema del proceso de clonación por PCR de las regiones del gen *PpCOR413* (5'COR y 3'COR) para el proceso de disrupción del mismo.

A partir de cada producto de PCR, se realizó la clonación en *E. coli*, utilizando el kit TACloning®, con el que se generaron colonias transformantes y se escogió de ellas un aislado de 3'COR (3'COR-2) y 3 aislados de 5'COR (5'COR-1; 5'COR-2 y 5'COR-3), los mismos que fueron digeridos, para analizar la presencia del producto de PCR, con la enzima de restricción *EcoRI* seguido de la visualización en gel de agarosa como se observa en los carriles 2 al 5 de la figura 17 respectivamente, donde se aprecia que todas las muestras presentaron el respectivo inserto, obteniéndose 2 bandas para cada uno de los productos. Así, se observó en las colonias transformantes la primera banda de 3.914 pb que corresponde al plásmido PCR<sup>TM</sup>2.1 digerido por *EcoRI* y una segunda banda (786 pb) para la colonia 3'-2 y 817 pb para las colonias 5'-1, 5'-2 y 5'-3.

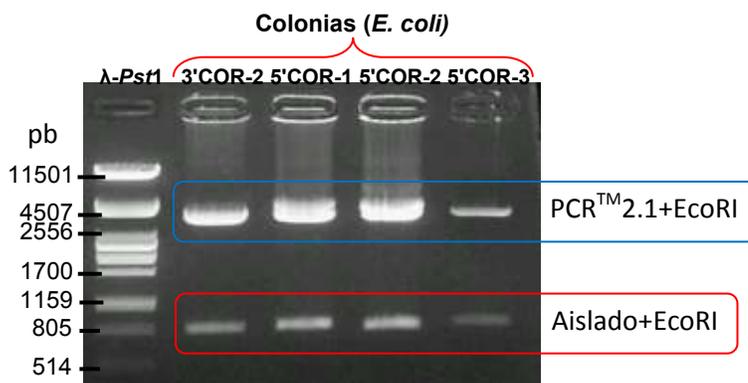


Fig. 17. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 %, de ADN del plásmido PCR<sup>TM</sup>2.1 con fragmentos de *PpCOR413* extraído de las colonias de *E. coli* 3'COR-2, 5'COR-1, 5'COR-2 y 5'-COR3 y digeridos con *EcoRI*. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst1*, carril 2 producto de digestión (3'COR-2 / *EcoRI*) y carriles 3 al 5 producto de digestión (5'COR-1,2,3 / *EcoRI*) respectivamente.

Seguidamente, se realizó la digestión con las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I, del ADN plasmídico de la colonia aislada 5'COR-1 que contiene el plásmido PCR<sup>TM</sup>2.1, con el fragmento 5' de *PpCOR413* insertado. Así, en el carril 2 de la figura 18a se observa el producto de la digestión donde la colonia 5'COR-1 mostró 2 bandas; la primera de 3.929 pb que corresponde al plásmido PCR<sup>TM</sup>2.1 cortado por *Hind*III y *Kpn*I y la segunda de 794 pb correspondiente al fragmento 5'-1 (región de interrupción 5' *PpCOR413*). Se continuó con el proceso y se aisló el fragmento de ADN del gel de agarosa que contiene el extremo 5'COR-1 que fue sujeto nuevamente a electroforesis gel de agarosa. Asimismo, se corrió en este gel al ADN del vector pUBW302 a ser utilizado en la construcción de interrupción, también digerido por *Hind*III y *Kpn*I. Como se observa en el carril 2 de la figura 18b, se comprobó la presencia de ADN del vector pUBW302 digerido por *Hind*III y *Kpn*I presentando una banda de 4.860 pb y en el carril 3 el aislamiento de 5'COR-1 digerido por *Hind*III y *Kpn*I mostrando una banda de 794 pb.

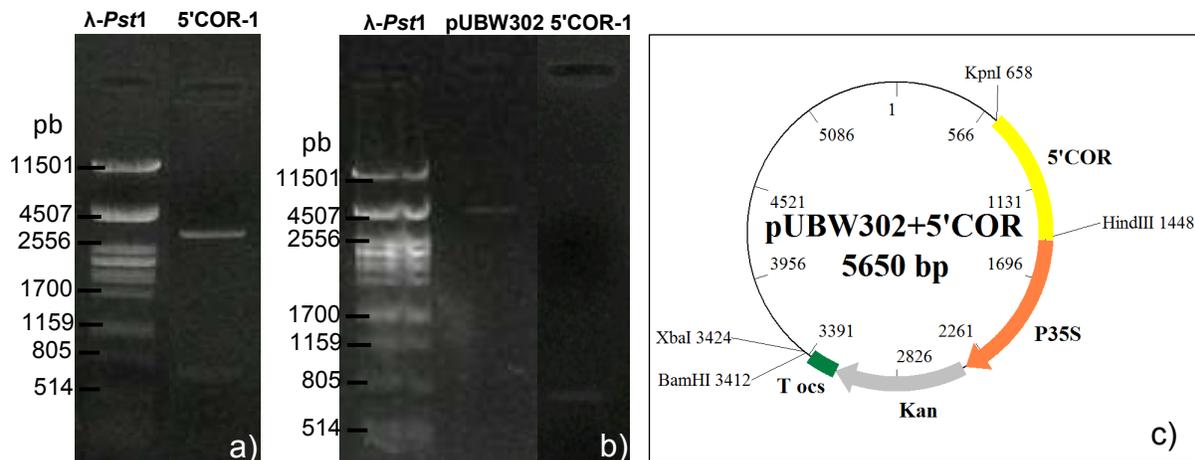


Fig. 18. Corridos electroforéticos en geles de agarosa al 1% de colonia aislada 5'COR-1 y del vector pUBW302 para la generación de la construcción *knockout* digeridos con *Hind*III y *Kpn*I. a) Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst*I y carril 2 producto digestión (5'COR-1 / *Hind*III / *Kpn*I de 794 pb). b) Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst*I, carril 2 producto digestión de 4.860 pb aislado de gel (pUBW302 / *Hind*III / *Kpn*I), carril 3 producto digestión de 794 pb aislado de gel (5'COR-1 / *Hind*III / *Kpn*I). c) representación gráfica del vector obtenido por la ligación de 5'COR-1 con el vector pUBW302.

Una vez realizada la reacción de ligación de 5'COR-1 con el vector pUBW302 (Fig. 18c), se procedió a concluir la construcción del plásmido *knockout*, utilizando el aislado 3'COR-2 y pUBW302+5'COR-1, realizando un proceso de doble digestión en ambos con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. Seguidamente el producto obtenido de la digestión (Colonia 1 de pUBW302+5'COR / *Bam*HI / *Xba*I) se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se lo extrajo del gel. Mientras que, el

producto de la digestión de 3'COR-2 se precipitó con acetato de sodio. Seguidamente se corrieron ambos fragmentos de ADN como se observa en los carriles 2 y 3 de la figura 19.

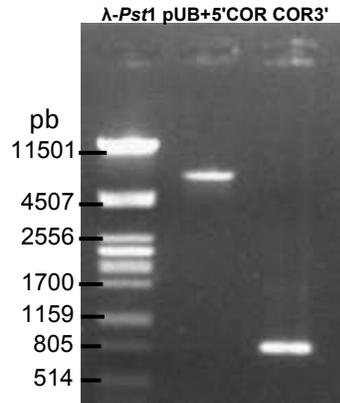


Fig. 19. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% del plásmido ligado con 5'COR e inserto 3'COR digeridos con *Bam*HI y *Xba*I (Colonia 1 de pUBW302+5'COR / *Bam*HI / *Xba*I) y 1  $\mu$ l de ADN del (Cor 3'-2) para su cuantificación. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst*I, carril 2 producto digestión de 5.634 pb aislado de gel (pUBW302+5'COR / *Bam*HI / *Xba*I) y carril 3 producto digestión de 764 pb (3'COR / *Bam*HI / *Xba*I).

Una vez realizada la ligación de pUBW302+5'COR con 3'COR-2, se continuó con la transformación de células de *E. coli*, mediante electroporación. Se aislaron una serie de colonias resistentes al medio selectivo (ampicilina), a partir de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico (miniprep). Seguidamente se digirió el mismo con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, para comprobar la transformación en los plásmidos con la correspondiente construcción completa 3'COR + pUBW302 + 5'COR a través de electroforesis en agarosa. Como se observa en la figura 20, el ADN plasmídico de las colonias 2, 3, 5, 8, 9 y 10 presentaron dos bandas de peso molecular 5.634 pb y 764 pb. Posteriormente, se realizó la digestión con *Cla*I en todos ellos, para verificar que se insertó las secuencias deseadas.

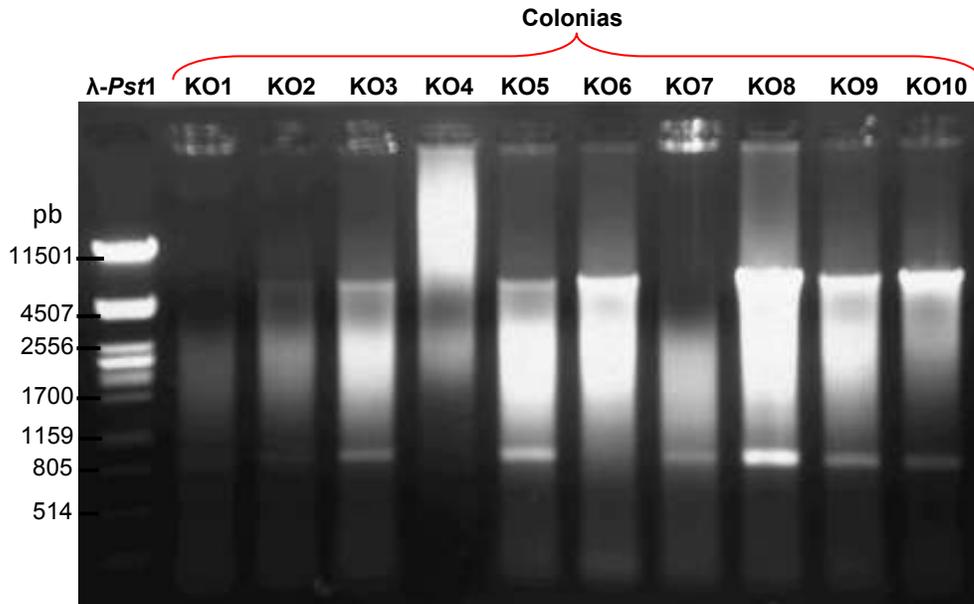


Fig. 20. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,9 %, de colonias aisladas con el plásmido pUBW302+5'COR-1+3'COR-2 para la generación de la construcción *knockout* digeridos con *Bam*HI y *Xba*I. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst*1, carril 2 al 11 productos digestión que deberían mostrar dos bandas de 5.634 pb y 764 pb.

Como se observa en la figura 21a, se generaron dos bandas en las colonias 3, 5, 8, 9 y 10, que corresponderían a un corte realizado, a través de la digestión con *Cla*I, en la región insertada 5'COR del plásmido a 909 nucleótidos del origen del plásmido y un segundo corte a 3.783 nucleótidos, generando bandas de 2.874 pb y 3.524 pb, ya que el nuevo plásmido sería de 6.398 nucleótidos (Fig. 21b).

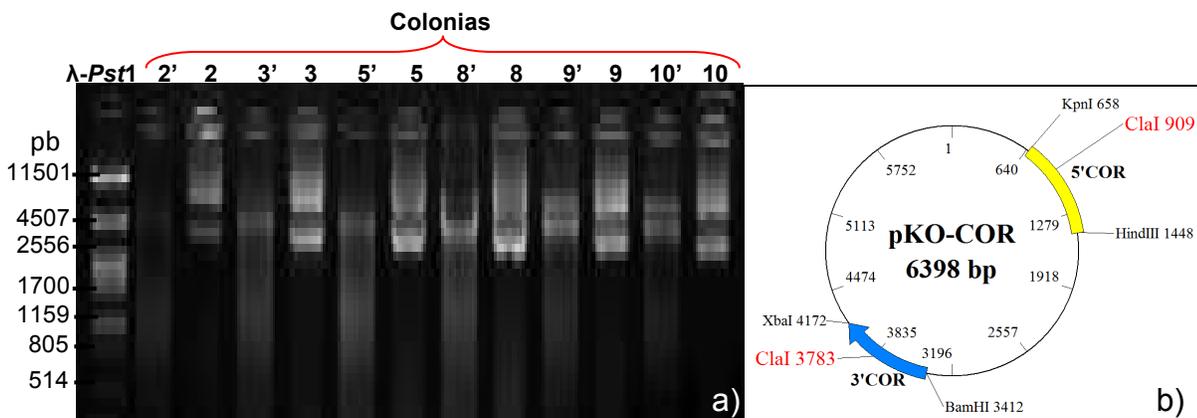


Fig. 21. a) Corrida electroforética en gel de agarosa al 0,9 %, de colonias aisladas pUBW302+5'COR-1+3'COR-2 para la generación de la construcción *knockout* sin digerir y digeridos con *Cla*I, donde n' = Colonia n digerida con *Cla*I. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst*1, carril 2 al 13 productos digestión que deberían mostrar dos bandas de 3.524 pb y 2.874 pb. b) representación grafica del vector obtenido por la ligación del fragmento 5'COR-1 con el vector pUBW302 y el fragmento 3'COR-2.

Luego para verificar que se insertaron las secuencias deseadas, en especial en la región de interrupción de *PpCOR413* de 771 pb denominada 3'COR, se realizó un PCR de esta región usando los primers s3bamcor y as3xbacor, seguido de electroforesis en gel de agarosa como se observa en los carriles 2, 3 y 4 de la figura 22, donde el inserto 3'COR de 771 pb está presente en las colonias 3 y 8, por lo tanto al plásmido obtenido de este proceso de construcción de una secuencia de interrupción se lo denominó pKO-COR.

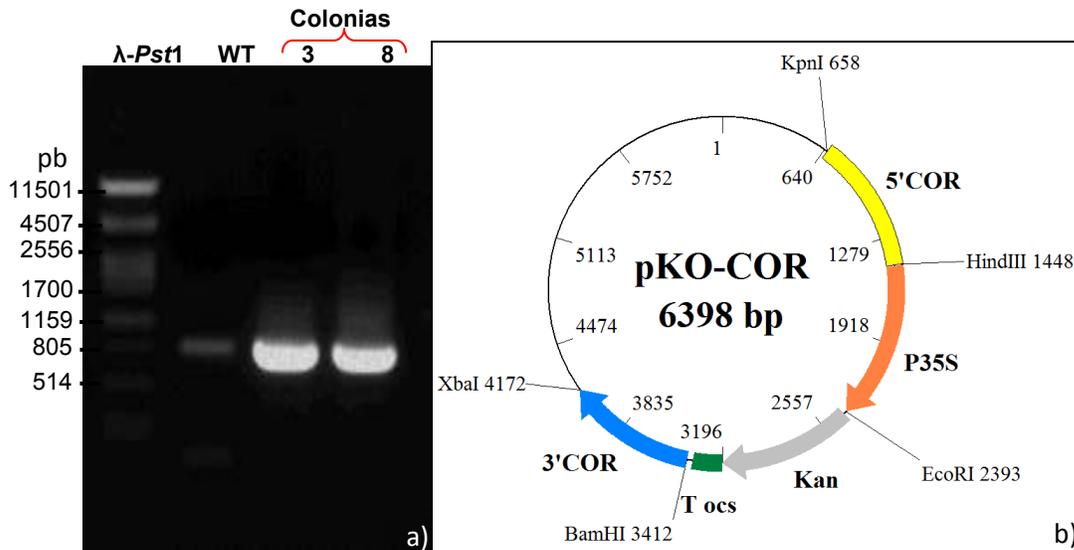


Fig. 22. a) Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % de productos de PCR para la identificación de la secuencia 3'COR, en plásmido de *E. coli*, colonias 3 y 8 con la construcción pUBW302+5'COR-1+3'COR-2 donde el carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -Pst1, carril 2 control positivo producto de PCR de ADN de wt de *Physcomitrella patens* de 771 pb, carril 3 producto de PCR de 771 pb de ADN plasmídico de la Colonia 3 de *E. coli* que contiene el plásmido pKO-COR y carril 4 producto de PCR de 771 pb de ADN plasmídico de la Colonia 8 de *E. coli* que contiene el plásmido pKO-COR. b) Representación gráfica de plásmido de interrupción de *PpCOR413* construido y denominado pKO-COR de 6398 pb.

### 5.7. Transformación de protoplastos en *Physcomitrella patens*.

Se procedió a transformar protoplastos de *Physcomitrella patens* con la construcción para reemplazo alélico generada previamente. Para iniciar este proceso, se aisló ADN plasmídico de pKO-COR digiriéndolo con la enzima *XbaI*, generando un producto lineal de 6.398 pb como se observa en el carril 4 de la figura 23.

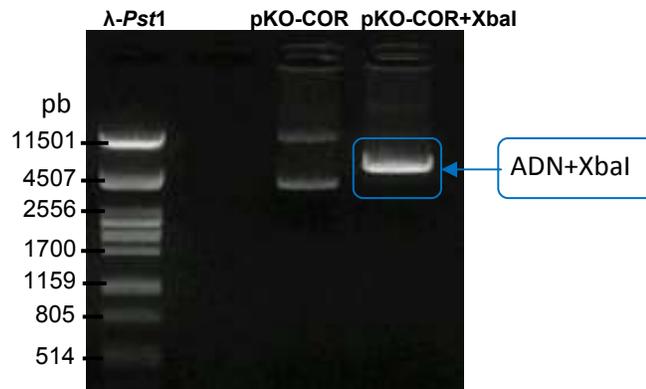


Fig. 23. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % del vector pKO-COR sin digerir y digerido con *XbaI*. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*PstI*, carril 3 ADN de pKO-COR sin digerir y carril 4 producto digestión de 6.398 pb (pKO-COR / *XbaI*)

Posterior a la digestión del ADN de pKO-COR con *XbaI*, se aisló la banda de ADN del gel de agarosa, seguido de una nueva electroforesis en gel de agarosa. Con este ADN plasmídico se realizaron diluciones (1:1; 1:5; 1:10; 1:20) para cuantificar como se muestra en los carriles 3 al 6 de la figura 24 respectivamente.

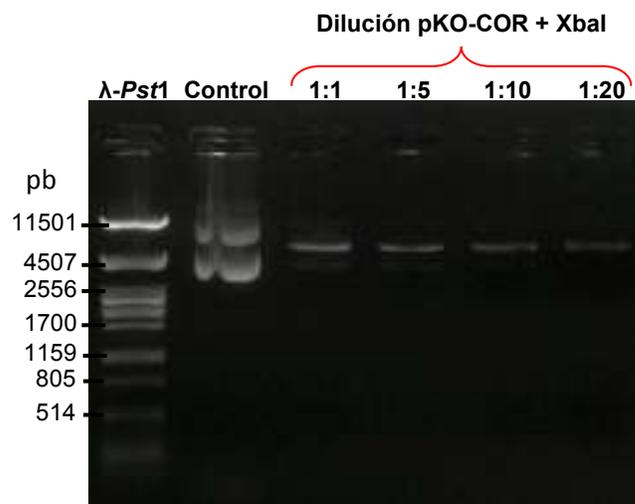


Fig. 24. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de pKO-COR digerida con *XbaI* en diferentes concentraciones y como control pKO-COR sin digerir. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*PstI*, carril 2 ADN de pKO-COR sin digerir y carriles 3-6 producto digestión de pKO-COR / *XbaI* en diferentes diluciones.

En la figura 24, se observa una segunda banda en las diluciones del plásmido linealizado con *XbaI*, que podría corresponder a un producto que no llegó a digerirse. El ADN plasmídico se secuenció en el Instituto Pasteur de Montevideo (las secuencias obtenidas se pueden observar en el anexo 12), las secuencias de 3' y 5' *PpCOR413* se las comparó inicialmente con el genoma de *Physcomitrella patens* a través de análisis en blastn en la página web Phycobase (<http://moss.nibb.ac.jp/blast/>) (figura 25). De manera similar se realizó la comparación de estas secuencias con la base de datos

genómicos de la colección de nucleótidos nt/nr de la página web de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (figura 26) y finalmente con la secuencia de *PpCOR413* con el programa Bioedit (figura 27). Así, se comprobó la presencia de las secuencias de disrupción.

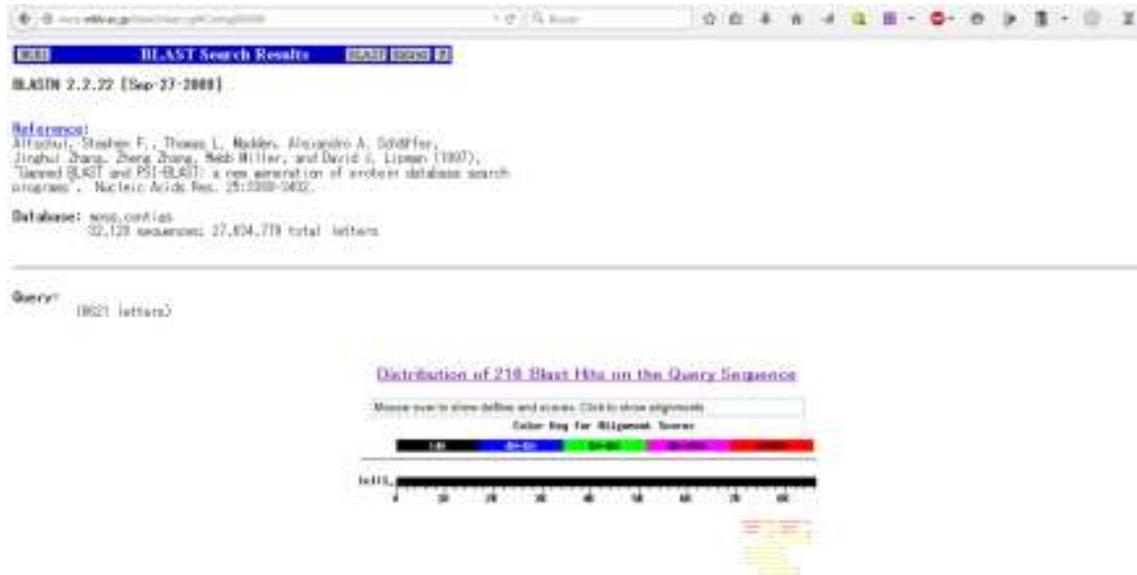


Fig. 25. Comparación de secuencia del plásmido pKO-COR con datos genómicos de *P. patens* en la página web del genoma de *Physcomitrella patens* PHYSCOBASE. (<http://moss.nibb.ac.jp/blast/>) mediante análisis en blastn. Se observó un 96% de identidad para la región de disrupción 3'COR.



Fig. 26. Comparación de secuencia del plásmido pKO-COR con datos genómicos de la colección de nucleótidos nt/nr en la página web NCBI. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mediante análisis en blastn. Se observó un 96% de identidad de 736 nucleótidos para la región de disrupción 5'COR justamente con *Physcomitrella patens*.

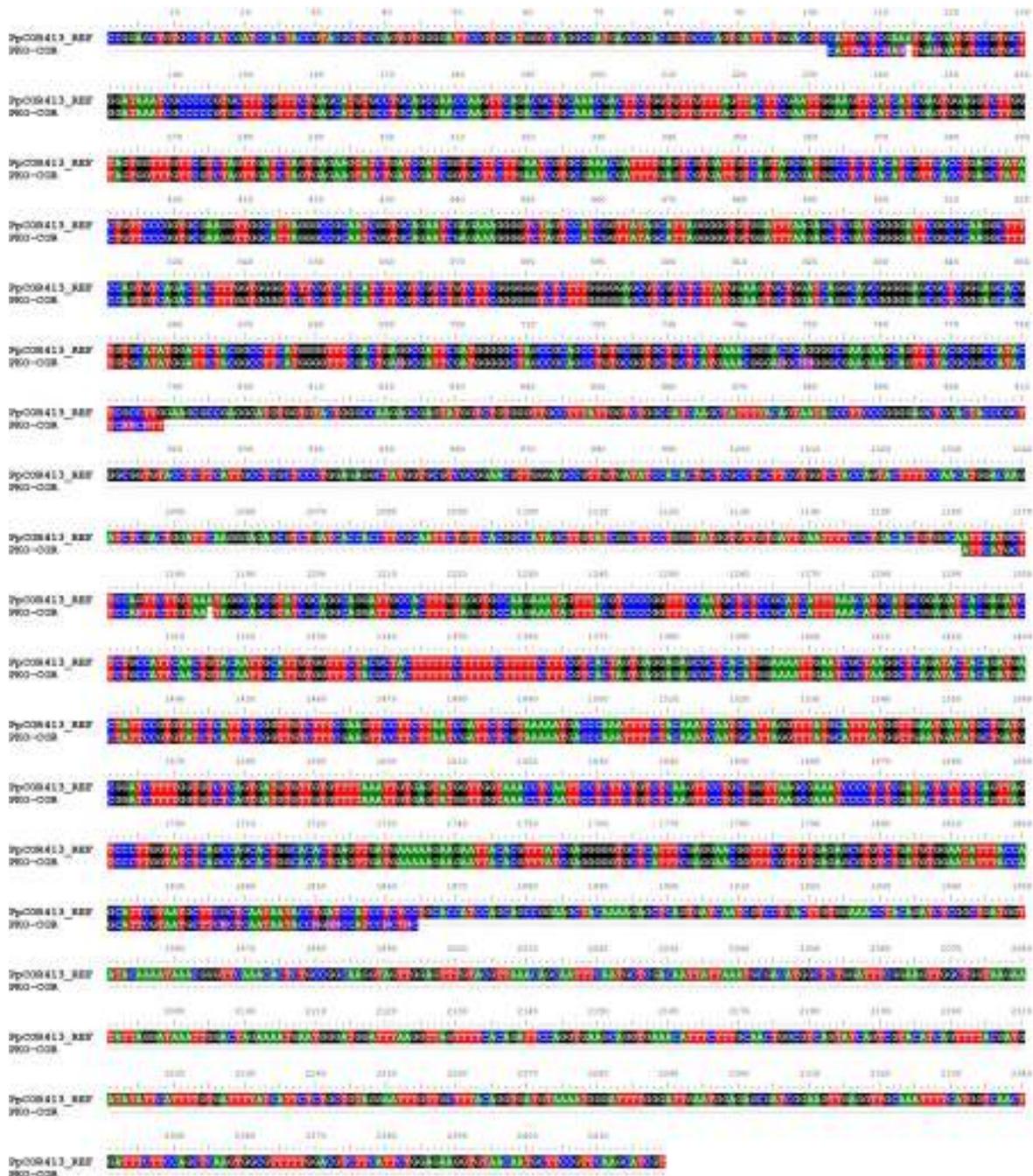


Fig. 27. Comparación de las secuencias 3'COR y 5'COR del plásmido pKO-COR contra la secuencia de *PpCOR413* utilizando el programa BioEdit, a través del algoritmo del alineamiento múltiple de ClustalW que muestra de acuerdo a los colores alta identidad

Una vez verificado por secuenciación la presencia de la región de disrupción de *PpCOR413* en el plásmido pKO-COR, se inició con el aislamiento y transformación de protoplastos de *Physcomitrella*, utilizando el ADN del plásmido *knockout* linealizado con *XbaI* y llevando estos

protoplastos de *P. patens* transformados en caja Petri con medio de cultivo Hoagland's a sala de crecimiento, donde se realizó la selección en medios con kanamicina (g418). De esta manera, a través del repique en medios con antibiótico y sin antibiótico (Ver figura 28) se seleccionaron 16 líneas (denominadas numeralmente del 1 al 16) de *Physcomitrella patens* potencialmente *knockout* para *PpCOR413* a partir de 40 que se desarrollaron inicialmente.

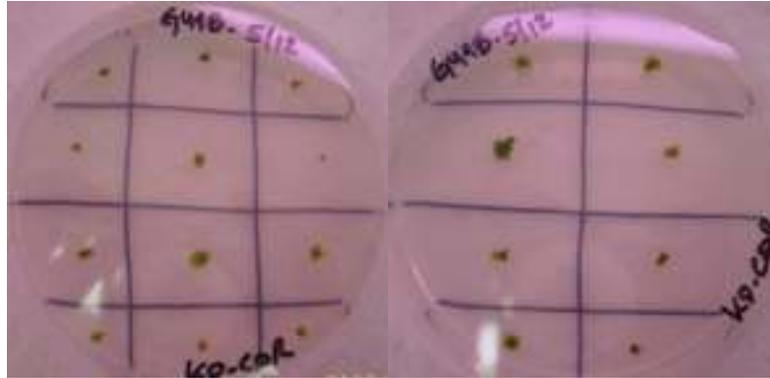


Fig. 28. Selección de posibles líneas *knockout* para *PpCOR413* de *Physcomitrella patens* a través de medios de selección con y sin antibiótico (kanamicina).

### 5.8. Caracterización molecular de transformantes.

Se extrajo ADN de las 16 líneas resistentes a kanamicina (g418), potencialmente *knockout* para *PpCOR413*, para realizar un proceso de selección por medio de la identificación de las regiones de disrupción 5'Cor-35S y 3'Cor-nptII a través de PCR, mediante los primers s5kpncor y as5hindcor; y s3bamcor y as3xbacor respectivamente. Así, se pudieron seleccionar dos líneas (Líneas 1 y 5), como se puede observar en la figura 29.

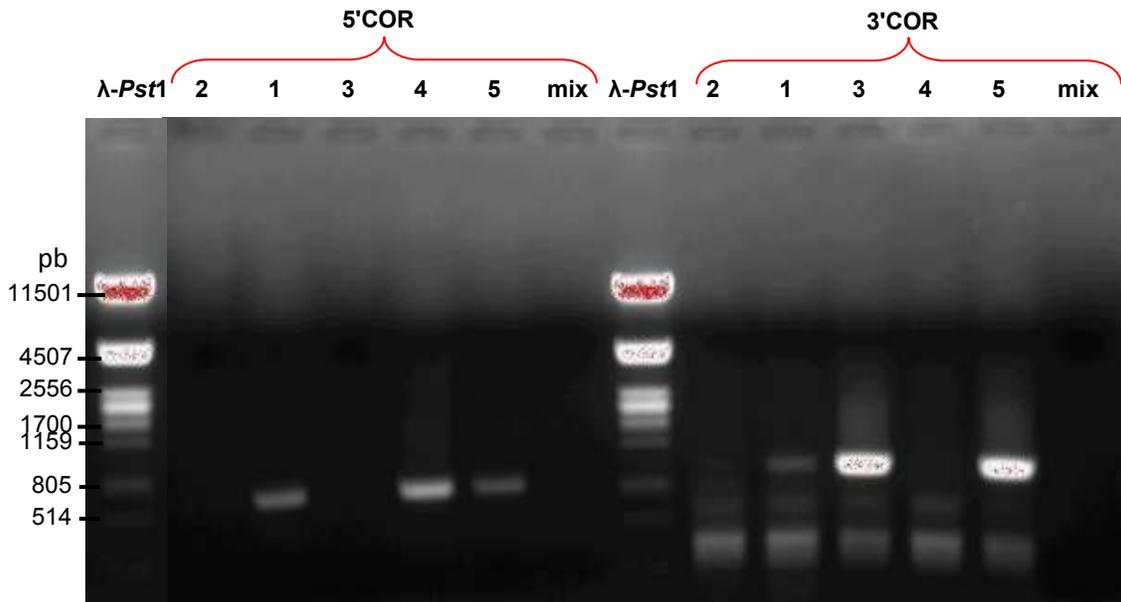


Fig. 29. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, de productos de PCR de las líneas 1 a 5 de *Physcomitrella patens* provenientes de transformación con KO-COR para obtener mutantes *knockout* para *PpCOR413*. Carriles 1-5 productos de PCR de líneas 1-5 para la región 5'Cor-35S de 802 pb, carril 6 control negativo de PCR, carril 7 marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst*I, carriles 8-12 productos de PCR de líneas 1-5 para la región 3'Cor-nptII de 771 pb y carril 13 control negativo de PCR.

En esta figura se puede observar la presencia del fragmento conteniendo la región 5'Cor-35S en los clones de *Physcomitrella* denominados 1, 4 y 5. Por otro lado, también se puede observar la presencia de la región 3'Cor-nptII en las líneas denominadas 1, 3 y 5. Esto confirmó a las líneas 5 y 1 como candidatos.

Para comprobar que estas líneas son las correctas se procedió a realizar un PCR del gen *PpCOR413* completo, desde 5' *PpCOR413* hasta 3' *PpCOR413* (es decir con los primers s5kpncor y as3xbacor). Los resultados se observaron a través de una corrida electroforética en gel de agarosa (carriles 2 al 5 de la figura 30).

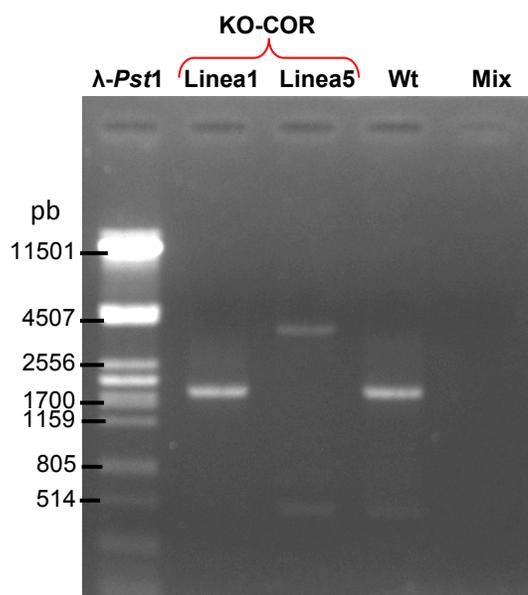


Fig. 30. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 %, de productos de PCR de las líneas 1 y 5 de *Physcomitrella patens* provenientes de la transformación para *knockout* de *PpCOR413*, expresando la región 5'-3' COR y sus controles negativo (Mix) y positivo (*Physcomitrella patens* wild type). Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Pst1*, carril 2 producto de PCR de la línea 1 de *P. patens* para la región 5'-3 COR de 3.519 pb, carril 3 producto de PCR de la línea 5 de *P. patens* para la región 5'-3 COR de 3.519 pb, carril 4 producto de PCR del wild type de *P. patens* para la región 5'-3 COR de 1.830 pb y carril 5 control negativo de PCR

En esta figura, se observa que las líneas KO-COR 1, KO-COR 5 y wild type (carriles 2, 3 y 4 respectivamente) de *P. patens*, generaron el producto de PCR de 5' *PpCOR413* hasta 3' *PpCOR413* (región *PpCOR413*), mostrando una clara diferencia entre la banda de KO-COR 5 y las otras dos, esto debido a que esta banda correspondería a la región *PpCOR413*, con la disrupción que correspondía a la adición de la región del casete de selección (35S+nptII+ocs), por lo que esta banda es de 3.519 pb. Mientras KO-COR 1 y wild type estarían a su vez mostrando el producto de *PpCOR413* sin la adición de la región de disrupción, generando ambos un producto de 1.830 pb. De esta manera, se comprobó finalmente que KO-COR 5 es un transformante *knockout* para *PpCOR413* de *Physcomitrella patens*.

### 5.9. Análisis fenotípico de mutante *knockout* (línea 5 ó KO-COR 5).

La caracterización fenotípica, donde el mutante *knockout* KO-COR 5 fue comparado con el wild type se realizó a través de la medición, después de 3 semanas de crecimiento, de las variables peso fresco y seco, colocando ambos (KO-COR 5 y wt) en cajas Petri divididas en dos partes bajo condiciones normales de cultivo. No se identificaron efectos negativos en el crecimiento (peso

fresco y peso seco) cuando ambos fueron cultivados en medio Hoagland's estándar y se compararon entre ellos, como se puede observar por los análisis de varianza que se encuentran en las tablas 3 y 4. De esta manera, se puede afirmar que la falta de expresión de *PpCOR413* no afecta al crecimiento bajo condiciones de cultivo estándar de laboratorio.

**Tabla 3. Análisis de varianza de peso fresco del desarrollo de clones de *Physcomitrella patens* cultivados en condiciones estándar de medio Hoagland's (Arnon and Hoagland 1950) como control (sin tratamiento de estrés).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt y KO)	1	3.610	3.610	0.096	ns
Dentro los grupos	14	529.048	37.789		
Total	15	532.657			
C.V.=31.11%					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0.05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0.01$ , ns = no significativo.

**Tabla 4. Análisis de varianza de peso seco del desarrollo de clones de *Physcomitrella patens* cultivados en condiciones estándar de medio Hoagland's como control (sin tratamiento de estrés).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt y KO)	1	0.551	0.551	2.286	0.1347 ns
Dentro los grupos	6	1.108	0.185		
Total	7	1.659			
C.V.=31.11%					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0.05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0.01$ , ns = no significativo.

A partir de estos resultados que comprueban que la disrupción del gen *PpCOR413* en *P. patens*, no afecta al desarrollo y crecimiento de esta planta en condiciones normales de cultivo, en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de Uruguay se están realizando diferentes tratamientos de estrés oxidativo (Paraquat), osmótico (Manitol), bajas temperaturas, entre otros. .

## 6. Conclusiones

- Se generó la construcción pGW5COR para la sobreexpresión del gen *PpCOR413* fusionado a GFP, cuya expresión se regula por el promotor constitutivo CaMV 35S.
- Se obtuvieron dos líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, COR-GFP 10 y COR-GFP 22, que sobreexpresan la proteína de fusión COR413-GFP de *Physcomitrella patens*.
- El análisis fenotípico de las líneas COR-GFP 10 y COR-GFP 22 respecto al wt no presentó diferencias, en relación al tratamiento de frío. Asimismo, se observó que durante la primera semana de cultivo los sobreexpresantes presentaron menor desarrollo en comparación con el wt. Con el tiempo, los sobreexpresantes de *PpCOR413* mejoraron su desarrollo, alcanzando e incluso superando al desarrollo del wt. También se observó mayor crecimiento en respuesta al tratamiento con ácido salicílico 5 mM y con PEG 18% del wt en relación a los sobreexpresantes. Futuros estudios deberán confirmar estos resultados con mayor número de ensayos.
- Se localizó la proteína COR413 a través de la observación de la proteína fluorescente verde (GFP) de fusión, por medio de un microscopio de fluorescencia confocal, en los plástidos del tejido radicular y del mesófilo.
- Se generó el plásmido pKO-COR que cuenta con la construcción génica para la disrupción del gen *PpCOR413* (*knockout*) con el marcador de resistencia a kanamicina (nptII).
- Se transformaron protoplastos de *Physcomitrella patens*, con el vector pKO-COR linealizado, aprovechando su característica de presentar alta probabilidad de recombinación homóloga. Este ensayo dio lugar a 16 mutantes potencialmente *knockout* a partir de 40 que se desarrollaron inicialmente.
- A través de la caracterización molecular del ADN de las 16 colonias transformantes generadas se identificó al menos un mutante *knockout* de *P. patens* para su gen COR413, el mismo que se denominó KO-COR 5.
- Se realizó un análisis preliminar del comportamiento del cultivo del mutante *knockout* KO-COR 5 en comparación con wt de *P. patens*, no llegándose a observar efectos negativos o diferenciales en el crecimiento (peso fresco y peso seco) bajo condiciones de cultivo estándar.

## 7. Referencias bibliográficas

- Arnon DI (Daniel I, Hoagland DR. The water-culture method for growing plants without soil. Rev. ed. / by D.I. Arnon. Berkeley, Calif: College of Agriculture, University of California; 1950.
- Aro E-M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1993 Jul 5;1143(2):113–34.
- Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin C, Thomashow MF. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996 Nov 12;93(23):13404–9.
- Ashton NW, Cove DJ. The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 1977 Jan 1;154(1):87–95.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell.* 1995 Jul 1;7(7):1099–111.
- Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martínez J, Alberdi M, *et al.* Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol. Plant.* 2003 Jun 1;118(2):262–9.
- Bray EA. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.* 1993 Dec;103(4):1035–40.
- Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 1997 Feb 1;2(2):48–54.
- Breton G, Danyluk J, Charron J-BF, Sarhan F. Expression Profiling and Bioinformatic Analyses of a Novel Stress-Regulated Multispanning Transmembrane Protein Family from Cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2003 May 1;132(1):64–74.
- Brookes G. Plant Agriculture: The Impact of Biotechnology. In: Stewart CNJ, editor. *Plant Biotechnol. Genet.* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2016 May 19]. p. 1–19. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470282014.ch1/summary>
- Chandler PM, Robertson M. Gene Expression Regulated by Abscisic Acid and its Relation to Stress Tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994;45(1):113–41.
- Chen L, Zhong H, Ren F, Guo Q-Q, Hu X-P, Li X-B. A novel cold-regulated gene, COR25, of *Brassica napus* is involved in plant response and tolerance to cold stress. *Plant Cell Rep.* 2010 Nov 21;30(4):463–71.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 2007 Oct 1;12(10):444–51.
- Citovsky V, Kozlovsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, *et al.* Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell. Microbiol.* 2007 Enero;9(1):9–20.
- Clive J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. NY, USA: ISAAA; 2015.

Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998 Diciembre;16(6):735–43.

Cold Spring Harbor Protocols. YEP medium. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006 Dec 1;2006(7):pdb.rec10810.

Cullis CA. *Plant Genomics and Proteomics* [Internet]. New Jersey, USA: John Wiley & Sons; 2004 [cited 2016 May 25]. Available from: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471373141.html>

Cuming AC, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H, Quatrano RS. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytol.* 2007 Oct 1;176(2):275–87.

Curtis MD. Recombinant DNA, Vector Design, and Construction. In: Stewart CNJ, editor. *Plant Biotechnol. Genet.* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2016 May 25]. p. 159–91. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470282014.ch7/summary>

Danyluk J, Carpentier E, Sarhan F. Identification and characterization of a low temperature regulated gene encoding an actin-binding protein from wheat. *FEBS Lett.* 1996 Jul 8;389(3):324–7.

Del Viso F, Puebla AF, Carrillo N, Chan RL. Obtención de plantas tolerantes a distintos tipos de estreses abióticos. In: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editors. *Biotechnol. Mejor. Veg. II. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); 2010.* p. 519–528.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Report.* 1 de septiembre de 1983;1(4):19-21.

Díaz ML, Zappacosta DC, Franzone PM, Ríos RD. Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. In: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editors. *Biotechnol. Mejor. Veg. II. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); 2010.* p. 243.257.

Dilks TJK, Proctor MCF. The pattern of recovery of bryophytes after desiccation. *J. Bryol.* 1974 Enero;8(1):97–115.

Epoch Biolabs Inc. User's Guide for DNA fragment Recovery From Agarose Gel - GenCatch™ Gel Extraction Kit [Internet]. 2010. Available from: <http://www.epochlifescience.com/protocol/2260050%20Gel%20extraction.pdf>

Finer J, Dhillon T. Transgenic Plant Production. In: Stewart CNJ, editor. *Plant Biotechnol. Genet.* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2016 May 19]. p. 245–74. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470282014.ch10/summary>

Fowler S, Cook D, Thomashow MF. The CBF Cold-response Pathway. In: Jenks MA, Hasegawa PM, editors. *Plant Abiotic Stress* [Internet]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2005 [cited 2016 May 30]. p. 71–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470988503.ch4>

Frank W, Ratnadewi D, Reski R. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta.* 2004 Aug 18;220(3):384–94.

- Garwe D, Thomson JA, Mundree SG. Molecular characterization of XVSAP1, a stress-responsive gene from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker1. *J. Exp. Bot.* 2003 Jan 2;54(381):191–201.
- Garwe D, Thomson JA, Mundree SG. XVSAP1 from *Xerophyta viscosa* improves osmotic-, salinity- and high-temperature-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Biotechnol. J.* 2006 Oct 1;1(10):1137–46.
- Gelvin SB. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003 Mar 1;67(1):16–37.
- Guy CL. Cold Acclimation and Freezing Stress Tolerance: Role of Protein Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1990;41(1):187–223.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta.* 2003 Feb 15;217(2):290–8. .
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Res.* 2000 Nov 1;10(11):1788–95.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000;51(1):463–99.
- Hitz WD, Carlson TJ, Jr JRB, Kinney AJ, Stecca KL, Yadav NS. Cloning of a Higher-Plant Plastid [omega]-6 Fatty Acid Desaturase cDNA and Its Expression in a *Cyanobacterium*. *Plant Physiol.* 1994 Jun 1;105(2):635–41.
- Invitrogen a. User Manual TA Cloning® Kit [Internet]. Invitrogen; 2008a. Available from: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ta\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf)
- Invitrogen b. User Manual Gateway® pENTR™ Dual Selection Vectors [Internet]. 2008c. Available from: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pentrdualselectionvectors\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pentrdualselectionvectors_man.pdf)
- Invitrogen. T4 DNA Ligase - Manual [Internet]. 2008b. Available from: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/t4dnaligase\\_5U\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/t4dnaligase_5U_man.pdf)
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell.* 1997 Nov 1;9(11):1935–49.
- Janmohammadi M, Zolla L, Rinalducci S. Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry.* 2015 Sep 1;117:76–89.
- Jenks MA, Hasegawa PM, editors. *Plant Abiotic Stress: Jenks/Plant Abiotic Stress* [Internet]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2013 [cited 2016 May 29]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118764374>
- Kamisugi Y, Cuming AC. The Evolution of the Abscisic Acid-response in Land Plants: Comparative Analysis of Group 1 LEA Gene Expression in Moss and Cereals. *Plant Mol. Biol.* 2005 Nov;59(5):723–37.

Kamisugi Y, Cuming AC, Cove DJ. Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(19):e173–e173.

Kawamura Y, Uemura M. Plant low-temperature tolerance and its cellular mechanisms. In: Jenks MA, Hasegawa PM, editors. *Plant Abiotic Stress* [Internet]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2014 [cited 2016 May 29]. p. 109–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118764374.ch5>

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, *et al.* Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *Plant Cell.* 2001 Apr 1;13(4):889–905.

Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell.* 1996 Mar 1;8(3):489–503.

Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, Citovsky V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends Genet.* 2006 Enero;22(1):29–37.

Lee H, Cho HH, Kim I-C, Yim JH, Lee HK, Lee YK. Expressed sequence tag analysis of Antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* from King George Island, Antarctica. *Mol. Cells.* 2008 Apr 30;25(2):258–64.

Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. 1980.

Life Technologies. Gateway® Cloning Protocols [Internet]. [cited 2015 May 20]. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/bo/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/protocols.html#lr>

Livingston DP, Henson CA. Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant Physiol.* 1998 Jan 1;116(1):403–8.

Logan BA, Monteiro G, Korniyev D, Payton P, Allen RD, Holaday AS. Transgenic overproduction of glutathione reductase does not protect cotton, *Gossypium hirsutum* (Malvaceae), from photoinhibition during growth under chilling conditions. *Am. J. Bot.* 2003 Sep 1;90(9):1400–3.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, *et al.* Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 2004 Jun 1;38(6):982–93.

Minnis P, Pearsall DM, Smith BD, Dennell RW, Crawford GW, Harlan JR, *et al.* The Origins of Agriculture: An International Perspective. Cowan CW, Watson PPJ, editors. Tuscaloosa: University Alabama Press; 2006.

Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 1962 Jul 1;15(3):473–97.

Murashige & Skoog medium including vitamins | Duchefa Biochemie [Internet]. [cited 2015 Jul 17]. Available from: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222>

Okawa K, Nakayama K, Kakizaki T, Yamashita T, Inaba T. Identification and characterization of Cor413im proteins as novel components of the chloroplast inner envelope. *Plant Cell Environ.* 2008 Oct 1;31(10):1470–83.

O'Malley, R. C., Barragan, C. C., & Ecker, J. R. (2015). A User's Guide to the *Arabidopsis* T-DNA Insertional Mutant Collections. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1284, 323–342. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8\\_16](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_16).

Oldenhof H, Wolkers WF, Bowman JL, Tablin F, Crowe JH. Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2006 Agosto;1760(8):1226–34.

Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, *et al.* Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* 2003 Jun 1;34(6):868–87.

Papdi C, Joseph MP, Salamó IP, Vidal S, Szabados L. Genetic technologies for the identification of plant genes controlling environmental stress responses. *Funct. Plant Biol.* 2009;36(8):696–720.

Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, *et al.* A TILLING Reverse Genetics Tool and a Web-Accessible Collection of Mutants of the Legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2003 Mar 1;131(3):866–71.

Pinthong R. Agroinfiltration for transient gene expression in floral tissues of *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'. *Journal of Agricultural Technology.* 2014; Vol. 10(2): 459-465.

Prieto E. H. Tecnología del DNA Recombinante. *Biotechnol. Veg.* Santiago de Chile: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA); 2005. p. 99–112.

Puchta H, Hohn B. From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Trends Plant Sci.* 1996 Oct;1(10):340–8.

Puebla A, Del Viso F. Tolerancia a factores abióticos. In: Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L, editors. *Biotechnol. Mejor. Veg.* Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); 2004. p. 355–65.

Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, *et al.* Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiol.* 2003 Dec 1;133(4):1755–67.

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, *et al.* The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science.* 2008 Jan 4;319(5859):64–9.

Robinson SA, Wasley J, Tobin AK. Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Glob. Change Biol.* 2003 Diciembre;9(12):1681–717.

Rogers C, Wen J, Chen R, Oldroyd G. Deletion-Based Reverse Genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 2009 Nov 1;151(3):1077–86.

Ruibal Croce MC. Evaluación funcional de proteínas de respuesta al estrés abiótico en las plantas modelo *Physcomitrella patens* y *Arabidopsis thaliana* [Doctoral]. [Montevideo, Uruguay]: Universidad de la Republica; 2015.

Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.* 2006 Enero;45(2):237–49.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol. Cloning Lab. Man.* [Internet]. 1989 [citado 30 de septiembre de 2017];(Ed. 2). Recuperado a partir de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061>

Sanchez-Ballesta MT, Rodrigo MJ, Lafuente MT, Granell A, Zacarias L. Dehydrin from Citrus, Which Confers *in Vitro* Dehydration and Freezing Protection Activity, Is Constitutive and Highly Expressed in the Flavedo of Fruit but Responsive to Cold and Water Stress in Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2004 Abril;52(7):1950–7.

Schaefer DG, Zryd J-P. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 1997 Diciembre;11(6):1195–206.

Schaefer DG, Zryd J-P. The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. *Plant Physiol.* 2001 Dec 1;127(4):1430–8.

Schaefer D, Zryd J-P, Knight CD, Cove DJ. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 1991 May 1;226(3):418–24.

Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, *et al.* Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics.* 2002a Nov;2(6):282–91.

Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003 Abril;14(2):194–9.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, *et al.* Monitoring the Expression Pattern of 1300 *Arabidopsis* Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant Cell.* 2001 Jan 1;13(1):61–72.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, *et al.* Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 2002b Agosto;31(3):279–92.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996 Abril;7(2):161–7.

Sigma-Aldrich. Classic Plant Media - Plant Tissue Culture Protocol [Internet]. Sigma-Aldrich. [cited 2017 Jul 3]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/classic-plant-media.html>

Steponkus PL. Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984;35(1):543–84.

Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ, Thomashow MF. Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998 Nov 24;95(24):14570–5.

Sun M-M, Li L-H, Xie H, Ma R-C, He Y-K. Differentially expressed genes under cold acclimation in *Physcomitrella patens*. J. Biochem. Mol. Biol. 2007 Nov 30;40(6):986–1001.

Tähtiharju S, Sangwan V, Monroy AF, Dhindsa RS, Borg M. The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. Planta. 1997 Nov;203(4):442–7.

Thermo Fisher Scientific Inc. Double Digest Calculator—Thermo Scientific [Internet]. [cited 2015 May 19]. Available from: <https://www.lifetechnologies.com/bo/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>

Thermo Scientific. Product Information. FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase [Internet]. 2012. Available from: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0012878\\_FastAP\\_Thermo\\_Alkaline\\_Phosphatase\\_ef0654\\_UG.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0012878_FastAP_Thermo_Alkaline_Phosphatase_ef0654_UG.pdf)

Thomashow MF. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999;50(1):571–99.

Thomashow MF. So What's New in the Field of Plant Cold Acclimation? Lots! Plant Physiol. 2001 Jan 1;125(1):89–93.

Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, et al. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. Plant J. 1 de junio de 2000;22(6):531–41.

Tuteja N. Cold, Salinity, and Drought Stress. In: Hirt H, editor. Plant Stress Biol. [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009 [cited 2016 May 29]. p. 137–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527628964.ch7>

Twyman RM, Christou P, Stoger E. Genetic Transformation of Plants and Their Cells. In: Oksman-Caldentey K-M, Barz WH, editors. Plant Biotechnol. Transgenic Plants [Internet]. CRC Press; 2002 [cited 2016 May 27]. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203910849.ch6>

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J. 1 de febrero de 2006;45(4):523–39.

Wada H, Murata N, Gombos Z. Enhancement of chilling tolerance of a *cyanobacterium* by genetic manipulation of fatty acid desaturation. Nature. 1990 Sep;347(6289):200–3.

Wang J, Zuo K-J, Qin J, Zhang L, Su L, Liu J, et al. Isolation and bioinformatics analyses of a COR413-like gene from *Gossypium barbadense*. Acta Physiol. Plant. 2006 Nov 29;29(1):1–9.

Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta. 2003 Sep 26;218(1):1–14.

Wang X, Liu Z, He Y. Responses and tolerance to salt stress in bryophytes. *Plant Signal. Behav.* 2008 Agosto;3(8):516–8.

Wise MJ, Tunnacliffe A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci.* 2004 Enero;9(1):13–7.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *Plant Cell.* 2002 May 1;14(suppl 1):S165–83.

Zale JM, Agarwal S, Loar S, Steber CM. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 1 de junio de 2009;28(6):903-13.

Zeevaart J a D, Creelman RA. Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1988 Jun 1;39(1):439–73.

Zhu J-K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 2001 Feb 1;6(2):66–71.

Zhu J-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002;53(1):247–73.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Composición del medio Hoagland's (Arnon and Hoagland 1950). (Sigma-Aldrich)

Detalle	Concentración (mg/l)
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	656.4
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	3.35
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2.50
MgSO <sub>4</sub>	240.76
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1.81
MoO <sub>3</sub>	0.016
KNO <sub>3</sub>	606.60
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.22

### ANEXO 2. Composición del Medio MS (Murashige y Skoog 1962). (Duchefa Biochemie 2012)

Detalle	Concentración
<b>Micro Elementos</b>	<b>mg/l</b>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
FeNaEDTA	36.70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60
<b>Macro Elementos</b>	<b>mg/l</b>
CaCl <sub>2</sub>	332.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
KNO <sub>3</sub>	1900.00
MgSO <sub>4</sub>	180.54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00
<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Glycina	2.00
myo-Inositol	100.00
Acido Nicotínico	0.50
Pyridoxina HCl	0.50
Thiamina HCl	0.10

**ANEXO 3. Región genómica de *Physcomitrella patens* utilizada para realizar construcciones, con las respectivas secuencias correspondientes a los primers**

CCGGAGCTGTGCCTCATCGATCCACTACCGTACGCTGCGAGTGTGGGGATTCCGTGCATGGGTCAGGCGAT  
 GAGCGGACGGTGCCAGTGATTCTGGACGTCCATTGCTCGAAATGACGATGTCCGTGCTGGATAAATCGCC  
 CCCGTGCTTTCGTTTCTGAGCATGTGCTGCAGCGAACCAAGTTCAGACGCTGCAAACGACTTCTGGTGTG  
 TTTAGTTACTTTCGAATTGGAAGTTCATCATCGAGTGGAGGTCTTGGTAGTGGTTTGTTCGTCTAGTTGATCTA  
 GTGAGAAGTATCTGATCGATCGGTGCTTCTGAATCGTGCGAAACGATTTTGAGTCGTGATTGTCAAGTGC  
 GATGSCCTCTCACATCGTTCACCTGAGCTATACTGTTCCCGGTGCGAAGGTTGGCATTAGGGCCGCAATCG  
 GTGCAGAAATCGAGAAAGGGGTCTAGTCCATCGTTATAGCATTAGGGGGTGTGGATTAAGAGCTCGATC  
 GGGGATTCGGCGCAAGGCTTTCAGTGTGAGACTACTTTGGTGGGGTCTTCGTATCATCTTCGTCTGTCTGT  
 CTTCCGGGGGGTCTCTTTGGGGGAGCGTCGTCTCTTATGGAAGTGTGGATCAGGCAGCGGGGGAGCGCTC  
 GGGAGCACGTGTGCATATGGATTCTACGGCCTTCATGGGGTTTCGACTGAGGCGATTTCGATGGGGGCTAG  
 CCGCAGCCTGTGCGGTGCTGCTCATGAAACGGGACGCAGGGGGCGAAGAAGCAGTTCTACGCGGCCATACT  
 CGCCTTGGAAAGCGCCGAGGGATGTGGTGTACTGGGCCAAGAAGCGAGTATGGTCTGTGGGTTCGCTTTATT  
 GGTCTGGCGATCAAGCTATTTTACAGTAATAGCCTTCCCGGGGAGCTCGACTACCCGCTGGCGGTGTACCTC  
 TTCATTGCCTCGCTCCCTGGAGAGGCTATGGTGCGTGCGGAAACGTTGGGAGCCGTTGTGATATCCACACT  
 GCTCGCCTGCTTCGTGGTCTACCAGTACTTTTCCAACATGGACAAGATCTCGACTGGATTCAAGGGAGAGCG  
 TCTGATCACCACCTTCGCAATTCTGTTACGGCCATAGCTTGTATCGGCTTCTGGGATGGTGTGTAATTG  
 AATTTTCGCTGACACTGTGGCAATTCATGCTTCCAGTCTTGTAAATAGGCAGCGTATCGCAGGCAGGATTG  
 CCACTTTGTAGGTGCCAAGAAATAGTTTACGTCCCCGTTTCCAATGCTCTCCGCATCATTTAAACATGCATG  
 CGGAGATCACGAGATCTCTGCCATTCAACTGTACAATTGCATTGTGGTTTCTACGCTACTTTTTTCTTTTTCTT  
 TTTCTTTCGTCAGTGTAGGAGAGCGCTCACATGGAAAATTGAATCGCTAAGGCTCAGATACTACAGATG  
 ACTATCCGTGTATCTCATTCTCGGTTGTCTTTCGAAGTTCCTTCTTAATCGATTCTCGTAAAAATGACCCAAA  
 TTTTCTACAAATCAATGCATTAGGTTTATGCATTTATGGTTGAATGATATGCTGATGCGGATCTTTTGGTGT  
 TCAGTGATGTGTTGTGTTTTAAATTGTGAGTATGGTTGGTAAACCTCAATCCTCTTCTGTCTCAAGTTCCTG  
 CTGGTTAAGCGAAAATCCCCTCTCGATACTCTTCTCAGTTAGTCCCTTGGTATCTCAGCCAGCACTGGCACACT  
 GAGTTGATGAAAAAGAAGAATTACACGTTTATCGAGGGGGTGTCTATTTTCGAGGAACGGTTTCGTTGTGAG  
 AGCGTGTCTGATGTGGAATATTTACCAGCATTGTAATGCTTCGCTCAATAATACCTGATCCATCCTCTCCTG  
 CACCATCCAGCAGCCGGAAGCTACAAAAGAGCTCAGTGTCAATCGTCCTGACTTGTGGAAACCTACAGAT  
 CTCGGCTGATGGTATACAAAATAAACGGGTTCAAACACTCTGCCGGCAAGGTAGTTGGAGTTGTACGTTA  
 AACAGCAATTTCAATGCTCGACAATTATTAATGCGACATGGCTCTGGATTTCCGAAGTTGGCTGGTAAGA  
 ATATTAGGATAAATTGGACTAGAAAATGAATGGGATGGATTTAAGGTTAGTTTTACAGATTCCAGGTGAA  
 GCAGGTGAAACATTTCTTTGCAACTGGCGTCAGTATCAGTCGTACATCAGTTTTACGATGATATATTCATTTT  
 GTGATTTTATCATTCTCTGCTGTAGGAATTTGTTGCTTTACAGGTGATGTAAAATGGGATTTTGGGATTGAAT  
 GGAGAGCGATCGGAAGTTGAGGTTGCAAATTTTCATGGTCAACTGATTTCTCCAGCTCAAGTGGCGTTTTT  
 GGACGTCTCATTCTGGAGAAGGTGTAACAATGCTTCCGTTCAAGCATCGT

(1)	GGGGTACC	GTGCATGGGTCAGG	5skpncor	788 pb
	AAAGCTT	ACCCACAGACCATACTCGC	as5hindcor	+ p 802 pb

- (2) CTTGGATCCGCTTCCTGGGTATGGTGT s3bamcor 754 pb  
 TGTCTAGAGCAGGAGAGGATGGAT as3xbacor + p 771 pb
- (3) TGatgGTAcCGATGGCCTTCACATCGT Spentr-kpncor 776 pb  
 atatCTCGAGtgCAACACCATACCCAGGAA ASpentr-Xhocor + p 797 pb

**ATG** = Codón de inicio (o start)

**TGA** = Codón de parada (o stop)

(1) Primers para la construcción knockout de la región 5'PpCOR413, a la que se adicionó sitios de restricción para KpnI en 5skpncor y HindIII en as5hindcor, que se utilizarón para digerir y clonar. Adicionalmente, se muestra el tamaño del producto a generar con y sin los sitios de restricción.

(2) Primers para la construcción knockout de la región 3'PpCOR, a la que se adicionó sitios de restricción para BamHI en s3bamcor y XbaI en as3xbacor, que se utilizarón para digerir y clonar. Adicionalmente, se muestra el tamaño del producto a generar con y sin los sitios de restricción.

(3) Primers para la construcción de sobreexpresión de PpCOR413+GFP, a la que se adicionó sitios de restricción para KpnI en Spentr-kpncor y XhoI en ASpentr-Xhocor, que se utilizarón para digerir y clonar. Adicionalmente, se muestra el tamaño del producto a generar con y sin los sitios de restricción.

#### ANEXO 4. Protocolo de PCR estandarizado

Detalle mix	Cantidad
ADN genómico - 100 ng	0.5 µl
Buffer c/ Mg 10X	2.5 µl
dNTP's 10 mM	0.5 µl
Primer Spentr-kpncor 10 µM	1 µl
Primer ASpentr-Xhocor 10 µM	1 µl
H <sub>2</sub> O	19 µl
Taq Polimerasa	0.5 µl
<b>TOTAL</b>	<b>25 µl</b>

<b>Programa PCR</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempos</b>
Fase inicial desnaturalización	
94 °C	3 minutos
Ciclos X 40	
94 °C	40 segundos
58 °C	40 segundos
72 °C	1 minuto
Fase final elongación	
72 °C	7 minutos

#### ANEXO 5. Protocolo de PCR estandarizado

<b>Detalle mix</b>	<b>Cantidad</b>
ADN genómico - 100 ng	0.5 µl
Buffer c/ Mg 10X	2.5 µl
dNTP's 10 mM	0.5 µl
Primer s5kpncor ó s3bamcor 10 µM	1 µl
Primer as5hindcor ó as3xbacor 10 µM	1 µl
H <sub>2</sub> O	19 µl
Taq Polimerasa	0.5 µl
<b>TOTAL</b>	<b>25 µl</b>

<b>Programa PCR</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempos</b>
Fase inicial desnaturalización	
94 °C	3 minutos
Ciclos X 40	
94 °C	40 segundos
56 °C	40 segundos
72 °C	1 minuto
Fase final elongación	
72 °C	7 minutos

#### ANEXO 6. Protocolo de Transformación de protoplastos de *Physcomitrella patens*.

Todas las soluciones tienen H<sub>2</sub>O milliQ y manitol 8%

##### **MEDIOS**

600 ml Hoagland's (Arnon and Hoagland 1950) + 8% D-mannitol. Dividir de la siguiente manera:

- 50 ml PRMT: (protoplast regeneration media Top)  
Agregar 0.25 g de Agar.

Luego de fundir y antes de usar, agregar 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  500 mM a cada frasco de 50 ml. Preparar un baño de agua a  $45^\circ\text{C}$ , fundir el PRMT y colocarlo en el baño de agua durante unos 15 minutos aproximadamente, pipetear 3 ml de PRMT para cada caja.

- 50 ml PRML: (protoplast regeneration media Liquid)  
Luego de autoclavar agregar 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  500 mM a cada frasco de 50 ml
- 500 ml PRMB (para unas 17 placas): (protoplast regeneration media Bottom)  
Agregar 5 g Agar.

## SOLUCIONES

- 10 ml PEG 8000 40%:  
Disolver 4 g de PEG 8000 en 10 ml de:  
0.8 g D-mannitol  
1 ml 1M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$   
100  $\mu\text{l}$  1M Tris pH 8.0  
 $\text{H}_2\text{O}$  10 ml

Filtrar lentamente por filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , la solución es espesa pero es posible filtrarla lentamente. Guardar en la heladera, es bueno separar en alícuotas para abrir de a una y que queden las otras sin tocar.

- Sacarosa 0.44 M (4.52 g sacarosa en un volumen final de 30 ml, ojo disolver en menos volumen y luego enrasar al volumen final). Filtrar por filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y alícuotar 5 ml en cada tubo estéril de 15 ml.
- D-mannitol 8% (equivale a 0.44M). 200 ml. Autoclavar.
- CaPW (calcium protoplast wash). 200 ml (16 g D-mannitol + 1.46 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Autoclavar.
- $\text{MgCl}_2$  1M. 2 ml de  $\text{MgCl}_2$  4.9M + 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  en tubo rosca. Autoclavar.
- $\text{CaCl}_2$  0.5M Disolver 3.65 g en 50 ml, autoclavar.
- 20 mL 3M:  
1.6 g D-mannitol  
300  $\mu\text{L}$  1M  $\text{MgCl}_2$   
2 mL 1% MES pH 5.6 ajustar con 0.1M KOH.  
 $\text{H}_2\text{O}$  hasta 20 ml.  
Filtrar con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , guardar a  $4^\circ\text{C}$ .
- Driselasa stock 2%:  
0.4 g de driselasa en 20 ml de D-mannitol 8 %  
Mezclar suavemente 30 minutos a temperatura ambiente.  
Mantener 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$   
Agitar 5 minutos a temperatura ambiente  
Centrifugar 10 minutos a 2500 g  
Sacar el sobrenadante  
Filtrar con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y guardar en alícuotas en eppendorf a  $-20^\circ\text{C}$  (aproximadamente 1 ml por tubo). Cada eppendorf se diluye con D-mannitol 8% para tener una conc. final de 0.2% Driselasa. Se usan 5 ml de Driselasa diluida por cada caja de protonema.

## **MATERIALES**

- Autoclavar pipetas Pasteur con algodón en la punta, celofanes, pinzas y H<sub>2</sub>O milliQ.

## **PROTOPLASTOS:**

1. Para cada transformación, usar 2 placas de protonema, se trabaja a partir de protonemas que vienen de repiques continuos, al menos 3, regenerando nuevamente protonemas con ultraturax y dejando 1 semana en crecimiento, durante 3 semanas (al usar mortero para los pasajes siempre queda marrón el tejido y después de unos días recién se recupera, es por eso que para llegar a un colchoncito verde hay que esperar 10-13 días).
2. Agregar 10 ml de driselasa 0.2 % en 8 % de manitol (5 ml por caja de protonema): 9 ml de D-manitol 8% y 1 ml de driselasa stock 2%, de esta manera se obtuvo concentración final 0,2%.
3. Tapar con papel estañado e incubar durante toda la noche (24 h) en oscuridad sin agitación en el cuarto de plantas (para asegurar la misma temperatura). Observar en microscopio invertido antes de seguir para ver si la digestión anduvo bien. Los protoplastos tienden a sedimentar al fondo.
4. Con cuidado filtrar en filtro de 100 µm suavemente, centrifugar a 80 g (700 rpm) durante 5 min. y extraer sobrenadante
5. Lavar con 8% D-mannitol (10 ml).
6. Centrifugar a 80 g durante 7 min.
7. Lavar con 10 ml de CaPW.
8. Centrifugar a 80 g durante 5 min.
9. Agregar 10 ml de CaPW (cantidad exacta).
10. Contar los protoplastos (concentración total al menos  $1.6 \times 10^6$  protoplastos).
11. Centrifugar nuevamente a 80 g durante 5 min.

## **TRANSFORMACION:**

1. Resuspenderlos en solución 3M (conc. final:  $1.6 \times 10^6$  protoplastos/ml)
2. Agregar 300 µl de protoplastos a 15 µg de ADN (vol de ADN no mayor a 30 µl).
3. Mezclar bien pero suavemente con pipeta Pasteur.
4. Incluir control sin ADN.
5. Agregar 300 µl de solución PEG.
6. Mezclar bien pero suavemente con pipeta Pasteur.
7. Heat shock por 5 minutos a 45 °C.
8. Incubar a temperatura ambiente (20-25 °C) por 5 minutos.
9. Agregar 600 µl de CaPW, mezclar suavemente.
10. Agregar 1 ml CaPW, mezclar suavemente.
11. Agregar 2 ml CaPW, mezclar suavemente.
12. Agregar 3 ml CaPW, mezclar suavemente.
13. Agregar 4 ml CaPW, mezclar suavemente.
14. Centrifugar los protoplastos a 80 g por 5 minutos.
15. Resuspender en 0.3-0.5 mL de PRML (debe haber una conc. de pp mayor a 105/ml para que regeneren bien)
16. Agregar 2.5 ml de PRMT (previamente a 45 °C).

17. Plaquear 3 ml de suspensión por placa con PRMB + celofán.
18. Incubar 7 días. Transferir luego a medio Hoagland's con selección y dejar crecer por 1-2 semanas.
19. Pasar a medio nuevo con selección por 1-2 semanas.
20. Pasar a medio sin selección (1-2 semanas).
21. Pasar nuevamente a selección.

Al plaquear deben quedar más de  $10^5$  protoplastos por caja porque la eficiencia de regeneración en los experimentos control sin ADN dieron un 1-10% de regeneración, o sea que en 103-104 protoplastos que regeneren tendremos un 1-7% de transformantes, o sea aprox. 10-100 apenas!!

#### **ANEXO 7. Análisis de varianza de peso fresco del desarrollo de vitroplantas de *Arabidopsis thaliana* cultivados en tratamientos de estrés con Ácido Salicílico y PEG 18%.**

##### **Análisis de varianza de peso fresco para el tratamiento con Ácido Salicílico 5 mM.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	905.556	452.778	150.926	0.0000 **
Dentro los grupos	6	18.000	3.000		
Total	8	923.556			
C.V.= 1.69 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

##### **Prueba de Duncan para el tratamiento con Ácido Salicílico 5 mM.**

Genotipo	Promedio	Duncan*
Wt	116.667	A
COR-GFP 22	98.333	B
COR-GFP 10	93.333	C

\* Letras iguales estadísticamente no muestran diferencias ( $\alpha=0.05$ )

##### **Análisis de varianza de peso fresco para el tratamiento con Polyetilen Glicol (PEG) al 18 %.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	514.889	257.333	10.480	0.0110 *
Dentro los grupos	6	147.333	24.556		
Total	8	662.000			
C.V.= 7.47 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

##### **Prueba de Duncan para el tratamiento con Polyetilen Glicol (PEG) al 18 %.**

Genotipo	Promedio	Duncan*
wt	72.333	A
COR-GFP 22	71.000	A
COR-GFP 10	55.667	B

\* Letras iguales estadísticamente no muestran diferencias ( $\alpha=0.05$ )

**ANEXO 8. Análisis de varianza de peso fresco del desarrollo de vitroplantas de *Arabidopsis thaliana* cultivados en diferentes tratamientos de estrés y respectivo control (tratamiento sin estrés).**

**Análisis de varianza de peso fresco para el tratamiento con Manitol 0.5 M.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	642.667	321.333	1.225	0.3579 ns
Dentro los grupos	6	1573.333	262.222		
Total	8	2216.000			
C.V.= 19.67 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza de peso fresco para el tratamiento con Paraquat 100  $\mu$ M.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	240.889	120.444	1.404	0.3161 ns
Dentro los grupos	6	514.667	85.778		
Total	8	755.556			
C.V.= 9.28 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza de peso fresco para el tratamiento con Polyetilen Glicol (PEG) al 30 %.**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	96.889	48.444	0.960	ns
Dentro los grupos	6	302.667	50.444		
Total	8	399.556			
C.V.= 11.23 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza de peso fresco para el tratamiento con Cloruro de Sodio (NaCl) 15 mM**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	48.889	23.444	1.426	0.3115 ns
Dentro los grupos	6	98.667	16.444		
Total	8	145.556			
C.V.= 3.69 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

### Análisis de varianza de peso fresco para el Control

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	42.889	21.444	0.235	ns
Dentro los grupos	6	546.667	91.111		
Total	8	589.556			
C.V.= 9.82 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

### ANEXO 9. Análisis de varianza de peso fresco y largo de raíz de vitroplantas de *Arabidopsis thaliana* previo a ser llevadas a tratamiento de frío (2 días a 4 °C).

#### Análisis de varianza de peso fresco de vitroplantas de *A. thaliana* de 1 semana previo a ser llevadas a tratamiento de frío (2 días a 4 °C).

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	96.000	48.000	27.429	0.0000 **
Dentro los grupos	24	42.000	1.750		
Total	26	138.000			
C.V.= 16.54 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

#### Análisis de varianza de largo de raíz de vitroplantas de *A. thaliana* de 1 semana previo a ser llevadas a tratamiento de frío (2 días a 4 °C).

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	92.088	46.044	19.584	0.0000 **
Dentro los grupos	57	134.016	2.351		
Total	59	226.104			
C.V.= 16.32 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**ANEXO 10. Análisis de varianza del largo de raíz de vitroplantas de *Arabidopsis thaliana* inmediatamente después de recibir el tratamiento de frío y sin ningún tratamiento (1 semana más 2 días a 4 °C).**

**Análisis de varianza del largo de raíz de vitroplantas de *A. thaliana* de 1 semana y 2 días de tratamiento de frío (2 días a 4 °C).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	66.414	33.207	12.770	0.0000 **
Dentro los grupos	57	148.228	2.600		
Total	59	214.643			
C.V.= 17.82 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza del largo de raíz de vitroplantas de *A. thaliana* de 1 semana y 2 días de crecimiento (Sin tratamiento - Control).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	113.385	56.693	8.782	0.0005 **
Dentro los grupos	57	367.982	6.456		
Total	59	481.367			
C.V.= 19.78 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; F = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**ANEXO 11. Análisis de varianza de peso fresco y largo de raíz de vitroplantas de *Arabidopsis thaliana*, tratadas y sin tratamiento (Control), 5 días después del tratamiento de frío (2 días a 4 °C), es decir 2 semanas después de la siembra.**

**Análisis de varianza de peso fresco de vitroplantas de *A. thaliana* de 2 semanas, es decir 5 días después del tratamiento de frío (2 días a 4 °C).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	F	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	111.500	55.750	14.017	0.0000 **
Dentro los grupos	33	131.250	3.977		
Total	35	242.750			
C.V.= 17.22 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; *F* = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza de largo de raíz de vitroplantas de *A. thaliana* de 2 semanas, es decir 5 días después del tratamiento de frío (2 días a 4 °C).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	<i>F</i>	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	385.050	192.525	3.848	0.0271 *
Dentro los grupos	57	2852.156	50.038		
Total	59	3237.205			
C.V.= 29.34 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; *F* = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza de peso fresco de vitroplantas de *A. thaliana* de 2 semanas, sin ningún tratamiento de estrés (Control).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	<i>F</i>	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	145.500	72.750	8.380	0.0011 **
Dentro los grupos	33	286.500	8.682		
Total	35	432.000			
C.V.= 19.64 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; *F* = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**Análisis de varianza de largo de raíz de vitroplantas de *A. thaliana* de 2 semanas, sin ningún tratamiento de estrés (Control).**

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M. C.	<i>F</i>	Probabilidad
Entre los grupos (wt, COR-GFP 22 y COR-GFP 10)	2	1325.821	662.910	6.346	0.0032 **
Dentro los grupos	57	5954.456	104.464		
Total	59	7280.277			
C.V.= 37.75 %					

G.L. = grados de libertad; S.C. = suma de cuadrados; M.C. = Media cuadrática; *F* = distribución de Fisher, \* significancia para  $\alpha=0,05$ , \*\* significancia para  $\alpha=0,01$ , ns = no significativo.

**ANEXO 12. Resultados de secuenciación de pKO-COR.**

10-pKO-5\_F-5\_VQ

NNNNNNNNNNNGNNNNNCATTNCTCNANTGANGATGTCCGTGCTGGATAAATCGCCCC  
 GTGCTTTCGTTTCTGAGCATGTGCCTGCAGCGAACCAAGTTCAGACGCTGCAAACGACT  
 TCTGGTGTTGTTTAGTTACTTCGAATTGGAAGTTCATCATCGAGTGGAGGTCTTGGTAG  
 TGGTTTGTTCGTCTAGTTGATCTAGTGAGAAGTATCTGATCGATCGGTGCTTCTTGAATC  
 GTGCGAAACGATTTTGAGTCGTGATGTGTCAGTAGCGATGGCCTCTCACATCGTTCACCT  
 GAGCTATACTGTTCCCGGTGCGAAGGTTGGCATTAGGGCCGCAATCGGTGCGAATCG  
 AGAAAGGGGTCTAGTCCATCGGTTATAGCATTAGGGGGTGTGGATTTAAGAGCTCGAT  
 CGGGGATTCGGCGCAAGGCTTCCAGTGTGACTACTTTGGTGGGGTCGTCGTCATCA

TCTTCGTCGTCTGTCTTCGGGGGGTCTCTTTGGGGGAGCGTCGTCTCTTATGGAAGTGCT  
GGATCAGGCAGCGGGGGAGCGCTCGGGAGCACGTGTGCATATGGATTCTACGGCCTTC  
ATGGGGTTTCGACTGANGCGATTTCGATGGGGGCTAGCCGCAGCCTGTGCGGTGCTGCT  
CATGAAACGGGANGCNNGGGCGAAGAAGCAGTTCTACGCGGCCATACTCNNCNTTN  
NNCGCCNNNGNNNNNNNNNNNNNGGGGCCNANNNNNCGNNNNNNNNNGGGNNNNNN

11-pKO-3\_F-3\_VQ

NNNNNNNNNGNATTCATGCTTCCANTTCTTGTAATAGGCAGCGTATCGCAGGCAGGAT  
TGCCACTTTGTAGGTGCCAAGAAATAGTTTACGTCCCCGGTTTCCAATGCTCTCCGCAT  
CATTTAAACATGCATGCGGAGATCACGAGATCTCTGCCATTCAACTGTACAATTGCATT  
GTGGTTTCTACGCTACTTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTCGTCACTAGTGAGGAGAGCGCTC  
ACATGGAAAATTGAATCGCTAAGGCTCAGATACTACAGATGACTATTCCGTGTATCTCA  
TTCTCGGTTGTCTTTCGAAGTTCCTTCTTAATCGATTCTCGTAAAAATGACCCAAATTTT  
CTACAAATCAATGCATTAGGTTTATGCATTTATGGTTGAATGATATGCTGATGCGGATC  
TTTTGGTGTCTCAGTGATGTGTTGTGTTTTAAATTGTGAGTATGGTTGGTAAACCTCAAT  
TCCTCTTCTGTCTCAAGTTCCTGCTGGTTAAGCGAAATCCCCTCTCGATACTCTTCTCAG  
TTAGTCCCTTGGTATCTCAGCCAGCACTGGCACACTGAGTTGATGAAAAAGAAGAATT  
ACACGTTTATCGAGGGGGTGCTCATTTTCGAGGAACGGTTTCGTTGTGAGAGCGTGTCTG  
ATGTGGAATATTTACCAGCATTTCGTAATGCTTCNCTCAATAATACCNGNCCATCCNCT  
NCNNNNNNCTANNNNNGGNCNNNNNNNNNGNNNNNCNCNNNCNTTTTTNNNNCCCNT  
TTTTNNNNNN