

Análisis, en *Arabidopsis thaliana*, de un promotor inducible por infección fúngica en maíz

Analysis, in *Arabidopsis thaliana*, of a promoter inducible by fungal infection in maize

María Díez Téllez.

Grado en Biología. Julio 2017

Tutorizado por Gregorio Hueros Soto y Águeda María González Rodríguez.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract	1
Introducción	2
Objetivos	5
Material y Métodos.....	6
Cultivo in vitro de Arabidopsis	6
Preparación de esporas de hongos	6
Ensayos de infección de plantas 25869p:GFP:GUS.....	6
Tinción GUS del material tratado.....	7
Tinción con azul tripano	7
Análisis de la expresión de GUS por Western-blot	7
Construcción un vector 25869p:3xFLAG:MYB para transformación de Arabidopsis.....	9
Construcción un vector 25869p:MRP1:GR para transformación de Arabidopsis	10
Clonaje por Recombinación, sistema Gateway.....	11
Transformación de E. coli	12
PCR de colonias de E. coli.....	13
Preparación de DNA plasmídico (Mini-prep) de colonias, digestión	13
Transformación de Agrobacterium electrocompetentes.....	13
Transformación y selección de Arabidopsis	14
Extracción de DNA de Arabidopsis, análisis por PCR.....	15
Ensayos con hongos sobre las plantas T1	16
Recetas digestiones, PCR y ligación.....	17
Resultados y discusión	18
Análisis de las plantas 25869prom:GUS.....	18
Tinciones de GUS.....	18
Tinción de azul de tripano	20
Western-blot	20
Construcción de dos nuevos vectores para la transformación de Arabidopsis	20
Obtención de las plantas transgénicas.....	20
Ensayos preliminares en las plantas T1.....	20
Conclusiones:.....	28
Conclusions:.....	28
Bibliografía.....	23

Resumen

En este trabajo se ha valorado la actividad del promotor del gen GMZM2G043878 como bioindicador de la infección de un hongo, así como la posibilidad de utilizarlo para regular la expresión del factor transcripcional tóxico ZmMRP-1 en Arabidopsis bajo el control de este promotor, que como en teoría es silencioso hasta que se induce, ZmMRP-1 no causaría la muerte de la planta. Para ello, se transformaron plantas con una construcción que contiene el gen ZmMRP-1 bajo el control del promotor, una que lleva un freno molecular adicional (receptor de glucocorticoides) y otra que no lo tiene. Los experimentos realizados mostraron que el promotor no sólo se induce por infección de hongos, sino que otros factores como el estrés, la sequía o la herida podrían inducir también su expresión. Por otro lado, las plantas que tienen el freno molecular presentan mayor supervivencia, mientras que aquellas que sólo llevan el promotor y el factor transcripcional tienen hojas muertas incluso solo por el trasplante. Aun así, no hemos sido capaces de establecer con claridad cuál es el comportamiento de este promotor, creemos que fundamentalmente por falta de patógenos naturales de Arabidopsis.

Palabras clave: factor transcripcional, hongos, promotor, transgénico.

Abstract

In this research it was assessed the activity of the promoter of the gene GMZM2G043878 as a bioindicator of fungus infection, as well as the possibility of expressing the toxic transcriptional factor ZmMRP-1 in Arabidopsis under the control of this promoter, which in theory is silent until the induction, ZmMRP-1 would not cause the death of the plant. For this, plants were transformed with a construct containing the ZmMRP-1 under the control of the promoter, one carrying an additional molecular brake (glucocorticoid receptor) and one that does not. The experiments showed that the promoter is not only induced by fungal infection, but other factors such as stress, drought or injury could also induce its expression. On the other hand, plants that have the molecular brake showed more survival, whereas those that only carry the promoter and the transcriptional factor have dead leaves even only by the transplant. Even so, we have not been able to establish clearly the behavior of this promoter, we believe due to lack of natural pathogens of Arabidopsis.

Key words: fungi, promoter, transgenic, transcriptional factor .

Introducción

Arabidopsis thaliana es una planta perteneciente a la familia de las brasicáceas comúnmente utilizada en los laboratorios para los estudios genéticos, debido a su ciclo de vida relativamente corto, su capacidad de autofecundarse, la cantidad de semillas que produce y su facilidad para ser modificada. Además, su genoma es pequeño, 157Mbps.

Como toda planta, *Arabidopsis thaliana* es susceptible de sufrir infecciones por diferentes hongos y microorganismos. En este caso, vamos a utilizar *Arabidopsis* como sistema modelo en el que valorar un promotor de maíz que creemos puede ser inducible por la infección de hongos. Debido a las características mencionadas con anterioridad, esta planta ha sido ampliamente utilizada para el estudio genético básico de la interacción entre las plantas y los patógenos (Piquerez, 2014; Dangl, 2014).

En la naturaleza podemos encontrar una gran cantidad de patógenos que afectan a las plantas, pero éstas no se ven afectadas por todos debido a la existencia de mecanismos de defensa efectivos (Park, 2009). *Arabidopsis* se ve afectada por hongos y oomicetos, tanto en condiciones de laboratorio como naturales. En general, los mecanismos de defensa activados en respuesta a la infección varían con el tipo de hongo. Los biotrofos suelen activar la defensa señalizada por el ácido salicílico mientras que los necrotrofos activan las respuestas mediadas por el jasmónico y el etileno (Urban, 2002).

Para estos experimentos vamos a utilizar dos hongos: *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme* (ambos se alimentan de tejido vivo). *Aspergillus flavus* es un patógeno oportunista de cereales que, cuando infecta el grano, puede producir aflatoxina, una toxina carcinógena altamente tóxica (Klich, 2007). Por otro lado, *Fusarium moniliforme* causa el pudrimiento del tallo y la infección del grano y puede producir ácido fusárico y fumonisinas (Nelson, 1992). Las fumonisinas atacan principalmente a los cultivos de maíz y de arroz (Urban, 2002), pero hay otras especies de *Fusarium*, como *Fusarium graminearum*, que producen otras micotoxinas como el deoxinivalenol, que infecta principalmente a las flores de *Arabidopsis*.

En la base del grano de maíz, y en contacto con los tejidos maternos, encontramos un conjunto de células epiteliales diferenciadas para facilitar el transporte de nutrientes desde la planta madre a la semilla, que constituyen la Basal Endosperm Transfer Cell Layer (BETL). Diversos datos sugieren que, además, estas células tienen un papel potencial como barrera defensiva (Serna, 2001).

La diferenciación de las células en esta capa está regulada por ZmMRP-1 (Myb-related-protein), un activador transcripcional de 1 dominio que contiene la secuencia SHAQKYF en su dominio de unión a DNA, y el primer factor transcripcional específico de las células de transferencia de semilla identificado (Gómez, 2002). La expresión de esta proteína se detecta en la parte basal del endospermo tan pronto como 3 días después de la polinización, y además regula la expresión de algunos genes específicos de las células de transferencia de maíz, como BETL-1 y BETL-2 (potencialmente implicados en defensa), así como ZmTCRR-1 (Regulador de la Respuesta de las Células de Transferencia, Muñiz, 2006/2012), un gen implicado en rutas de transducción de señales hormonales que se expresa en la capa de células de transferencia del endospermo inmaduro de maíz.

Expresado fuera de las células de transferencia, ZmMRP-1 resulta tóxico para la planta, pues activa un conjunto de genes, aún no identificados, que desencadenan la muerte celular en pocos días. De ahí que los intentos de expresar ectópicamente el ZmMRP-1 bajo el control de varios promotores ubicuos (35S, ubiquitina de maíz...) fallaran a la hora de producir líneas transgénicas estables en maíz, tabaco y Arabidopsis (Gómez, 2009).

En el año 2015, se realizó un estudio sobre los genes de respuesta a la infección de hongos en la semilla de maíz, en el que se identificó el gen GMZM2G043878 (aquí denominado 25869), que se expresa en todo el grano y que se induce por infección. Este gen codifica para una proteína homóloga a la antifúngica de *Ginkgo biloba* Gnk2, una proteína de almacenamiento que tiene actividad antifúngica contra patógenos como *Fusarium* spp. (Miyakawa, 2014). Para comprobar si las secuencias responsables de la inducción de este gen por infección se encuentran en su promotor, se transformó Arabidopsis con una construcción en la que el promotor 25869 controla la expresión del gen delator GUS (β -glucuronidasa) (Daniel González Gamo, 2015).

En los ensayos preliminares, con plantas crecidas en tierra, se llegó a la conclusión de que el promotor se inducía por infección gracias a la señal GUS en la hoja, pero que no existía una relación directa y lineal entre ambas variables. En este trabajo nos proponemos profundizar este análisis seleccionando líneas para trabajar con plantas T2 y realizar ensayos *in vitro*, para controlar mejor la infección.

Por otro lado, queremos valorar la posibilidad de utilizar el promotor 25869 como regulador de la expresión de ZmMRP-1. Nuestro objetivo es expresar este factor

transcripcional bajo el control del promotor 25869 esperando obtener plantas en las que el nivel de expresión basal no resulte tóxico. En estas plantas podríamos comprobar si la expresión del factor transcripcional tiene algún efecto antifúngico, un posible papel de ZmMRP-1 en las células de transferencia del endospermo de maíz.

Transformaremos Arabidopsis con dos construcciones, ambas con el promotor 25869. En la primera construcción se expresará ZmMRP-1 unido a un epítipo FLAG para la detección de la proteína. En la segunda, la proteína ZmMRP-1 estará fusionada al receptor de glucocorticoides (GR), lo cual debería limitar la toxicidad del gen, en el caso de que la regulación por el promotor 25869 no sea lo suficientemente silenciosa. El GR es un miembro de la familia receptores de las hormonas esteroideas, que no solo actúa como un receptor, sino como un factor de transcripción que, en presencia de un glucocorticoide, activa la transcripción de promotores que contienen elementos de respuesta a glucocorticoides. Se considera que es un buen sistema de inducción en plantas porque es simple y los glucocorticoides no causan efectos pleiotrópicos en las plantas (Chua, 1997).

El tratamiento con dexametasona (glucocorticoide sintético) permitirá la entrada de la proteína ZmMRP1::GR en el núcleo, activando la expresión del conjunto de genes que causan la muerte celular. Dentro de los genes regulados por ZmMRP-1 está ZmTCRR-1 (como ya se ha mencionado con anterioridad), las plantas que vamos a transformar contienen el promotor de ZmTCRR-1 fusionado al gen delator GUS, esto nos permitirá la estimación sencilla de la cantidad de ZmMRP-1 en los núcleos en ausencia/presencia de hongos y en ausencia/presencia de dexametasona.

El gen GMZM2G043878 fue seleccionado en un experimento de hibridación a un microarray en el que se compararon los perfiles de expresión de genes en diversas regiones del grano de maíz en ausencia y presencia de hongos. Mientras que, sin infectar, el gen se 5 expresa fundamentalmente en las sedas (Chen, 2014), tras la infección, el gen se induce en todo el grano unas 200 veces.

Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo la valoración del promotor del gen 25869 como bioindicador de infección fúngica en Arabidopsis, además de determinar si este promotor se puede utilizar para incrementar la resistencia de las plantas a la infección. Con este objetivo, vamos a:

1. Estudiar con mayor precisión cuál es la respuesta del promotor, en Arabidopsis, a la infección fúngica.
2. Transformar plantas que lleven el promotor unido a ZmMRP-1, determinar si es posible producir plantas viables y analizar su respuesta a la infección.

Material y Métodos

Cultivo in vitro de Arabidopsis

Para verificar que el promotor 25869 es realmente silencioso y responde a infección, seleccionamos varias líneas 25869p:*GFP:GUS* del trabajo de D. González Gamo para infectarlas in vitro con las esporas de *Aspergillus* y *Fusarium*. Las líneas fueron seleccionadas en base a unas fotografías de las hojas de las 51 líneas con las que se había trabajado y que habían sido teñidas para GUS sin ningún tratamiento previo.

Para esterilizar las semillas se tratan 5 min con Domestos al 5%, 1 min con etanol al 70% y 3 lavados con agua estéril. Las semillas se sembraron en placas que contenían el medio MS (Murashige & Skoog) con kanamicina (4.302g/L de sales MS; Duchefa, 5g de sacarosa; 1.2% de agar; 50 µg/ml kanamicina) para su selección.

Una vez sembradas, las placas se sellan con parafilm y se meten en la cámara fría (4-6°C) durante dos días, para sincronizar el crecimiento, y en el cuarto de cultivo (50% humedad relativa, entre 23 y 25° C, 16h de luz y 8h de oscuridad) 10 días. Las plantas resistentes (de color verde) se trasplantan a placas extra-altas con medio MS, 0.5% sacarosa.

Preparación de esporas de hongos

Los hongos, *Aspergillus flavus* (cepa A1120) y *Fusarium monoliforme* (cepa A0159), se sembraron desde stocks almacenados a -80° C en placas PDA (potato dextrose agar, Cultimed)

Las placas se incubaron a 30° C hasta esporulación (2-3 semanas). Las esporas, blancas en el caso de *Fusarium* y amarillo-verde en el caso de *Aspergillus*, se recogieron mediante agitación de las placas 30 min en una solución PBS (Buffer Fosfato Salino, 137mM NaCl; 2.7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1.8mM KH₂PO₄), conteniendo 0.05 % detergente (Tween-80) debido a la hidrofobicidad de las esporas. Las esporas se recuperaron mediante centrifugación a 3000 g 10 minutos y se resuspendieron en medio fresco. Para la determinación de la concentración de esporas se sembraron diluciones seriadas de los stocks (desde 10⁻² hasta 10⁻⁵) en placas PDA y se contaron los núcleos de crecimiento a los 2-4 días.

Ensayos de infección de plantas 25869p:GFP:GUS

Las infecciones se llevaron a cabo depositando sobre las hojas (plantas de unas 3 semanas de edad) gotas de 3µl de la solución de esporas, diluida hasta conseguir un número de 40-

45 esporas por gota. En los experimentos más completos, se infectaron con el hongo las 3 plantas de 3 placas de cada línea, y en otras 3 placas las hojas se trataron con gotas de una solución mock (PBS + detergente a una concentración equivalente a la dilución de esporas). Las hojas tratadas se incubaron 6, 24, 48 o 72 horas (dependiendo del experimento).

Tinción GUS del material tratado

Las hojas tratadas se incubaron a 37° C durante 24 h en tubos Eppendorf o placas de 24 pocillos conteniendo 500-600µl de la solución de tinción de GUS (RA Jefferson, 1987). La solución está compuesta por: 0.5mM potasio ferricianuro; 0.5mM potasio ferrocianuro; 10 mM EDTA; 50mM Tampón fosfato pH 7; 20% metanol; 0.1% Triton X-100 y 0.5mg/ml X-GLUC (5-Bromo-4-cloro-3-indonil-β-D-glucuronido, el stock a 20 mg/ml está en dimetilformamida). La actividad β-glucuronidasa actúa sobre el sustrato generando un precipitado de color azul. Tras la tinción, las muestras se lavaron varias veces con etanol al 70%, hasta eliminar la clorofila.

Tinción con azul tripano

Algunas muestras tratadas se tiñeron con azul de tripano (TripanBlue), que es un colorante empleado en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad. La solución stock de azul de tripano es una mezcla constituida por: 10g de fenol, 10ml de glicerol, 10ml de ácido láctico, 10ml de agua y 0.02g de azul de tripano. La solución de tinción es una dilución (1:2) del stock con etanol al 96%.

El tejido a teñir se transfirió a un tubo de plástico con tapa, cubriéndose con la solución de azul de tripano diluido, aproximadamente 1ml. Los tubos se incubaron en el bloque térmico a 94° C 1 minuto y después a temperatura ambiente hasta 24 h. Para desteñir, la solución de tinción fue reemplazada por 1 volumen de una solución de cloral hidrato (disolver 1 Kg de cloral hidrato en 400 ml de agua). Las muestras se pueden conservar en cloral hidrato durante varios meses.

Análisis de la expresión de GUS por Western-blot

Electroforesis de proteínas y transferencia

Para extraer la fracción proteica que contiene la proteína de fusión Green fluorescent protein: β-glucuronidasa (GFP :GUS,95 kDa), las hojas tratadas fueron congeladas en N2 líquido y pulverizadas en un molino de bolas (TissueLyser II, Quiagen) con dos esferas de acero de 3 mm durante 40s. El pulverizado se extrajo entonces con un volumen de

tampón fosfato: 50mM fosfato pH 7.2, 1mM de EDTA, 0.3% Triton X-100 en hielo 15 min.

Las muestras se centrifugaron a 4° C y 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y la concentración de proteínas fue estimada mediante la reacción de Bradford (reactivo Bradford, Pierce) utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar.

Para la electroforesis, se utilizaron geles de poliacrilamida comerciales NuPAGE (Invitrogene) de concentración 12% con tampón de electroforesis (también comerciales) MES o MOPS. Para la preparación de las muestras, se mezclaron 15 µl de proteína (conteniendo 15 µg) con 2.3 µl de agente reductor 10x (DTT) y 5.8 µl de tampón de carga 4x (azul de bromofenol y glicerol). Las muestras se incubaron a 70°C 10 min y se cargaron en los geles junto con marcadores de peso molecular pre-teñidos (Full Range Rainbow Pre-stained Markers, Amersham o Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). Los geles corrieron a 100 V durante 45 min.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas mediante una segunda electroforesis perpendicular a la primera, hacia membranas Immobilon-P (PVDF, Millipore). La membrana actúa como un soporte sólido uniendo e inmovilizando las proteínas, lo que permite la hibridación de un anticuerpo que las pueda detectar.

Para la transferencia efectiva de las proteínas el gel y la membrana se introducen en un sándwich de papel de filtro y bayetas (bayeta/papel de filtro/gel/membrana previamente hidratada con metanol-tampón/papel de filtro/bayeta) bañados en un tampón de transferencia (Invitrogen) con un 10% de metanol. El sándwich, del cual se ha excluido con cuidado cualquier burbuja, se introduce en una cubeta a la que se le aplica un campo eléctrico (30V durante 1h). Una vez ha terminado la transferencia, la membrana se deja secar sobre un papel Whatman. 9

Antes de hibridar con el anticuerpo, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (0.1% en 5% ácido acético) 15 min y se destiñeron en agua.

Inmunodetección

Las membranas se bloquearon en una solución de leche en polvo sin grasa al 5% en tampón TTBS 1X (0.02M Tris, 0.15M NaCl pH 7.4, 0.1% Tween) durante 1 hora. Además, este tampón se va a utilizar para incubar las membranas con los diferentes anticuerpos.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (en nuestro caso anti-GUS, producido en un conejo, Invitrogen) a una dilución 1:2000 durante 1 hora. Tras realizar 3 lavados de 5 min en TTBS, las membranas se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario, un anticuerpo de cabra contra la inmunoglobulina de conejo y conjugado con peroxidasa (Sigma).

Tras realizar 5 lavados de 5 minutos en TTBS, las membranas se incubaron 5 min en una mezcla 1:1 del sustrato quimioluminiscente y H₂O₂ (WesternBright ECL, Advantas). La reacción de la peroxidasa sobre el agua oxigenada y el luminol produce emisión de luz, que se detectó exponiendo las membranas a películas sensibles desde 15 a 90 min. Las películas se revelaron 4 minutos y se fijaron 5 min, utilizando revelador y fijador radiográfico (Agfa).

Construcción un vector 25869p:3xFLAG:MYB para transformación de Arabidopsis

Nuestro objetivo es crear un vector en el que ZmMRP-1 esté controlado por el promotor 25869. La secuencia de ZmMRP-1 irá fusionada a 3 dominios FLAG (epítipo utilizado para la inmunopurificación y para la detección de moléculas con anticuerpos). Las piezas que van a formar parte del vector de transformación están distribuidas en diferentes vectores, no es necesario extraerlas de los genomas de origen, pero tenemos que diseñar un protocolo para reunir las en un solo vector. Todos los diseños de los vectores se realizaron previamente “in silico” con el programa Vector NTI.

Ambos vectores llevarán dos genes de resistencia: kanamicina (para seleccionar las colonias positivas durante el proceso de clonación) y resistencia a herbicida (para seleccionar las plantas transgénicas, que hayan incorporado la construcción).

Partimos de un vector disponible, 35 s(4x):3XFLAG:ZmMRP-1, en el que se sustituirá el promotor 35S (4x) por el promotor 25869. Se diseñaron 2 cebadores para el promotor 25869 que añadían, tras la amplificación por PCR, las dianas de corte de las enzimas EcoRI (5') y XhoI (3'). En el diseño del primer 5', se ignoraron las primeras 90 pb del promotor 25869, para evitar un sitio de corte de la enzima XhoI presente en el promotor. Estas dianas fueron utilizadas tanto para digerir el promotor amplificado como el vector de destino. La PCR se hizo 10 siguiendo el programa adecuado para la KOD Hot Start (Figura 7), una polimerasa termoestable de alta fidelidad, y que deja extremos romos en las moléculas amplificadas.

Tras amplificar el promotor con estos dos sitios de corte, el DNA amplificado (unos 3 µg) fue purificado en columna (MiniElute Reaction Cleanup kit, Qiagen) digerido con las enzimas y purificado mediante electroforesis en gel, se realizó una tinción con Sybersafe, un tinte alternativo al bromuro de etidio que se observa con luz azul, que no daña el DNA y que nos permite cortar la banda que nos interesa y purificarla después. El DNA se extrajo del gel con MiniElute Gel Extraction kit (Qiagen). El vector y el promotor fueron ligados utilizando ligasa T4 (Invitrogen Life Technologies), siguiendo el protocolo de la Figura 10 para extremos cohesivos.

Construcción un vector 25869p:MRP1:GR para transformación de Arabidopsis

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el factor transcripcional ZmMRP1 resulta tóxico para la planta, por lo que vamos a construir otro vector que llevará, bajo el control del promotor 25869, la secuencia codificante de ZmMRP1 en fusión traduccional con la secuencia codificante del receptor de glucocorticoides de rata (GR).

PCR del promotor

Para la amplificación del promotor utilizamos un primer del vector en el que está clonado el promotor (primer M-13 forward), y un primer antisentido del promotor 25869. El fragmento amplificado contiene una diana de restricción para la enzima NotI, que será utilizada para la introducción del promotor en el vector

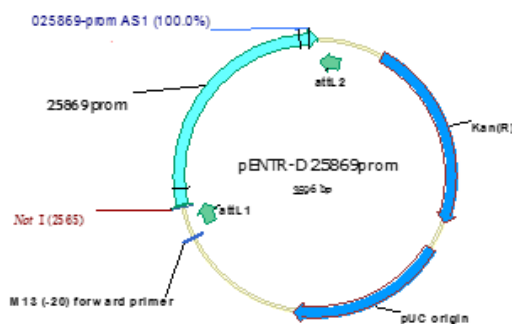


Figura 1. Vector origen de la secuencia del promotor 25689

va a realizar con la enzima KOD Hot Start (Figura 7). A continuación, la reacción se purificó utilizando columnas MiniElute Reaction Cleanup kit (Qiagen), y se puso a digerir con NotI a 37° C durante 24h. El extremo 3' del promotor 25869 es romo (como resultado de la amplificación usando KOD) y por tanto compatible con el extremo generado por digestión con ScaI que utilizaremos en el vector de destino.

Después se volvió a purificar, pero en este caso mediante la separación en un gel y tinción con Sybersafe. La purificación del promotor, desde el fragmento de agarosa que lo contiene, se realizó con el MiniElute Gel Extraction kit (Qiagen).

Digestión del plásmido MRP1:GR con ScaI y NotI

El promotor 25869, digerido con NotI, se va a clonar en el vector ZmMRP1:GR (Figura 2) eliminando el promotor de ZmMRP1 mediante digestión NotI-ScaI. Sin embargo, el procedimiento es más complicado porque el vector ZmMRP1:GR tiene 3 dianas de corte para ScaI (Figura 2), por

lo que, para poder obtener el vector cortado por el sitio de interés, fue necesario realizar una digestión parcial del vector.

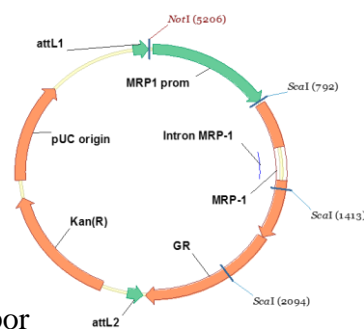
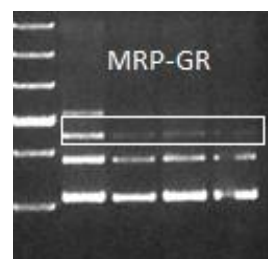


Figura 2. Vector ZMMRP1:GR, en el que se clonó el promotor 25869 sustituyendo al promotor de ZmMRP1

El vector fue digerido en primer lugar con NotI, después de 4 horas a 37°C se añadieron 20µl adicionales de mezcla de digestión con 1 unidad de ScaI (ambas enzimas funcionan en el mismo tampón, siguiendo el protocolo de la Figura 9). La digestión continuó a 37° C durante 40 minutos, extrayendo cada 10 minutos 10µl, que se transfirieron a un tubo en hielo con 2µl de tampón de carga de electroforesis y 8µl de agua, para detener la reacción.



Las digestiones parciales se cargaron en un gel de agarosa (Figura 3) que, tras la electroforesis, se tiñó con Sybersafe. El fragmento de tamaño adecuado fue

Figura 3. Gel para separar las digestiones parciales. Cada carril de electroforesis es un tiempo, 10', 20' 30' y 40'. Carril 1, marcador de peso molecular.

diseccionado y el DNA purificado con el MiniElute Gel Extraction kit (Qiagen). El promotor y el vector se pusieron a ligar utilizando el protocolo de la Figura 10 (extremos romos).

Clonaje por Recombinación, sistema Gateway

El vector 25869p:ZmMRP1:GR que hemos descrito aun no es un vector apropiado para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Procedimos entonces a movilizar el casete 25869p:ZmMRP1:GR hacia un vector con las señales que utiliza *Agrobacterium* (secuencias LB y RB) y los genes marcadores (resistencia a herbicida) necesarios. Para la movilización utilizamos una reacción de recombinación (sistema Gateway, Invitrogene) entre el vector que hemos creado y un vector de destino (pEarlyGate 302, Figura 4). La tecnología Gateway está basada en las propiedades del sitio específico de recombinación del bacteriófago lambda (Landy, 1989), lo que facilita

la integración del lambda en el cromosoma de *E. coli*. Para poder utilizar esta tecnología los vectores necesitan tener los sitios de recombinación (*attL* en *el de partida*, *attR* en *el de destino*) y deben ser tratados con las recombinasas que median esta reacción.

Para disminuir el número de colonias resistentes a Kn simplemente han sido transformadas con el vector de partida, procedimos a digerir éste con MluI, una enzima que corta dos veces en el esqueleto del plásmido, sin afectar

la construcción (se analizó en un gel y se purificó). Para la recombinación utilizamos la LR Clonase™ enzyme mix II (Invitrogene):

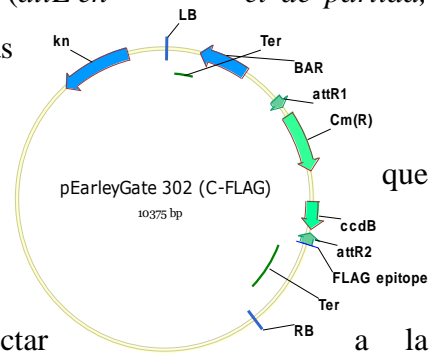


Figura 4. Vector de destino pEarlyGate 302 con el que se va a recombinar el casete 25689p:MRP1:GR digerido con MluI

- Mezclar unos 50 ng del vector de entrada y 100 ng del vector de destino.
- Añadir tampón TE (10 mM Tris-ClH, 1 mM EDTA, pH 8.0) hasta 4µl.
- Añadir 1µl del mix de LR Clonase enzyme y mezclar bien pipeteando brevemente.
- Incubar las reacciones a 25° C durante 1h.
- Añadir 0.5µl de la solución de proteinasa K a cada reacción e incubar 10 minutos a 37°C (elimina las enzimas de recombinación).
- Transformar *E. coli* químicamente competentes.

Transformación de *E. coli*

Utilizamos células químicamente competentes (one-shot top-10 cells, Invitrogene) que se conservan en alícuotas a -80° C, y deben ser descongeladas en hielo.

1. Mezclar 5µl de reacción de ligación, o 2 µl de la mezcla de recombinación, con las células en hielo, con cuidado de no dañar las células pipeteando.
2. Incubar en hielo durante 30 min
3. Incubar a 42°C sin movimiento durante 30 s (choque térmico)
4. 2 min en hielo

5. Añadir 250µl del medio SOC (2 % triptona; 0,5 % extracto de levadura; 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) para recuperar las células

6. Incubar con agitación a 37°C durante 1h.

Plaquear las células (20µl o 100µl) en placas con medio LB (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura) con 1.5 % Agar y 50 µg/ml kanamicina.

PCR de colonias de E. coli

Para identificar las colonias portadoras de la construcción deseada, se seleccionaron 15 colonias de las crecidas en las placas con kanamicina y se resuspendieron en tubos con 50 µl de agua. De esos 50 µl, 20 µl se incubaron a 95° C durante 10 minutos para lisar las células, y los otros 30 µl se conservaron a 4° C. Se utilizó 1 µl del lisado para el análisis por PCR (Biotools, Figura 8).

Los cebadores para la PCR fueron elegidos de manera que una reacción positiva indicara presencia del elemento que pretendíamos clonar y orientación correcta. Las reacciones de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%.

Preparación de DNA plasmídico (Mini-prep) de colonias, digestión

En primer lugar, se inocularon en medio líquido (frascos Erlenmeyer con 5ml de medio LB+kanamicina) colonias positivas según el test de PCR. Cada Erlenmeyer se incubó en agitación a 37° C durante 24 h, para el crecimiento de las bacterias. Las bacterias se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación en tubos eppendorf. Se extrajo el DNA con un kit comercial (Biotools Speed Tools Plasmid DNA Purification Kit) y se estimó la concentración de DNA con un Nanodrop.

Transformación de Agrobacterium electrocompetentes

Para la transformación de Agrobacterium se mezclaron 40µl de células electrocompetentes con 1µl de DNA de plásmido. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación, aplicándole 1800V/cm. Las células se recuperaron en medio LB y se sembraron 100µl en una placa que contenga medio LB con rifampicina y kanamicina. La rifampicina se utiliza para seleccionar los genes de virulencia de *Agrobacterium*.

Una de las colonias fue transferida a un Erlenmeyer con rifampicina y kanamicina (50 μ s/ml de cada antibiótico) cultivándolo a 30° C durante 24h en agitación. Para la transformación de Arabidopsis se necesita obtener una gran cantidad de células a una densidad óptica de $A_{600}=1$, por lo que se diluyeron 1:50 los cultivos iniciales. Las células se recogieron de los cultivos finales mediante centrifugación y se resuspendieron en 50ml de:

-5% sacarosa

-10mM $MgCl_2$

-0.05% Silwet L77, (surfactante que se le pone al medio con las bacterias para que éstas sean capaces de atravesar la barrera hidrofóbica de las plantas, añadir al final)

Para medir la densidad óptica a $\lambda=600nm$ se hacen 2 diluciones, 1:5 y 1:10 en cubetas de 2ml. Se utilizó toda la solución de bacterias (50ml) y fue diluida hasta $A_{600}=1$.

Transformación y selección de Arabidopsis

Las flores de las plantas que queremos a transformar llevan una construcción con el promotor ZmTCRR-1 unido a GUS fueron sumergidas en la solución de *Agrobacterium* durante un minuto y medio y fueron drenadas sobre papel de filtro. Después, se envolvieron con papel de film para mantener un 100% de humedad relativa y les quitamos la luz directa durante 48h.

Tras 12 días en la cámara de cultivo, se dejaron de regar para que se secaran. Cuando estaban secas del todo, se pudieron recoger las semillas:



Figura 5. Posición de los tiestos para la obtención de semillas.

-Poner las inflorescencias rodeando un papel de filtro a modo bandeja (Figura 5)

-Romper con el dedo las silicuas que no

han liberado las semillas apretándolas contra el papel de filtro.

-Pasar los restos de tallos, ramas más grandes a otro papel de filtro.

-Las semillas y el conjunto de ramas pequeñas se pasan por un colador de té tipo pinza para deshacernos de las ramitas pequeñas.

-Los demás restos se van a quedar en el papel de filtro, así que, si pasamos el conjunto de semillas de un papel a otro, sólo pasarán las semillas.

- Guardar las semillas en un tubo Eppendorf (T0).

Las semillas se plantaron en tiestos con tierra de semillero con vermiculita (1:1). Cuando estén en estado de plántula, empezar a rociar con herbicida (Fosfinotricina , 20 mg/L) 2-3 veces por semana.

Extracción de DNA de Arabidopsis, análisis por PCR

De las plantas resistentes al herbicida, extraer DNA con el siguiente protocolo:

-Cortar una hoja y poner en un tubo de rosca con 2 bolas de acero de 3 mm y 300 µl de CTAB 2X (Sal de amonio cuaternaria, $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3Br$).

-40 s a fuerza 4 en TissueLyser II, Quiagen.

-Incubar a 65° C al menos 10 minutos, en agitación, y enfriar

-Añadir 300 µl de cloroformo y vortex vigoroso.

-Centrifugar durante 5 minutos para separar fases.

-Transferir 290 µl de la fase acuosa y transferir a un tubo nuevo con 300 µl de 2-propanol para precipitar el DNA y mezclar bien.

-Centrífuga 5 minutos, volcar sobrenadante, vuelta en seco y quitar sobrenadante con punta amarilla.

-Lavar el pellet con 500 µl de EtOH al 70%.

-Centrifugar 2 minutos, quitar el EtOH.

-Secar 5 minutos al aire.

-Añadir 50 µl de agua destilada y resuspender en vortex.

Utilizar 1 µl para el test de PCR en las plantas, siguiendo el programa de Biotools (Figura 8). Los cebadores para la amplificación de un fragmento de ZmMRP-1 se diseñaron teniendo en cuenta que en el vector ZmMRP-1:GR, pero no en el 3XFLAG:ZmMRP-1, la secuencia de ZmMRP-1 contiene un intrón. También se hizo PCR con un cebador para la

detección de un gen de Arabidopsis, Yucca5, para confirmar la presencia de DNA amplificable en la muestra. Como se ve en la Figura 6, todas las plantas resistentes a herbicida resultaron positivas en el test de PCR. Las plantas negativas en el test de ZmMRP-1 lo fueron también en el test control para Yucca5.

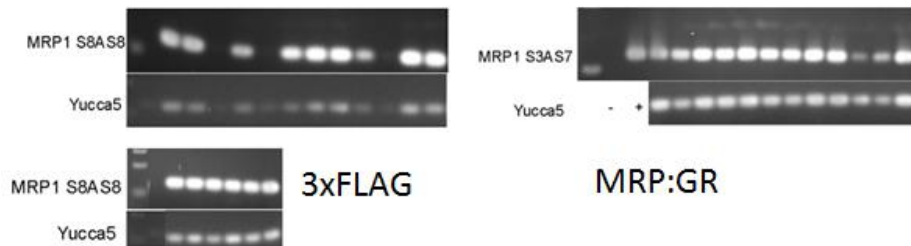


Figura 6. Geles de la PCR de las plantas

Ensayos con hongos sobre las plantas T1

En este caso, las infecciones se llevaron a cabo cortando dos hojas de cada planta, y depositándolas boca arriba en una placa con medio MS sin kanamicina. Una de las hojas se dedicó al ensayo con mock (PBS, pero sin detergente) y la otra se dedicó a la infección con 3µl de una solución de Fusarium de aproximadamente 60 esporas. Además, se le añadió a la solución tanto de mock como de Fusarium, 1µl de dexametasona, para las hojas de las plantas transformadas con 25689p:ZmMRP-1:GR.

Recetas digestiones, PCR y ligación

PCR KOD Hot Start (Novagen)	
Programa	Mezcla
95° 2 min	Buffer 1X
26 x	3 mM MgSO ₄
	0.2 mM dNTPs
95° 20 s	5 ng/μl DNA
Tm del primer 10 s	10 μM de primer
70° 15"/kb	0.02u/μl KOD Hot Start
	Agua según reacción

Figura 7. Mezcla y programa para la PCR con la enzima KOD

Digestiones
DNA (de 0.3 a 3μg)
1μl de enzima (10 unidades de enzima)
Tampón 10X específico de cada enzima
Agua hasta completar un volumen desde 20 a 50μl

Figura 9. Mezcla para las digestiones

PCR estándar (Biotools)	
Programa	Mezcla
95° 5 min	Buffer 1X
30 x	2 mM MgCl ₂
94° 15 s Temperatura óptima	0.2 mM dNTPs
anillamiento primers	Desde 5ng (plásmidos) hasta 50 ng
	(DNA eucariota)
30 s 72°, tiempo de extensión	10 μM Primer
de 60 s por kilobase	1 u/μl de Taq
72° 5 min	Agua

Figura 8. Mezcla y programa para la PCR estándar

Ligasa T4	Extremos cohesivos	Extremos romos
Buffer 5X	4μl	4μl
Ratio Molar	3:1	3:1
Inserto:Vector		
DNA total	0.01-0.1μg	1-1.0μg
Ligasa T4	0.1 unidades	1 unidad
Agua	Añadir hasta 20 μl	Añadir hasta 20 μl
Temperatura	23-26°	14°
Tiempo	1h	16-24h

Figura 10. Mezcla para la ligación con la ligasa T4

Resultados y discusión

Análisis de las plantas 25869prom:GUS

Tinciones de GUS

Las semillas de 5 de las 52 líneas disponibles se seleccionaron en placas con kanamicina. Tratándose de semillas T2 se esperaban 3/4 transgénicos: 1/4 no transgénicos en el caso de líneas con un solo locus transgénico. Las resistentes (transgénicas), fueron utilizadas para el ensayo de infección (detallado en materiales y métodos) y la tinción con GUS. Los resultados revelaron que las hojas tenían señal de GUS tanto en los controles blancos como en las muestras infectadas con el hongo, lo que hace pensar que el promotor no es tan silencioso como se creía, o que las plantas están sometidas a algún tipo de estrés, por ejemplo, el cultivo in vitro en placas con kanamicina, capaz de inducir el promotor. También se vio que, en algunos casos, a las 72h la señal de GUS desaparecía en la zona donde se había depositado la gota de esporas pasando a estar en los haces vasculares (Figura 11). Una posible explicación de estos hechos es que reflejan la dinámica de una infección exitosa. La señal desaparecería de la “zona 0” de la infección, probablemente constituida por células muertas, activándose el promotor en los haces vasculares por los que está progresando el hongo.

Como se discute más abajo, una posible explicación de la variabilidad encontrada en nuestros experimentos es la ineficacia de los hongos que utilizamos en la infección de Arabidopsis. Por otra parte, la alta señal encontrada en las muestras control nos llevó a re-evaluar nuestros criterios de selección de las líneas transgénicas. En principio habíamos escogido las 5 líneas que mostraban una señal de GUS más intensa de entre las 51 producidas en el trabajo de D. González. Estas plantas habían sido evaluadas mientras crecían en tierra y por tanto no estaba claro si habían sido inducidas o no. Ahora sabemos que en ausencia de infección estas 5 líneas expresan significativamente GUS, y el hecho de que difieran en su comportamiento del resto (90%) de las líneas, que apenas mostraban señal GUS en condiciones no controladas, sugiere que no reflejan con precisión el



Figura 11. Fotografía de una de las primeras líneas examinadas 72h después de la infección con Fusarium.

comportamiento del promotor 25869. Es posible que estas líneas contengan múltiples inserciones de la construcción, o que las construcciones se hayan alterado estructuralmente durante el proceso de transgénesis.

Se escogieron por tanto otras 5 líneas, de comportamiento “estándar” (aquellas en las que no se veía apenas señal GUS), las pusimos en placas para seleccionar y repetimos el ensayo con el blanco, Fusarium y Aspergillus. Con los resultados que se muestran en la Figura 12.

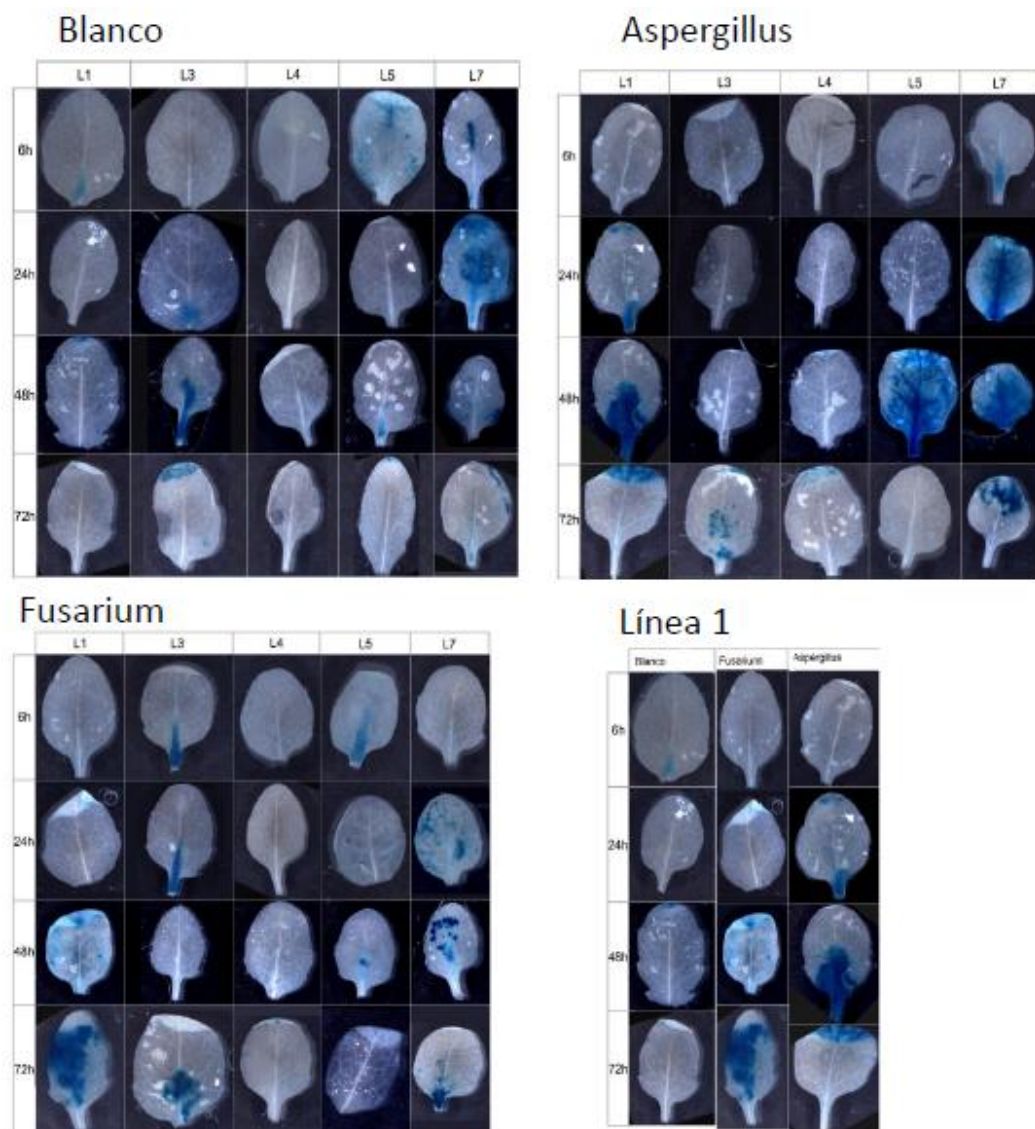


Figura 12. Tinciones de GUS según tratamiento. La última imagen se pone como ejemplo de la variación de la señal, en este caso en la línea 1.

Globalmente, podemos afirmar que el tratamiento con hongos indujo la expresión de GUS. Si bien encontramos una gran variación entre líneas, tiempos e incluso entre hojas de la misma línea sometidas a infección el mismo tiempo (no se muestra). En la mayoría de los casos no se ve señal en el blanco, salvo en la base de los haces vasculares (en la zona cercana al pedicelo) o en el ápice de la hoja. Estos resultados sugieren que el promotor podría ser inducido por otros estímulos, por ejemplo, el estrés en la parte apical de las hojas, causado por inmersión en el medio de cultivo. Por otro lado, la señal de la base de los haces puede deberse a que esa zona sea más accesible a la solución de tinción GUS.

Si sustraemos la señal obtenida en los controles negativos de la obtenida en los tratamientos con hongos, observamos que efectivamente la presencia de esporas induce la expresión del promotor, aunque nunca antes de 24 h y, como se ha mencionado, con una gran variación entre muestras, incluso dentro de la misma línea.

Tinción de azul de tripano

Una posible explicación de la extrema variación observada entre muestras infectadas vendría dada por la posible ineficacia en la infección de los hongos con los que trabajamos, después de todo patógenos de maíz y otros cereales. Para testar la eficiencia de la infección, teñimos hojas tratadas con azul de tripano, un tinte capaz de detectar células vegetales muertas o con la membrana dañada e hifas de hongo (Mauch, 2013).

Las células muertas se observan a la lupa como puntos azules más intensos de pequeño tamaño, y fundamentalmente se localizan en la zona donde se depositaron las esporas del hongo. En la Figura 13 se muestra una hoja que pertenece a la línea 5 a las 72h de ser infectada por *Fusarium*. En esta hoja se pueden ver filamentos rodeando la zona del centro de la hoja, junto al nervio central, que sería la zona donde se depositó la gota que contenía las esporas de *Fusarium*. Al microscopio se observa que estos filamentos son realmente hifas del hongo. Aun así, como este crecimiento de las hifas no es general, se puede deducir que la infección del hongo no funciona de forma consistente. Sólo 5 de las 45 hojas infectadas con *Fusarium* durante 24 horas mostraron crecimiento de hifas dentro de la hoja.

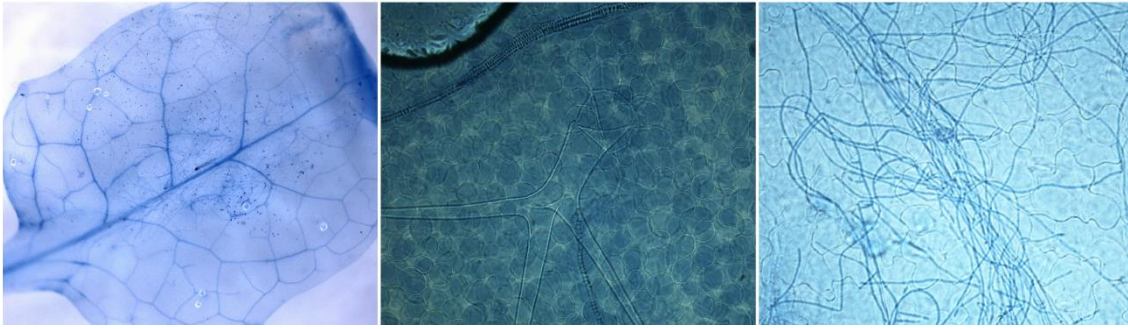


Figura 13. Tinciones del TripanBlue línea 5 a las 72h en microscopio.

Nosotros sabíamos que *F. moniliforme* y *A. flavus* no son patógenos naturales de *Arabidopsis*, pero también habíamos comprobado que, “in vitro”, es posible manipular el sistema para conseguir la infección. Parece claro sin embargo que la ineficacia en la infección dificulta seriamente la evaluación del promotor 25869 en cuanto a su respuesta a infecciones. Vamos a repetir estos experimentos con patógenos naturales de *Arabidopsis* (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea*; Hanhong Bae et al., 2006; C.M. van Wees et al., 2003, Rainer P. Birkenbihl et al., 2012) pero los resultados no estarán disponibles para formar parte de esta memoria.

Western-blot

Una posible fuente de la variación observada, en cuanto a tinción GUS, podría ser la infiltración diferencial de la solución de tinción en las hojas. Para testar esta hipótesis decidimos detectar directamente la proteína GUS en experimentos de Western-blot. Hemos probado dos sistemas de electroforesis (tampones MES y MOPS, Invitrogene) y solo en el tampón MOPS (Figura 14, panel inferior) conseguimos separar la proteína GUS-GFP de 95kDa (Figura 14, flecha), de una proteína de tamaño similar que co-migra con GUS-GFP en el tampón MES (Figura 14, panel superior).

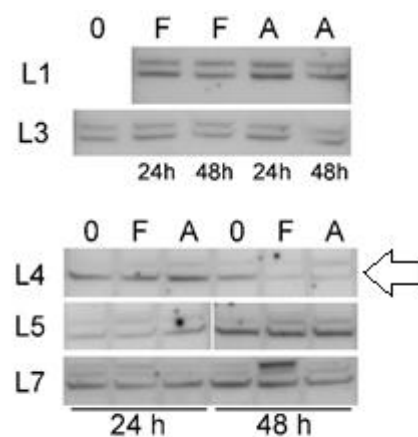


Figura 14. Resultados Western-blot.

En cualquier caso, los resultados observados son compatibles con los obtenidos mediante tinción histoquímica. La señal no es muy intensa, es muy variable y aparece incluso en algunas de las muestras no infectadas. En cuanto a la comparación entre hongos, el tratamiento con *Fusarium* produjo resultados más consistentes que el tratamiento con *Aspergillus*, de nuevo de acuerdo a lo observado con las tinciones histoquímica y con azul de tripano.

Construcción de dos nuevos vectores para la transformación de Arabidopsis

Un objetivo de este trabajo fue la utilización del promotor 25869 para regular la expresión del factor transcripcional específico de células de transferencia *ZmMRP-1* (Gómez y col., 2002, 2009). Por una parte, queríamos testar la posibilidad de lograr una expresión significativa de este factor manteniendo baja su toxicidad mediante una expresión regulada. Por otra, queríamos

testar la supuesta actividad anti-patogénica del factor, haciendo depender su expresión de la propia infección. El proceso de construcción de los dos vectores

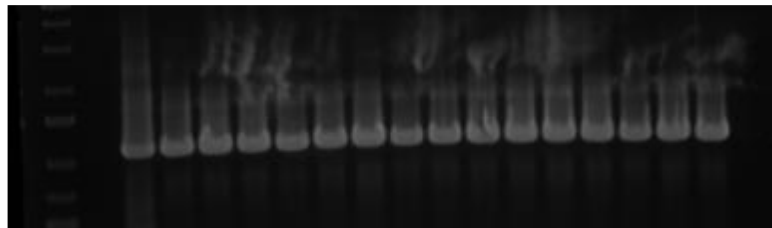
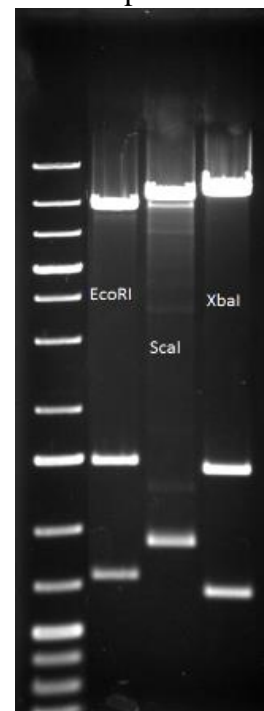


Figura 15. PCR de las colonias de E. coli transformadas con el vector 25869p:3XFLAG:MYB.

que hemos preparado para transformación de plantas se detalla en

Materiales y Métodos. En general, todos los pasos del proceso han funcionado a la perfección.

En la PCR realizada para identificar las colonias portadoras de la construcción deseada, vimos que todas las colonias analizadas tenían señal positiva en el caso del vector 25869p:3XFLAG:MRP1 (Figura 15) y la mayoría en el caso del vector 25869p:MRP-1:GR. Algunas de las colonias positivas fueron entonces utilizadas para iniciar cultivos líquidos desde los que se purificaron los plásmidos.



A continuación, se realizó una digestión de los vectores con distintas enzimas de restricción para verificar que el DNA tenía los vectores de transformación diseñados. El vector 25869p:3XFLAG:MRP1 fue digerido con EcoRI-XhoI y ScaI, mientras que el vector 25869p:MRP-1:GR lo fue con XbaI. El resultado de estas digestiones (Figura 16) indica que ambas contienen los elementos que queríamos clonar y en la orientación adecuada.

Figura 16. Gel que muestra la digestión con las distintas enzimas de restricción para verificar los vectores.

La Figura 17 muestra esquemas de ambas construcciones, generados con el programa VectorNTI (Invitrogene). Las propiedades más relevantes de ambos vectores, asumiendo que el promotor 25859 efectivamente responde a la infección con hongos, serían:

1. 25869p:3XFLAG:ZmMRP1. En respuesta a la infección, las células transgénicas expresarán el ZmMRP-1, que entrará en el núcleo y causará la muerte celular.
2. 25869p:ZmMRP-1:GR. En respuesta a la infección, las células transgénicas expresarán el ZmMRP-1 unido al receptor de glucocorticoides, lo que impide su entrada en el núcleo en ausencia de dexametasona.

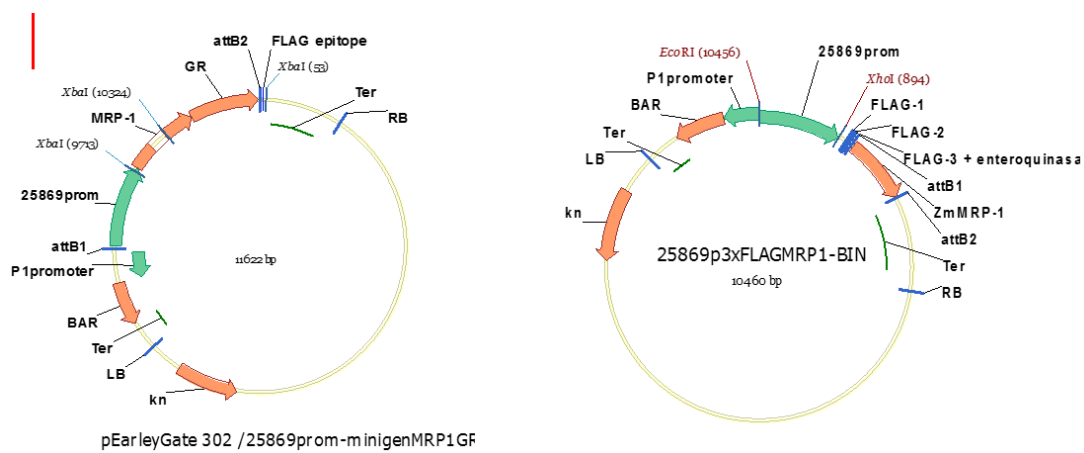


Figura 17. Vectores finales de transformación.

Los vectores se utilizaron entonces para transformar *Agrobacterium* por electroporación. Cultivos líquidos iniciados con una única colonia de *Agrobacterium* fueron utilizados para transformar las plantas.

Obtención de las plantas transgénicas

Los vectores construidos se utilizaron para transformar plantas sanas de *Arabidopsis* que ya eran homocigotas para una construcción ZmTCRR1prom:GUS (Muñiz et al., 2010). De esta forma, cuando se infecte a la planta con el hongo, se activarán los mecanismos de defensa, y se inducirá la expresión del promotor, con el resultado comentado en el apartado anterior. Si se trata del vector 3XFLAG, ZmMRP-1 entre inducirá la expresión de ZmTCRR1, y se verá señal de GUS. Si, por el contrario, se trata del vector MRP-1:GR, sólo si lleva dexametasona ocurrirá lo anterior.

Las semillas obtenidas de la transformación de *Arabidopsis* con *Agrobacterium* se pusieron en una bandeja con tierra de semillero y vermiculita, y las plántulas se rociaron con herbicida para poder seleccionar las transgénicas.

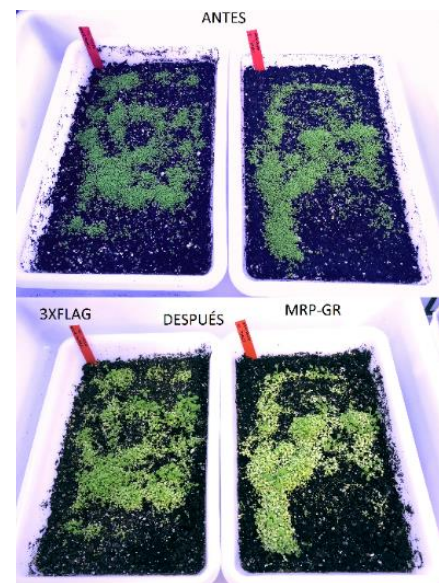


Figura 18. Antes y después del herbicida.

En la Figura 18 se ven los efectos de antes y después del herbicida en las plantas, con ambos vectores obtuvimos un número razonable (1-5% del total de plántulas) de eventos transgénicos. En el caso del vector 25869p:3XFLAG:MRP1, este resultado es inesperado y sugiere que el promotor 25869 es más silencioso, en ausencia de estímulos inductores, de lo que podríamos pensar a partir de los resultados discutidos anteriormente.

40 de las plantas resistentes se trasplantaron a otras bandejas para que terminen su ciclo y así obtener semillas T2. En el caso de las plantas que llevan 25869p:3XFLAG:MRP1 observamos que algunas hojas se volvían de color blanco, o que la planta moría. El trasplante de la planta de una bandeja a otra supone un estrés que tal vez haya inducido la expresión de ZmMRP-1, provocando la muerte de la hoja o la planta. El efecto fue más acusado en plantas trasplantadas

en una bandeja de alveolos pequeños, donde el estrés hídrico es más difícil de controlar (Figura 19)



Figura 19. Efecto del trasplante en las plantas con el vector 3XFLAG.

Ensayos preliminares en las plantas T1

La presencia del transgen, sugerida por la resistencia mostrada al tratamiento con el herbicida, fue confirmada mediante extracción de DNA genómico y PCR con primers específicos de las construcciones transgénicas. Se procedió entonces a evaluar algunas de las plantas T1 mediante un ensayo de infección y tinción de GUS (Figura 20 y Figura 21). Hojas de roseta fueron cortadas de las plantas y sometidas, en placas de agar, a tratamientos con una solución con PBS, pero sin detergente (mock) y una solución de Fusarium (60 esporas, aproximadamente).

Vector 3XFLAG

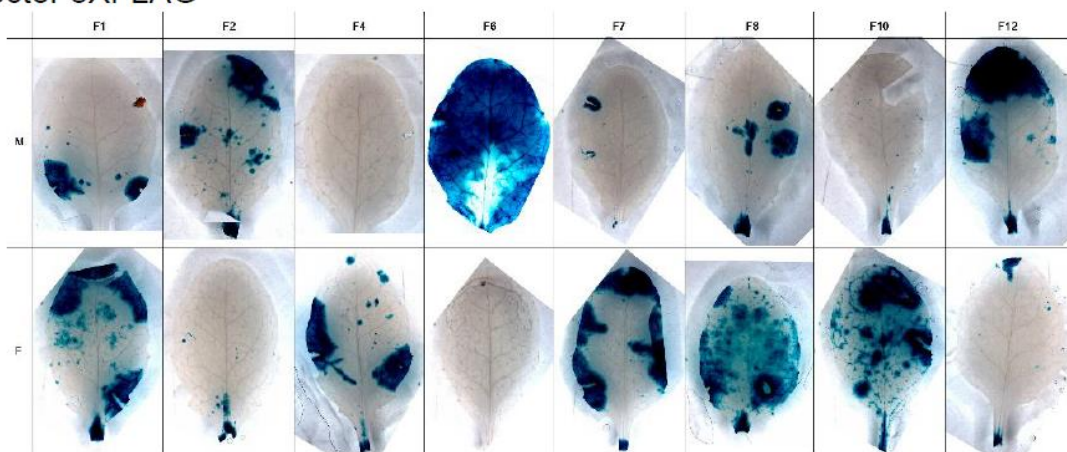


Figura 20. Tinciones de GUS del vector 3XFLAG. M: tratamiento con mock. F: tratamiento con Fusarium. F1-F12: líneas tratadas en este experimento.

Vector MRP:GR

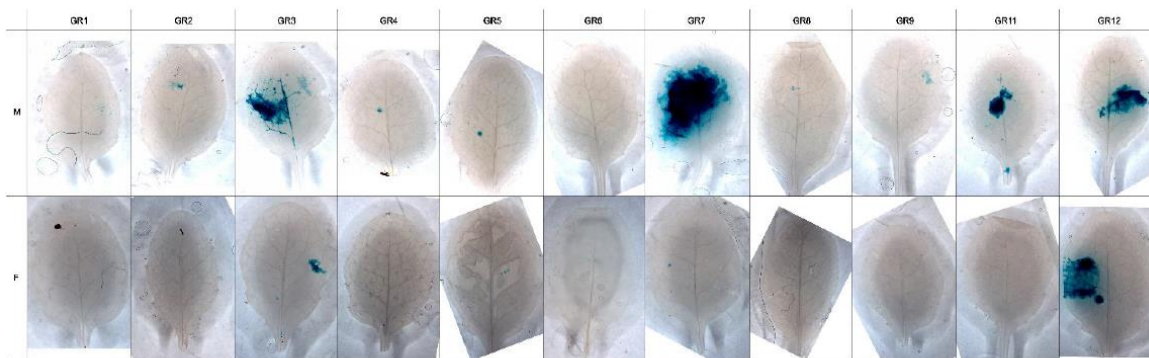


Figura 21. Tinciones de GUS del vector MRP:GR. M: tratamiento con mock. F: tratamiento con *Fusarium*. GR1-GR12: líneas tratadas en este experimento.

Lo más destacable de estas imágenes es que el promotor es muy inducible por herida, como se ve más claro en las plantas del 3XFLAG, que tienen la señal de GUS en prácticamente todas las zonas dañadas. Estas heridas no fueron provocadas sino accidentales, debido a la manipulación con pinzas a la hora de coger una hoja y ponerla en el medio, aunque han resultado informativas.

Por otro lado, el color azul en estas tinciones es mucho más intenso que en las anteriores, puesto que en este caso no es GUS unido directamente al promotor, sino que se encuentra bajo el control de un promotor muy inducible por MRP-1, por lo que se ejerce un efecto multiplicador, una pequeña cantidad de ZmMRP-1 puede producir una gran inducción del promotor ZmTCRR-1.

Sin embargo, en las plantas que tienen el GR la señal está localizada en la zona donde se puso la gota, puesto que además es la única zona donde se puso la dexametasona, así que sería la única zona en la hoja donde podría funcionar el promotor ZmTCRR1, de acuerdo con el funcionamiento del mecanismo. De nuevo, los tratamientos con hongos no resultan informativos debido a la inconsistencia de las infecciones experimentales y a que en este caso las heridas y las infecciones accidentales (el material procede de tierra) podrían enmascarar los resultados.

En cualquier caso, el material parece contener construcciones funcionales de los elementos que queríamos introducir y será útil para testar el efecto de las infecciones (esta vez con hongos patógenos de *Arabidopsis*) una vez dispongamos de plantas T2 crecidas en un ambiente estéri.

Conclusiones:

Se ha visto que el promotor tiene una cierta inducción por la infección de hongos, aunque no podemos llegar a una conclusión fiable debido a que los hongos empleados no son patógenos naturales de *Arabidopsis*. Sí que se ha notado que es inducible por situaciones de estrés, tales como la anoxia o la herida.

Por otro lado, la expresión del factor transcripcional ZmMRP-1 es posible bajo el control de este promotor, pues, aunque las plantas que llevan la construcción 3XFLAG han sufrido más daños y han sobrevivido menos que aquellas que tienen el GR, sí que hemos obtenido plantas sanas.

La falta de material para analizar y el hecho de que sea una T1 no nos permite llegar a una conclusión fiable del comportamiento del promotor, porque no hemos podido hacer los análisis requeridos, como extracción de RNA, o ensayos de infección y tinciones para GUS con los hongos apropiados. En cualquier caso, el material generado será útil para llevar a cabo estos análisis en futuros trabajos.

Conclusions:

It has been seen that the promoter has some induction by fungal infection, although we can not come to a reliable conclusion because the fungi employed are not natural pathogens of *Arabidopsis*. Yet it has been noted that it is inducible by stress situations, such as anoxia or injury.

On the other hand, it has been shown that the expression of the transcription factor ZmMRP-1 is possible under the control of this promoter since, although the plants bearing the 3XFLAG construct have suffered more damage and have survived less than those with GR, we have obtained healthy plants.

The lack of material to analyze and the fact that it is a T1 does not allow us to arrive at a reliable conclusion of the behavior of the promoter, because we have not been able to do the required analyzes, like RNA extraction, or tests of infection and staining for GUS with the appropriate

fungi. The biological material we have produced, however, will be valuable to perform those analysis in future works.

Bibliografía

Birkenbihl R.P., Diezel C., and Somssich I.E., 2012. Arabidopsis WRKY33 Is a Key Transcriptional Regulator of Hormonal and Metabolic Responses toward Botrytis cinerea Infection. *Plant Physiology*, Vol. 159, pp. 266–285.

Chen J., Zeng B., Zhang M., Shaojun Xie, Gaokui Wang, et al. 2014. Dynamic Transcriptome Landscape of Maize Embryo and Endosperm Development. *Plant Physiology*, Vol. 166, pp. 252–264.

Chua NH., Takashi Aoyama, 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, 11(3), 605-612. Nelson PE. 1992. Taxonomy and biology of Fusarium moniliforme. *Mycopathologia*. Feb;117(1-2):29-36.

Dangl, J.L. et al. (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341, 746–751.

Gómez E., Royo J., Muñoz L. M., Sellam O., Paul W. et al. 2009. The Maize Transcription Factor Myb-Related Protein-1 Is a Key Regulator of the Differentiation of Transfer Cells. *The Plant Cell*, Vol. 21: 2022–2035.

Hanhong Bae, Moon S. Kim, Sicher R. C., Hyeun-Jong Bae, and Bailey B. A., 2006. Necrosis- and Ethylene-Inducing Peptide from Fusarium oxysporum Induces a Complex Cascade of Transcripts Associated with Signal Transduction and Cell Death in Arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 141, pp. 1056–1067.

Klich MA. 2007. Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*. 6: 713-22.

Landy A., 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*.58:913-49.

Mauch F., 2013. Staining of Arabidopsis thaliana leaves with trypan blue protocol. *Mauch's Group*.

Miyakawa T., Ken-ichi Hatano, Yumiko Miyauchi, You-ichi Suwa, Yoriko Sawano et al. 2014. A Secreted Protein with Plant-Specific Cysteine-Rich Motif Functions as a Mannose-Binding Lectin That Exhibits Antifungal Activity. *Plant Physiology*, Vol. 166, pp. 766–778.

Muñoz L. M., Royo J, Gómez E., Baudot G., Paul W. et al. 2010. Atypical response regulators expressed in the maize endosperm transfer cells link canonical two component systems and seed biology *BMC Plant Biology*, 10:84

Muñoz L. M., Royo J, Gómez E., Barrero C., Hueros G. et al. 2006. The maize transfer cell-specific type-A response regulator ZmTCRR-1 appears to be involved in intercellular signalling. *The Plant Journal* 48, 17–27. 30

Park JY., Jianming Jin, Yin-Won Lee, Seogchan Kang, and Yong-Hwan Lee, 2009. Rice Blast Fungus (*Magnaporthe oryzae*) Infects Arabidopsis via a Mechanism Distinct from That Required for the Infection of Rice. *Plant Physiology*, January, Vol. 149, pp. 474–486.

Piquerez, S.J.M. et al. (2014) Improving crop disease resistance: lessons from research on Arabidopsis and tomato. *Front. Plant Science*. 5, 671–23.

Urban M., Danielsy S., Mottz E. and Hammond-Kosack K., 2002. Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant Journal* 32, 961–973.

Van Wees S.C.M., Hur-Song Chang, Tong Zhu, and Glazebrook J., 2003. Characterization of the Early Response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* Infection Using Expression Profiling. *Plant Physiology*. Vol. 132

Worden, A., 2009. DNA Extraction-CTAB Method. *Worden Lab*.

Zhan J., Dhiraj Thakare, Chuang Ma, Alan Lloyd, Neesha M. et al. 2015. RNA Sequencing of Laser-Capture Microdissected Compartments of the Maize Kernel Identifies Regulatory Modules Associated with Endosperm Cell Differentiation. *The Plant Cell*, Vol. 27: 513–531

