



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA

**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA
PROTEÍNA INDUCTORA DE LA DEFENSA AsES Y ESTUDIO
DE SU EFECTO EN LA ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD
ANTIVIRAL EN PLANTAS”**

Tesis doctoral

Lic. María del Pilar Caro

- 2019 -



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano

Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra

Dra. María Antonieta Gordillo

Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga

Sr. Mario Rodríguez

Sr. Joaquín Hernán Vargas

Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez

Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Inés Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución nº: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución nº: Resolución 750- CONEAU -13

Director:

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora:

Dra. Lucia Claps

Comité Académico:

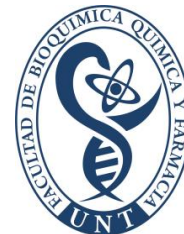
Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PROTEÍNA
INDUCTORA DE LA DEFENSA AsES Y ESTUDIO DE SU EFECTO EN LA
ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD ANTIVIRAL EN PLANTAS”**

TESISTA

Lic. María del Pilar Caro

DIRECTOR

Dr. Juan Carlos Díaz-Ricci

CODIRECTOR

Dr. Sebastián Asurmendi

COMISION DE SUPERVISION

Dra. Nadia Regina Chalfoun

Dr. Sergio Miguel Salazar

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj” de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT) e Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) y en el Instituto de Biotecnología – CICVyA – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA Castelar.

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) e INTA.



RESUMEN

Las plantas son constantemente desafiadas al ataque de patógenos. Para defenderse, cuentan con un sistema inmune innato, robusto y de amplio espectro que las protege contra la invasión de microbios. La primera línea de este sistema de defensa depende de la detección de inductores microbianos que inducen una cascada de respuestas que culminan restringiendo el avance del patógeno y evitando la enfermedad.

AsES (*Acremonium strictum* Elicitor *Subtilisin*) es una proteína purificada a partir del sobrenadante de *Acremonium strictum*, capaz de inducir una respuesta de defensa en plantas de frutilla y *Arabidopsis* y generar protección frente a patógenos hemibiotróficos y necrótrofos como *Colletotrichum acutatum* y *Botrytis cinerea* respectivamente. A su vez, plantas de frutilla tratadas con AsES muestran la activación de una cascada de eventos intervinientes en la respuesta de defensa, por ej., influjo de calcio, estallido oxidativo, HR, refuerzo de la pared celular por deposición de callosa y lignina y acumulación de AS, sobreexpresión de genes de defensa, entre otros.

El objetivo de la presente tesis doctoral consistió en la obtención de la proteína AsES de forma recombinante, en la determinación del requerimiento de la actividad enzimática en la inducción de la respuesta de defensa y en la profundización del mecanismo de acción por el cual AsES es percibida en la planta. Asimismo, se estudió el rol de la proteína AsES en la modulación de inmunidad antiviral en plantas.

Los resultados obtenidos mostraron que la proteína AsES recombinante es capaz de inducir una respuesta de defensa similar a la de la proteína AsES nativa, obtenida a partir del sobrenadante del hongo *A. strictum*. La actividad enzimática no está implicada en la defensa, ya que tanto la proteína AsES recombinante inhibida en su actividad enzimática por el agregado de un inhibidor específico irreversible, como una versión mutante, inactivada enzimáticamente por mutagénesis sitio-dirigida, fueron capaces de inducir sobreexpresión de genes asociados a la defensa (*PR1*, *WRKY70*, *ERF6*) y proteger frente a *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis*. Además, péptidos individuales de diferentes epitopes de AsES no fueron capaces de reproducir estos resultados. La pérdida de protección frente a *B. cinerea* observada a todos los tiempos estudiados en una mutante *knock-out* para del co-receptor *bak1.5* así como la inhibición en el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* y la sobreexpresión de genes indicadores de tipo PTI (*PAMP-triggered immunity*) sugieren que AsES se trata de un inductor de tipo PAMP, que es percibido por un receptor a nivel de membrana. Por otra parte, se observó una reducción marcada y significativa en la carga viral de plantas de *Arabidopsis* tratadas con AsES e infectadas con TMV-Cg. Resultados similares se observaron en plantas de *Nicotiana tabacum* en donde se evidenció además una reducción en el movimiento célula a célula y un retraso en el movimiento sistémico.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen al conocimiento del mecanismo de acción de la proteína AsES y de su naturaleza. Además, el efecto de AsES en la activación de la inmunidad antiviral contribuirá al desarrollo de estrategias de manejo fitosanitario sostenible en diferentes cultivos de interés agronómico.

Palabras clave: AsES recombinante, inductor de defensa, inmunidad antiviral

ABSTRACT

Plants are constantly threatened by pathogens. To defend themselves, they have an innate, robust and broad-spectrum immune system that protects them against the invasion of microbes. The first tier of this defense system depends on the detection of microbial elicitors that induce a cascade of responses that culminate restricting the pathogen and avoiding therefore the disease.

AsES (*Acremonium strictum* Elicitor Subtilisin) is a protein purified from the supernatant of *Acremonium strictum*, capable of inducing a defense response in strawberry and Arabidopsis and generating protection against hemibiotrophic and necrotrophic pathogens such as *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* respectively. Also, strawberry plants treated with AsES showed a cascade of different events related to defense responses, such as calcium influx, oxidative burst, HR, cell wall reinforcement by callose and lignin deposition and accumulation of AS, overexpression of defense genes, etc.

The aim of this work was to obtain AsES protein recombinantly, to determine the role of the enzymatic activity in the induction of the defense response and to deeply study the mechanism of action by which AsES is perceived. Likewise, the role of AsES in the modulation of the antiviral immunity in plants was also studied.

Results showed that recombinant AsES protein was able to induce a defense response similar to what was previously observed for native AsES, obtained from *A. strictum* fungus supernatant. Enzyme activity is not involved in defense since both proteins, recombinant AsES inhibited in its enzymatic activity by the addition of a specific irreversible inhibitor, and a mutant version of it, enzymatically inactivated by site-directed mutagenesis, were able to induce overexpression of defense related genes (*PR1*, *WRKY70*, *ERF6*) and protect against *B. cinerea* in Arabidopsis. Individual peptides from different AsES epitopes were not able to reproduce these results. Loss of protection against *B. cinerea* in a knockout mutant for the co-receptor bak1.5 as well as seedling growth inhibition and the overexpression of PTI-marker genes (PAMP-triggered immunity); suggest that AsES is a PAMP-like elicitor, being perceived by a receptor at the membrane level. A significant reduction in the viral titer was also observed in Arabidopsis treated plants and infected with TMV-Cg. Similar results were observed in *Nicotiana tabacum* plants which also showed a reduction in cell to cell movement and a delay in systemic movement.

The results obtained in this thesis contribute to the understanding of the mechanism of action of AsES and its nature. Also, AsES' effect on the activation of plant antiviral immunity will allow the development of sustainable phytosanitary strategies in agronomical important crops.

Key words: Recombinant AsES, plant defense, antiviral immunity.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las instituciones y personas que directa o indirectamente colaboraron con la realización de este trabajo:

A CONICET y al Programa BEC.AR por las becas otorgadas, financiación sin la cual la realización de este trabajo hubiera sido un anhelo imposible.

A INSIBIO-CONICET-UNT, a INTA y a los directivos de ambas instituciones, por abrirme las puertas y generar en mí un profundo sentido de pertenencia.

A mi director, Juan Carlos, por confiar en mí desde mis inicios, por incentivar mi pensamiento crítico, por apoyar y alentar mis ideas. Por estar siempre presente y dispuesto y compartir su valiosa experiencia y conocimiento, aun en los momentos más sobrecargados de trabajo.

A mi co-director, Sebastián A., por aceptarme con tanta calidez desde el primer día y abrirme las puertas a su grupo de investigación. Por su generosidad, por las fructíferas discusiones, por motivar mi creatividad científica y por hacerme valorar la importancia del trabajo en equipo.

A Cyril y a todo su equipo de trabajo, por haberme hecho sentir como en casa y hacer de mi estancia en el TSL una experiencia invaluable. A Nick, por su dedicación y su gran aporte en la realización de este trabajo.

A todo el grupo "Frutilla" de INSIBIO. En especial a Gus Martinez, Marisa y Ramiro por compartir tantas charlas y gratos momentos.

Al grupo "Resistómica" de INTA-Castelar, por hacerme sentir un miembro más del grupo. En especial a Andrea, Gaby y Mel por su amistad. A Laura R. por facilitar mi trabajo.

A los miembros de la comisión de seguimiento, Nadia y Sergio, por los aportes realizados a este trabajo.

A mi compañero de vida, Sebastián. Por su apoyo incondicional y sus constantes palabras de aliento. Te admiro profundamente. ¡Gracias por iluminar mis días!

A mis padres por apoyar mi continua formación académica. Todo lo que soy se los debo a ustedes. A mis hermanos Ignacio y Roberto por estar siempre presentes.

A todos los que olvidé mencionar y que de una u otra manera me acompañaron en este largo proceso... A todos mi mayor reconocimiento y gratitud ¡GRACIAS!

Publicaciones realizadas durante el período de tesis doctoral:

- **“TMV systemic movement requires negative modulation of the immune system”**. Venturuzzi A., Rodríguez M. C., Conti G., Leone M., Caro M. del P., Zavallo D., Asurmendi S. (2019). Manuscrito enviado para publicación a Nature Plants.
- **“AsES, a fungal subtilase protein, elicits a PTI-like defense response in Arabidopsis thaliana plants independently of its enzymatic activity”**. Caro M. del P., Holton N., Conti G., Venturuzzi A., Martinez-Zamora M.G., Zipfel C., Asurmendi S., Diaz-Ricci J.C. (2019). Manuscrito enviado para publicación a Mol. Plant Pathology.
- **“Development of PSP1, a biostimulant based on the elicitor AsES for disease management of monocot and dicot crops”**. Chalfoun N.R., Durman S.B., Budeguer F., Caro M. del P., Bertani R.P., Di-Peto P. d. I. A., Stenglein S.A., Filippone M.P., Moretti E.R., Díaz-Ricci J.C., Welin B, Castagnaro A.P. (2018). Frontiers in Plant Science. doi.org/10.3389/fpls.2018.00763.
- **“Integrating transcriptomic and metabolomic analysis to understand natural leaf senescence in sunflower”**. Moschen S., Bengoa, S., Di Rienzo, J., Caro M. del P., Tohge, T., Watanabe M., Hollmann, J., González, S., Rivarola, M., García-García F., Dopazo J., Hopp H.E., Hoefgen R., Fernie, A., Paniego N., Fernández P and Heinz, R.A. (2015). Plant Biotechnology Journal. doi: 10.1111/pbi.12422

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Desafío de la agricultura en el siglo XXI	3
1.2 La inmunidad vegetal.....	3
1.2.1 <i>Inmunidad inducida por PAMPs y su reconocimiento</i>	5
1.2.1.1 <i>La flagelina y su percepción a través de su receptor FLS2 como modelo de estudio</i>	7
1.2.2 <i>Inmunidad inducida por efectores y su reconocimiento</i>	8
1.2.3 <i>Serin proteasas de tipo subtilisina implicadas en defensa vegetal</i>	9
1.3 Mecanismos de reconocimiento de patógenos virales.....	11
1.3.1 <i>El rol del silenciamiento génico como mecanismo de defensa en plantas</i>	14
1.3.2 <i>Supresores virales del silenciamiento del ARN</i>	16
1.3.3 <i>El impacto de las enfermedades virales en los cultivos de interés agronómico</i>	16
1.3.4 <i>Estrategias empleadas para el control de la virosis</i>	17
1.3.5 <i>Características generales del ciclo de infección viral en hospedantes susceptibles</i>	19
1.4 Clasificación de los virus.....	20
1.4.1 <i>El género Tobamovirus</i>	21
1.5 Antecedentes que enmarcan el trabajo de tesis	23
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 Material biológico y condiciones de crecimiento	30
3.2 Técnicas generales de ingeniería genética.....	31
3.2.1 <i>Procedimientos de clonado</i>	31
3.2.2 <i>Construcciones empleando el sistema de clonado Gateway</i>	32
3.3 Mutagénesis sitio-dirigida.....	34
3.4 Ensayos de expresión heteróloga.....	35
3.4.1 <i>En sistema procariota: E. coli</i>	35
3.4.2 <i>En sistema eucariota: N. benthamiana</i>	35
3.5 Análisis de proteínas.....	36
3.5.1 <i>Extracción de proteínas totales</i>	36
3.5.1.1 <i>De E. coli</i>	36
3.5.1.2 <i>De N. benthamiana</i>	37
3.5.2 <i>Extracción de proteínas periplásmicas</i>	37
3.5.3 <i>Extracción de proteínas del apoplasto</i>	37
3.6 Identificación de proteínas.....	37
3.6.1 <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	37
3.6.2 <i>Electrotransferencia</i>	38
3.6.3 <i>Ensayos de western blot</i>	38
3.6.3.1 <i>Anticuerpos utilizados</i>	39

3.6.4 Tinción con azul de Coomassie.....	39
3.7 Cuantificación de proteínas.....	40
3.8 Purificación de proteínas.....	40
3.9 Almacenamiento de las muestras	41
3.10 Determinación de actividad proteolítica.....	41
3.11 Ensayos de qPCR.....	42
3.11.1 Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc para qPCR.....	42
3.11.2 Diseño de oligonucleótidos para qPCR	42
3.11.3 Realización de qPCR, obtención y análisis de datos de expresión	43
3.12 Ensayos de resistencia inducida (RI) frente a infecciones.....	43
3.12.1 Tratamiento con el inductor-Infeción de Arabidopsis con <i>B. cinerea</i>	43
3.12.2 Tratamiento con el inductor -Infeción de Arabidopsis con el virus TMV-Cg.....	43
3.12.2.1 Cuantificación del título viral de TMV-Cg.....	44
3.12.3 Tratamiento con el inductor -Infeción de <i>N. benthamiana</i> con el virus TMV.....	44
3.13 Medición del movimiento célula a célula del virus TMV.....	45
3.14 Evaluación de caracteres fenotípicos.....	46
3.14.1 Medición de inhibición del crecimiento en plántulas de <i>Arabidopsis</i>	46
4. RESULTADOS	48
4.1 Expresión heteróloga de AsES en <i>E. coli</i>	48
4.1.1 Elección del vector y cepa bacteriana para expresión.....	49
4.1.2 Optimización del proceso de expresión y purificación.....	53
4.2 Efecto del uso de un inhibidor de proteasas en la degradación de AsES	57
4.3 Expresión de AsES en plantas de <i>N. benthamiana</i>	58
4.4 Obtención de mutantes de AsES afectadas en el sitio activo.....	60
4.5 Determinación de la actividad proteolítica tipo subtilisina.....	61
4.6 Obtención de péptidos de AsES	62
4.7 Validación funcional de la actividad inductora de la defensa.....	65
4.7.1 Estudio de la protección frente a <i>B. cinerea</i> inducida por la proteína AsES recombinante y sus variantes inactivas en plantas de <i>Arabidopsis</i>	65
4.7.2 Estudio de la activación de genes asociados a defensa en plantas de <i>Arabidopsis</i>	67
4.7.3 Estudio de la expresión de genes marcadores de tipo PTI.....	70
4.7.4 Estudio de la inhibición del crecimiento en plántulas de <i>Arabidopsis</i> como respuesta a la activación de las defensas.....	72
4.7.5 Estudio de la participación del co-receptor BAK1 en la respuesta de defensa inducida por AsES	74
4.7.6 Evaluación de la actividad inductora de fragmentos de AsES.....	75

4.8 Estudio del efecto de AsES en las infecciones virales	77
4.8.1 Determinación del nivel de acumulación viral en plantas de <i>Arabidopsis</i> tratadas con AsES	78
4.8.2 Caracterización de la actividad antiviral de AsES en el sistema <i>N. benthamiana</i> -TMV-GFP.....	79
4.8.3 Análisis del efecto de AsES en el movimiento de las partículas virales de TMV	80
5. DISCUSIÓN.....	84
5.1 Obtención recombinante de la proteína AsES	84
5.1.1 Caracterización del proceso de maduración de la proteína AsES....	86
5.1.2 Análisis de la estabilidad de la proteína AsES recombinante.....	88
5.1.3 Expresión transitoria en plantas de <i>N. benthamiana</i>	89
5.2 Validación funcional de la actividad inductora de AsES.....	90
5.2.1 Activación de genes asociados a la defensa.....	93
5.2.2 Implicancia de la actividad enzimática en la inducción de la respuesta de defensa	94
5.2.3 ¿Es AsES un PAMP o un efector?	95
5.2.4 Búsqueda de un epítoto funcional.....	96
5.3 Activación de la inmunidad antiviral inducida por AsES.....	97
5.3.1 Inhibición del movimiento célula a célula y del movimiento sistémico.....	100
6. CONCLUSIONES.....	103
7. BIBLIOGRAFÍA	106

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADNc	Ácido deoxiribonucleico copia
AJ	Ácido jasmónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico doble cadena
AS	Ácido salicílico
CP	Proteína de cápside viral (del inglés, coat protein)
dpt	Días posteriores al tratamiento
ET	Etileno
ETI	Inmunidad desencadenada por efector (del inglés, effector triggered immunity)
ETS	Susceptibilidad desencadenada por un efector (del inglés, effector triggered Susceptibility)
flg22	Péptido sintético de 22 aminoácidos, que forma parte de la proteína flagelina
fso	Fluido de shock osmótico
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, Green Fluorescent Protein)
hpi	Horas posteriores a la infección
HR	Respuesta hipersensible (del inglés, <i>hypersensitive response</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
lfa	Lavado de fluido apoplástico
ON	Incubación overnight
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés, <i>open reading frame</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Plasmodesmos
PS	Péptido señal
PTI	Inmunidad desencadenada por PAMPs (del inglés, <i>PAMP triggered immunity</i>)
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistencia inducida
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, <i>reactive oxygen species</i>)
SAR	Resistencia sistémica adquirida (del inglés, <i>systemic acquired resistance</i>)
SMC	Sitio de múltiple clonado
TMV	Tobaco mosaic virus.
TMV-Cg	Crucifer infecting Tobacco Mosaic Virus
viARNs	siARNs de origen viral
VSRs	supresores de silenciamiento de ARN de origen viral
WT	Plantas salvajes (del inglés, wild type)
μ m	Micrómetro
μ M	Micromolar

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desafío de la agricultura en el siglo XXI

En el siglo XIX, el economista Thomas Malthus contrastó el crecimiento exponencial de la población humana con el crecimiento lineal de la producción alimentaria y postuló la idea de que en algún momento, se alcanzaría un máximo en la capacidad productiva en la tierra, que derivaría en escasez de alimentos (Malthus, 1807). La contraparte a esta postura fué que con la ayuda de los avances tecnológicos, se podría “producir más con menos”. Así, la llamada revolución verde, mediante la creación de variedades de cultivo genéticamente mejoradas y en combinación con perfeccionamientos en la aplicación de prácticas agronómicas, produjo un incremento en la productividad agrícola impensado hasta ese momento (Khush, 2001). Sin embargo, aún es necesario duplicar la producción de cultivos para satisfacer la demanda global de calorías proyectada en 2050 (Tilman *et al.*, 2011). En este sentido, las tecnologías a utilizar en el futuro inmediato deben contemplar un uso más eficiente de nutrientes así como minimizar el desmonte de la tierra y el impacto negativo al medioambiente. Las nuevas herramientas biotecnológicas disponibles, que hacen uso del propio sistema inmune de la planta, constituyen un camino prometedor hacia un incremento de la producción de manera sostenible, sin daños para el medio ambiente.

1.2 La inmunidad vegetal

Las plantas al igual que los animales, han desarrollado complejos sistemas de percepción para discriminar lo propio de lo ajeno y son capaces de activar complejas respuestas de defensa que se establecen en múltiples niveles (Muthamilarasan y Prasad, 2013). Para evitar/restringir el ataque de potenciales patógenos, las plantas cuentan como primera medida, con barreras físicas y químicas preformadas como las paredes celulares, las cutículas y los compuestos antimicrobianos superficiales (Nürnberg *et al.*, 2004; Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Zipfel, 2014). Una vez que el/los potenciales patógenos logran traspasar estas barreras primarias y dado que no tienen un sistema inmune humoral, dependen de la capacidad de cada célula individual para iniciar una respuesta inmunitaria innata. Para ello, cuentan con un sistema de

vigilancia de varios niveles, en donde el primero, utiliza receptores localizados en la membrana plasmática y el segundo, receptores intracelulares (Couto y Zipfel, 2016).

En la superficie celular, las quinasas receptoras (RLK, del inglés, *Receptor Like Kinase*) y las proteínas de tipo receptoras (RLP, del inglés, *Receptor Like Protein*) funcionan como receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) para percibir moléculas microbianas características, conocidas clásicamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), o patrones moleculares asociados a daños derivados del huésped (DAMPs, del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*) (Böhm *et al.*, 2014; Zipfel, 2014). Dada la diversidad y la naturaleza conservada de los PAMP, la inmunidad activada por PRR (PTI, del inglés *PAMP-Triggered Immunity*) repele efectivamente la mayoría de los patógenos no adaptados, al tiempo que contribuye a la inmunidad basal durante la infección. A su vez, algunos patógenos codifican para proteínas de virulencia que bloquean la señalización desencadenada por PAMPs. Este evento es denominado susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, del inglés, *Effector-Triggered Susceptibility*). Por otra parte, las plantas también pueden disponer de proteínas intracelulares con dominio de unión a nucleótidos y de repeticiones ricas en leucinas, (NB-LLR, del inglés *Nucleotide-binding site–Leucine-rich Repeat*), que representan un segundo grupo de receptores inmunes que está normalmente asociado al reconocimiento de efectores de virulencia secretados por patógenos y desencadenan producto de dicho reconocimiento, una respuesta conocida como inmunidad inducida por efectores (ETI, del inglés, *Effector-Triggered Immunity*) (Dangl *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015). Los patógenos que logran adaptarse, desarrollan efectores para suprimir la inmunidad del huésped y/o manipular el metabolismo del mismo para la virulencia. A su vez, el reconocimiento por parte de los NLR constituye un paso evolutivo superior en beneficio del huésped, en lo que representa una verdadera carrera armamentística evolutiva entre plantas y patógenos (Win *et al.*, 2012). Estos eventos, suelen ser representados por un modelo denominado “zig-zag” (Figura 1).

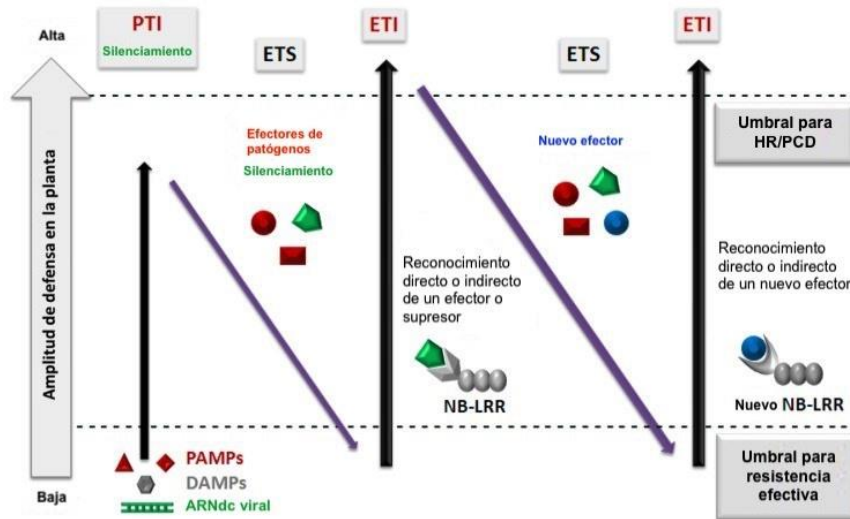


Figura 1 | Esquema zig-zag. Representa la amplitud de defensa, donde se esquematiza que la resistencia/susceptibilidad es proporcional a $[PTI - ETS + ETI]$. En la primera etapa, la planta detecta la presencia de PAMPs y activa PTI. A su vez, en la segunda etapa, el patógeno genera efectores que interfieren con PTI, dando lugar a ETS. Seguidamente, los efectores son reconocidos por proteínas de tipo NB-LRR activando ETI, una versión amplificada de PTI que generalmente supera el umbral de respuesta hipersensible (HR). Por otra parte, aquellos patógenos que evolutivamente adquirieron nuevos efectores son capaces de suprimir ETI y las plantas que contengan nuevas proteínas NB-LRR capaces de reconocerlos serán seleccionadas, provocando nuevamente ETI. Adaptado de Jones y Dangl (2006).

1.2.1 Inmunidad inducida por PAMPs y su reconocimiento

Los PAMPs son usualmente definidos como moléculas altamente conservadas y de amplio espectro que resultan indispensables para el *fitness* y supervivencia microbianos (Zipfel y Robatzek, 2010; Thomma *et al.*, 2011). Este término, sin embargo contempla la presencia de moléculas tanto en sistemas patogénicos como no-patogénicos lo que llevó a la introducción del nuevo término MAMP (del inglés, *Microbe-Associated Molecular Pattern*) (Ausubel, 2005).

Ejemplos de MAMPs incluyen la quitina de hongos, los glucanos β lineales de oomicetes, la flagelina, el factor de elongación Tu (EF-Tu), los peptidoglicanos de bacterias (PGNS), ciertas proteínas fúngicas, entre otros (Boutrot y Zipfel, 2017). Además de los MAMPs, existe otra clase de moléculas endógenas denominadas DAMPs, presentes en el espacio apoplástico y que surgen en respuesta ante una infección o una herida como por ejemplo, péptidos de plantas o restos de pared celular (Boller y Felix, 2009).

Los receptores ubicados a nivel de membrana celular (PRRs), que reconocen tanto PAMPs como DAMPs, se caracterizan por poseer a nivel estructural un ectodominio potencialmente involucrado en la unión del ligando, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular. Este último, a su vez puede ser quinasa y se denomina en ese caso RLK o bien, puede carecer de un dominio de quinasa o de cualquier otro dominio de señal intracelular reconocible y se denomina en ese caso RLP. Se cree que los RLP dependen de las quinasas receptoras reguladoras para transducir la percepción del ligando en señalización intracelular (Gust y Felix, 2014). A su vez los PRRs de plantas, pueden subdividirse en función de la naturaleza de su ectodominio de unión al ligando. Los PRRs que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés, *Leucine-Rich Repeats*) se unen preferentemente a proteínas o péptidos, como la flagelina bacteriana o el factor de alargamiento Tu (EF-Tu), o péptidos a endógenos (AtPep) (Böhm *et al.*, 2014; Zipfel, 2014). Los PRR que contienen motivos de lisina (LysM) se unen a ligandos basados en carbohidratos, como la quitina fúngica o el peptidoglucano bacteriano (Böhm *et al.*, 2014; Zipfel, 2014). Uno de los receptores más estudiados en *Arabidopsis thaliana*, de ahora en más referida como Arabidopsis, es el FLS2, encargado de reconocer la flagelina presente en las bacterias (Gómez-Gómez y Boller, 2000).

Una vez que se efectúa el reconocimiento ligando-receptor y seguido de la activación del complejo PRR, se inicia una cascada de señalización en minutos para promover respuestas de defensa locales y sistémicas en la planta y que pueden durar hasta varios días (Boller y Felix, 2009). Cambios rápidos en el flujo de iones en la membrana plasmática, acompañados por el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, y la producción de especies reactivas de oxígeno extracelular (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) se encuentran entre las primeras respuestas registradas después de la percepción de un PAMP o un DAMP. A su vez, las cascadas de activación de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} (CDPK, del inglés, *Ca²⁺ Dependent Protein Kinase*) y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), transmiten la señal inmune al núcleo, lo que resulta en una reprogramación transcripcional para establecer PTI (Boller y Felix, 2009; Seybold *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015) (Figura 2).

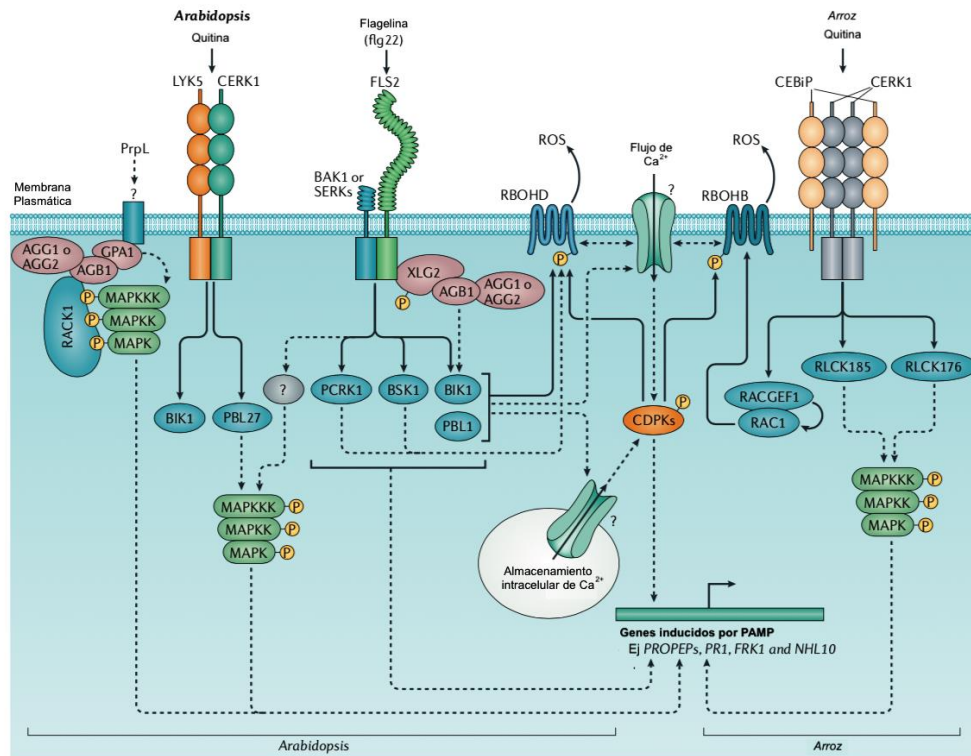


Figura 2 | Red de señalización temprana de inmunidad activada por PRRs. La percepción del/los PAMP por parte de los PRR induce una señal inmune que se ramifica inmediatamente corriente abajo del complejo PRR, como la producción de ROS y la activación de MAPK. Los PRR se basan en distintos mecanismos para activar tales vías. Adaptado de Couto y Zipfel (2016).

1.2.1.1 La flagelina y su percepción a través de su receptor FLS2 como modelo de estudio

La flagelina es la principal subunidad proteica que constituye el flagelo bacteriano y la región más conservada del polipéptido, que mira hacia el interior del tubo flagelar, es reconocida tanto por animales y plantas (Zipfel y Felix, 2005). Interesantemente, los mamíferos detectan una parte específica del dominio D1 de flagelina (Smith *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2004), mientras que muchas especies de plantas reconocen el dominio flg22, que abarca una parte del polipéptido de flagelina denominado "pico" (Felix *et al.*, 1999). Sin embargo, diferentes especies de plantas suelen reconocer a su vez diferentes epitopes de la misma flagelina (Robatzek *et al.*, 2007).

Un receptor de tipo PRR denominado FLS2 (del inglés, *flagellin sensing 2*) y que pertenece a la familia de receptores ricos en leucina o LRR-RLK, reconoce a la región más conservada de la flagelina de eubacterias y al péptido derivado flg22 (Gómez-

Gómez y Boller, 2000; Chinchilla, 2006). La flagelina se une a FLS2 y rápidamente lo induce a interactuar con un co-receptor, también un LRR-RLK, llamado BAK1/SERK3 (del inglés, *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1)-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1*, también llamado *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 3*, SERK3) (Chinchilla et al., 2007; Roux et al., 2011). La interacción entre FLS2 y BAK1 (Schulze et al., 2010) produce fosforilaciones cruzadas, la síntesis de ROS, activación de MAPK y oscilaciones de Ca²⁺ (Boller y Felix, 2009; Roux et al., 2011). La cascada de señalización continúa con una reprogramación transcripcional (Navarro et al., 2004), inducción de la expresión de factores de transcripción y la deposición de calosa para atenuar la entrada del patógeno (Boller y Felix, 2009). A su vez, se ha descrito que el tratamiento con el péptido sintético flg22 conduce a la acumulación de ácido salicílico (AS) como molécula de defensa (Mishina y Zeier, 2007; Tsuda et al., 2008), y que a su vez, en una retroalimentación positiva para amplificar la señal de defensa, el AS potencia la producción de ROS inducida por flg22 (Sato et al., 2010). Todas estas respuestas llevan a un estado incrementado de la defensa en plantas, que culminan en la resistencia a la enfermedad (Zipfel et al., 2004).

1.2.2 Inmunidad inducida por efectores y su reconocimiento

Los efectores son definidos como moléculas derivadas del patógeno que son capaces de alterar la estructura y/o función de la célula hospedero, ya sea facilitando la infección (factores de virulencia o toxinas) o induciendo respuestas de defensa (factores de avirulencia) (Kamoun, 2006).

Cuando las proteínas Avr codificadas por el genoma de los patógenos, son reconocidas directa o indirectamente por proteínas R de la planta, se desencadenan una serie de eventos (ETI) que culminan en la resistencia de la planta frente a la enfermedad (Hulbert et al., 2001). Las proteínas R, constituyen una familia de receptores intracelulares polimórficos (NB-NLR), con dos dominios muy conservados, un dominio involucrado en la unión a nucleótidos y un dominio rico en leucinas involucrado en la interacción proteína-proteína (Marone et al., 2013). La interacción entre las proteínas Avr y las proteínas R, es seguido de un incremento local de la producción de especies reactivas de oxígeno, produciendo entonces un estallido

oxidativo que culmina en algunos casos con muerte celular programada localizada (PCD, del inglés, *Programmed Cell Death*), un fenotipo visible conocido como respuesta hipersensible (HR) en la zona de la invasión, a fin de evitar la dispersión del patógeno (Jones y Dangl, 2006; Cui et al., 2015). Este tipo de reacción, que involucra muerte celular, es característico de muchas interacciones donde la infección no llega a desarrollarse (interacciones incompatibles) (Zurbriggen *et al.*, 2010). Una vez activadas las respuestas de defensa locales, se desencadenan respuestas sistémicas, como la denominada resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés, *Systemic Acquired Resistance*), que deja a los tejidos no infectados en un estado de alerta contra el futuro ataque de patógenos (*priming*) y suele estar asociada con la acumulación de AS tanto en tejidos infectados como no infectados (Fu y Dong, 2013).

1.2.3 Serin proteasas de tipo subtilisina implicadas en defensa vegetal

Las serin proteasas de tipo subtilisina, también llamadas subtilasas, constituyen el grupo más grande de proteasas, estando ampliamente distribuidas en archaea, bacterias y organismos eucariontes, (Siezen *et al.*, 1991; Siezen y Leunissen, 1997). Este tipo de proteínas se caracteriza por una tríada catalítica de los aminoácidos, aspartato, histidina y serina (Dodson y Wlodawer, 1998) y de acuerdo con la clasificación MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), las subtilisinas corresponden a la familia S8, subfamilia S8A (Rawlings, 2006) y pueden ser tanto endo como exopeptidasas. Las subtilasas extracelulares se producen generalmente como precursores inactivos llamados pre-pro-proteínas y están compuestas por un péptido señal, un propéptido N-terminal y un dominio maduro. Los precursores inactivos experimentan, una maduración gradual con regulación precisa de la actividad tanto espacial y temporal, que culmina en una proteína enzimáticamente activa (Khan y James, 2008). El péptido señal media la secreción de la enzima a través de la membrana plasmática y luego es escindido por una señal peptidasa. El pro-péptido N-terminal tiene función dual, en donde generalmente funciona como una chaperona intramolecular para facilitar el correcto plegamiento del dominio maduro y también como un inhibidor potencial de la enzima madura con el objetivo de prevenir la activación prematura de la misma, maximizando así la eficiencia de maduración (Shinde y Thomas, 2011). De hecho, los pro-péptidos son considerados moduladores

post-traduccionales tanto de la estructura como de la función de la proteína (Fu *et al.*, 2000). Los procesos de maduración de algunas subtilasas han sido ampliamente estudiados y caracterizados y se descubrió que ocurren autocatalíticamente (Shinde y Thomas, 2011); sin embargo, dicho proceso de maduración varía ampliamente entre las diferentes subtilasas en términos del cambio estructural que se produce durante la maduración, la dependencia de iones metálicos, etc. (Zhu *et al.*, 2013). En términos generales, el pro-péptido sufre un autoprocesamiento, en donde es primero liberado y luego degradado, dando lugar a la obtención de la proteína madura y activa.

Las subtilasas desempeñan importantes funciones en una variedad de procesos biológicos, que incluyen nutrición, catabolismo de proteínas y activación de zimógenos. En los últimos años, estas proteínas han ganado atención en lo que respecta a su participación en las respuestas a los estreses bióticos y abióticos y, más recientemente, en el reconocimiento de patógenos de plantas y activación del sistema inmune (Figueiredo *et al.*, 2014, 2018; Schaller *et al.*, 2018). Ejemplos de subtilasas vegetales que participan en la defensa de la planta y que requieren la actividad enzimática para ese fin, son: P69, responsable del procesamiento proteolítico de un polipéptido de 18 aminoácidos (aa) derivado de la pro-sistemina (Torneró *et al.*, 1996a) y de LRP, una proteína LRR de plantas de tomate, procesada durante la patogénesis (Torneró *et al.*, 1996b). De manera similar, AtSBT6.1 procesa el pro-péptido del FACTOR DE ALCALINIZACIÓN RÁPIDO 23 (RALF23) que se une a la quinasa del receptor tipo malectina FERONIA (FER) (Stegmann *et al.*, 2017). Estos hallazgos revelan que la modificación postraduccionales de las proteínas del huésped a través del procesamiento proteolítico es un mecanismo ampliamente utilizado para regular la respuesta de defensa de la plantas. En contraste Glyma18g48580, es un subtilasa de soja extracelular que contiene un péptido incorporado de 12 aa (GmSubPep) que tiene un papel metabólico independiente capaz de inducir la expresión de genes de defensa (Pearce *et al.*, 2010). El inductor endógeno, se une a un receptor de membrana que a su vez induce vías de señalización de defensa y amplifica la respuesta inmune innata de la planta, de manera similar a los inductores derivados de patógenos (Pearce *et al.*, 2010).

En las últimas décadas, numerosos reportes han demostrado que los patógenos de plantas también presentan subtilasas que podrían estar involucradas en el

mecanismo del ataque de los mismos. La presencia de serin-proteasas en el secretoma de varios patógenos en situaciones de infección, ha sido ampliamente observada (Xia, 2004). Por ejemplo, en trigo, el patógeno *Fusarium graminearum*, que produce la fusariosis de la espiga (Gottwald *et al.*, 2012), secreta prácticamente durante todo el ciclo de la enfermedad, un arsenal de factores de virulencia, incluidas las subtilasas; éstas últimas con el objeto de romper la membrana celular del huésped durante el transcurso de la infección necrótica (Pekkarinen y Jones, 2003; Walter *et al.*, 2010). Sin embargo, y al mismo tiempo, también se observó una sobreexpresión diferencial de cinco inhibidores de serin proteasas en trigo (Gottwald *et al.*, 2012).

Entre los patógenos que secretan subtilisinas capaces de montar una respuesta de defensa efectiva, se encuentran: *Verticillium lecanii*, un hongo entomopatógeno que produce VIPr1, una subtilasa empleada como agente de control biológico e implicada en la degradación de la cutícula de insectos plaga (Yu *et al.*, 2012) y *Acremonium strictum*, patógeno virulento en determinados cultivares de frutilla que secreta la subtilisina AsES, capaz de gatillar una respuesta de defensa efectiva frente a patógenos necrótros y hemibiótrofos en frutilla y *Arabidopsis* (Chalfoun *et al.*, 2013; Hael-Conrad *et al.*, 2015, 2018) (ver antecedentes que enmarcan el trabajo de tesis).

1.3 Mecanismos de reconocimiento de patógenos virales

Como parásitos obligados con funciones limitadas codificadas por el genoma viral, los virus utilizan ampliamente la maquinaria intracelular del huésped para la replicación de sus genomas, la expresión de genes virales y el establecimiento de la infección. A diferencia de los virus animales, que utilizan receptores de la superficie del huésped y actividades endocíticas para invadir las células huésped, los virus de plantas se transmiten a las células por medio de insectos vectores o por medio de heridas mecánicas. Una vez dentro de las células, las partículas virales, que consisten en ácidos nucleicos encapsulados por la proteína de la cápside (CP, del inglés *Coat Protein*), se desensamblan para liberar el genoma viral e iniciar el ciclo infeccioso, que incluye la expresión y replicación del genoma viral, movimiento célula a célula y de larga distancia de las partículas víricas y/o el genoma viral y la transmisión mediada por vector a nuevos hospedadores (Calil y Fontes, 2017).

En los últimos años, se ha descrito que tanto patógenos virales y no virales inducen respuestas de defensa similares. Así, el modelo zig-zag ha sido extendido al estudio de la interacción entre plantas y patógenos virales (Zvereva y Pooggin, 2012). Se ha demostrado recientemente que las estructuras de ARN de doble cadena (ARNdc), considerados patrones moleculares conservados asociados a la replicación viral (Niehl *et al.*, 2016), son desencadenantes de una respuesta de tipo PTI. A su vez, se demostró que los ARNdc, inducen una cascada de señalización dependiente de BAK1/SERK1 y de un receptor específico de ARNdc ubicado a nivel de membrana y que esta respuesta es independiente del silenciamiento génico (Kørner *et al.*, 2013; Niehl *et al.*, 2016) (Figura 3).

Los virus, también pueden ser reconocidos por proteínas de resistencia que activan respuestas similares a las activadas frente a patógenos microbianos (Figura 3). Ejemplo de ello, es gen N de Tabaco (por respuesta de lesión necrótica), el primer gen R identificado, que confiere resistencia frente al *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Whitham *et al.*, 1994).

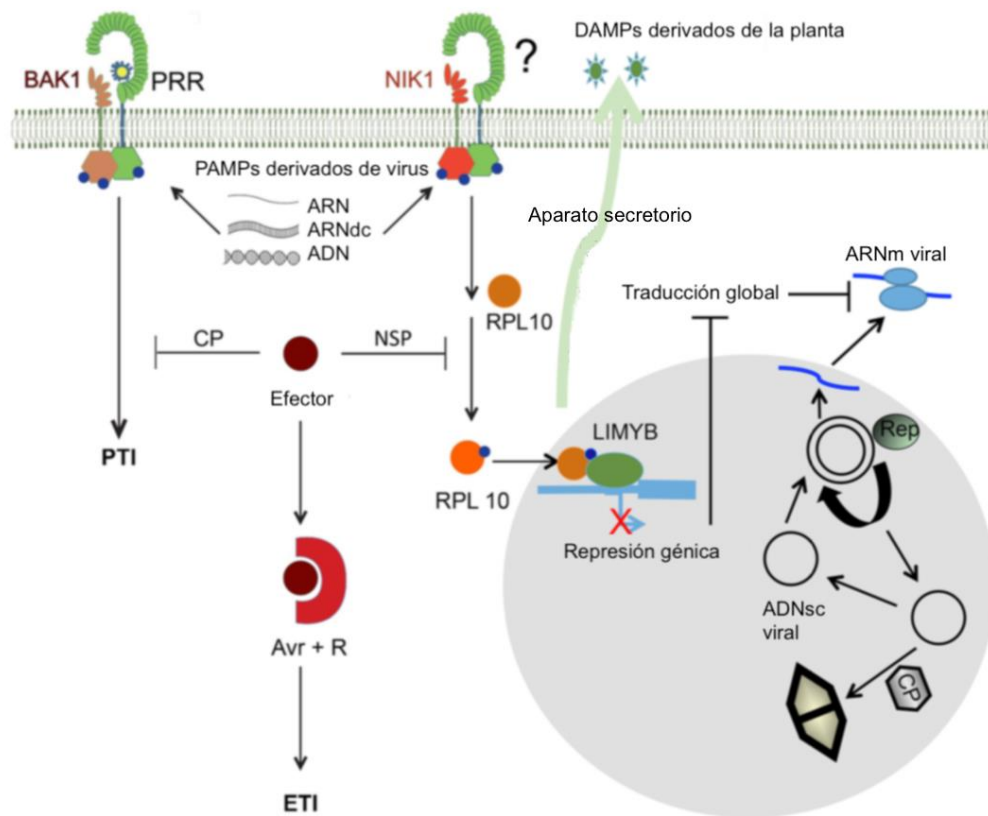


Figura 3 | Inmunidad antiviral innata en plantas. **A**, Inmunidad activada por PAMP (PTI) e inmunidad activada por efector (ETI) en interacciones virus-huésped. Durante la infección viral, la replicación y expresión del genoma viral conducen a la acumulación de ácidos nucleicos derivados del virus con características de PAMP, que pueden ser reconocidos por PRR y que, a su vez, se heterooligomeriza con co-receptores, como BAK1 y BKK1, para desencadenar PTI. Alternativamente, la PTI puede activarse por DAMPs endógenos, que son inducidos por la infección viral y liberados al apoplasto a través del aparato secretor. En una infección exitosa, la expresión del genoma viral resulta en la acumulación de efectores del virus para suprimir la PTI, lo que lleva a la enfermedad. Sin embargo, en los genotipos resistentes, los genes de resistencia reconocen específicamente, directa o indirectamente, los efectores virales, llamados factores de avirulencia (Avr), que activan la ETI y confieren resistencia. **B**, Inmunidad antiviral innata medida por NIK1. La oligomerización de NIK1 inducida por el virus, promueve la transfosforilación en la Thr474 crucial, activando la quinasa. Alternativamente, NIK1 interactúa con un LRR-RLK de una manera estímulo-dependiente. La propagación de la señal antiviral culmina con la supresión de la síntesis de proteínas globales del huésped, que también afecta la traducción del ARNm viral, como un mecanismo de defensa. Adaptado de Gouveia et al., (2017)

Durante las infecciones virales, y de manera similar a las infecciones desencadenadas por patógenos no virales, se observan mecanismos comunes activados tales como HR, que produce cambios metabólicos en los niveles de hormonas de defensa, como el AS, el ácido jasmónico (AJ) y el óxido nítrico (ON) y la acumulación de ROS, tanto en los

tejidos infectados como en los no infectados (Carr *et al.*, 2010; Mandadi y Scholthof, 2013). A nivel celular, la HR afecta la homeostasis del Ca^{2+} y altera el potencial y la permeabilidad de la membrana (Mur *et al.*, 2008). Por ejemplo, las infecciones producidas por TMV y *turnip crinkle virus* (TCV) en tabaco y Arabidopsis, inducen la deposición de calosa en los plasmodesmos y alteran la permeabilidad de la membrana permitiendo la filtración de electrolitos (Carr *et al.*, 2010; Zavaliev *et al.*, 2011). A nivel molecular y bioquímico, numerosas cascadas de señalización son activadas, entre ellas, las MAPKs (Hoser *et al.*, 2013). Corriente abajo de estas cascadas de señalización primarias, numerosos genes codificantes para proteínas asociadas a defensa como quitinasas, glucanasas, defensinas y proteínas asociadas a la patogénesis, se muestran sobreexpresados (Kørner *et al.*, 2013).

1.3.1 El rol del silenciamiento génico como mecanismo de defensa en plantas

El silenciamiento del ARN es un mecanismo evolutivo secuencia-específico y conservado entre organismos eucariotas, que regula la expresión de genes, estados de la cromatina y protege contra ácidos nucleicos invasores como transposones, transgenes y virus (Ding y Voinnet, 2007; Matzke *et al.*, 2009). El mecanismo de silenciamiento es desencadenado por ARNdc, que deriva principalmente de los intermediarios de replicación de los virus y son reconocidos y escindidos en ARNdc de 21 a 25 nt, llamados ARN pequeños (siARN, en inglés, *small interferent RNA*) por ARNasas de tipo III llamadas DICER (DCL). Posteriormente, los siARNs se asocian a un complejo enzimático endógeno denominado RISC (del inglés, *RNA induced silencing complex*), que es el encargado de reconocer a los ARNs blancos y actuar en la degradación específica de estos ARNs. La proteína ARGONAUTA, que a su vez forma parte del complejo RISC, está implicada en la degradación de cadenas virales cuya secuencia es complementaria a la de los siARNs (Bologna y Voinnet, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Boualem *et al.*, 2016) (Figura 4).

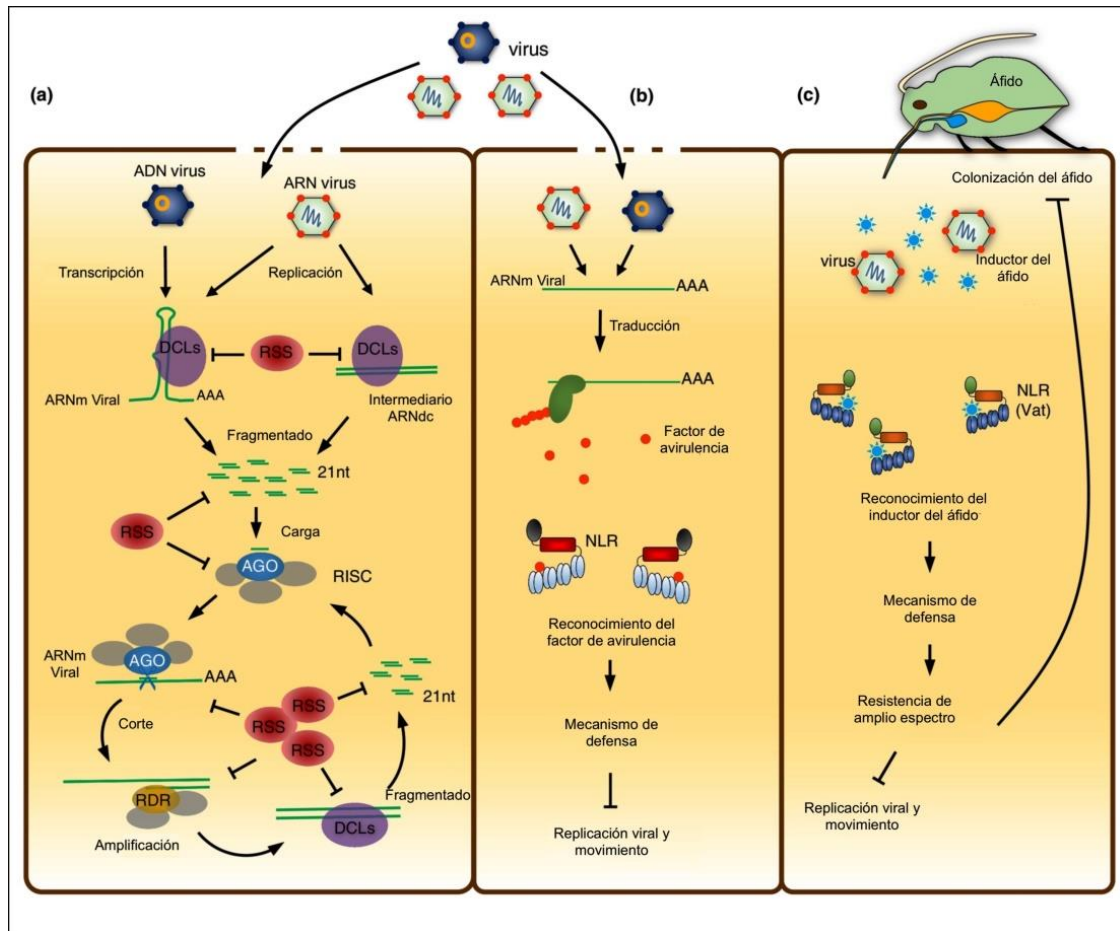


Figura 4 | Mecanismos de resistencia a virus en plantas. **A**, Silenciamiento de ARN en plantas y su supresión por supresores de silenciamiento de ARN codificados por virus (RSSs). El silenciamiento de ARN se inicia mediante el reconocimiento de ARNdc virales o ARN de horquilla parcialmente doble cadena, que se procesan para formar siARNs. **B**, Resistencia de la planta mediada por NLR. Tras la entrada en una célula huésped, los efectores virales se expresan desde el genoma del virus. Los genes específicos de la planta NLR interactúan (directa o indirectamente) con estos efectores para desencadenar la resistencia del virus. **C**, Modelo de resistencia mediada en *Vat*, que involucra fases de reconocimiento y respuesta separadas. En la planta resistente a *A. gossypii*, el *Vat*-NLR reconoce una molécula inductora del áfido. Esta fase de reconocimiento induce mecanismos de resistencia local que inhiben la colonización y replicación del áfido y el movimiento de virus transmitidos por el mismo áfido. Adaptado de Boualem et al., (2016).

La activación del silenciamiento se produce, en una primera instancia, a nivel celular y luego se extiende a las células vecinas a través de los plasmodesmos y sistémicamente a través del floema (Wang *et al.*, 2010). Para dicho proceso es importante la amplificación de la señal de silenciamiento mediada por las ARN polimerasas dependientes de ARN (RDRs) que sintetizan ARNdc utilizando como templado ARN simple cadena (ARNsc). Luego, los ARNdc son cortados por diferentes

DCLs produciendo siARNs que amplifican la señal y son capaces de moverse sistémicamente (Bologna y Voinnet, 2014) (Figura 4). La planta modelo *Arabidopsis*, expresa seis variantes de RDRs (RDR1–RDR6) (Voinnet, 2008). RDR1 y RDR6 han sido implicadas en defensa antiviral (Leibman *et al.*, 2018). Asimismo, la reducción de los niveles de expresión de RDR6 en *N. benthamiana* induce hipersusceptibilidad a diversos tipos de virus de plantas (Carbonell y Carrington, 2015).

1.3.2 Supresores virales del silenciamiento del ARN

Para escapar del silenciamiento del ARN como mecanismo de defensa antiviral, la mayoría de los virus de plantas han evolucionado supresores del silenciamiento (RSSs, del inglés, *RNA silencing suppressors*). Aunque los RSS son muy diversos en secuencia, estructura y participan en una serie de funciones virales básicas (replicación, movimiento y encapsulación), sus modos de acción se pueden clasificar en tres clases: primero, la unión al ARNdc que resulta en la inhibición de la producción de siARN por proteínas DCL; segundo, el secuestro de los dúplex de siARNs e interferir con el ensamblaje del complejo RISC y el movimiento célula a célula; y tercero, la acción directa sobre efectores o factores de procesamiento que llevan a su inhibición o desestabilización (Giner *et al.*, 2010; Burguán y Havelda, 2011; Li *et al.*, 2014). Debido a la función central de la regulación por pequeñosARNs en el desarrollo de las plantas, la defensa y la adaptación al estrés, el huésped ha desarrollado estrategias específicas para neutralizar los efectos de los RSS y estimular las reacciones de defensa (Pumplin y Voinnet, 2013). Entre las respuestas de contra-contra-defensa, la planta usa proteínas de resistencia (R) para proteger la integridad de los componentes de silenciamiento del ARN y para reconocer directa o indirectamente los RSS y finalmente inducir una respuesta hipersensible (HR) (Angel *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2013).

1.3.3 El impacto de las enfermedades virales en los cultivos de interés agronómico

Las enfermedades virales disminuyen la calidad y el rendimiento de cultivos de importancia económica. Si bien es muy difícil poner una cifra clara sobre su impacto financiero en la agricultura, se estima que las pérdidas en el rendimiento ocasionadas

por virus equivalen a U\$D 30.000 millones anuales y representan entre un 10 y un 15% de las pérdidas totales producidas a por fitopatógenos y malezas a nivel mundial (Loebenstein, 2008; Sastry and Zitter, 2014). En Argentina, los virus afectan a diversos cultivos de interés agronómico, entre los cuales se encuentran la papa, el maíz y los cítricos y dentro de las hortalizas, la frutilla es una de las más afectadas (Conci *et al.*, 2017; Torrico *et al.*, 2017; Luciani *et al.*, 2018).

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza closterovirus*, CTV) es uno de los virus que afecta a casi todas especies del género *Citrus* entre ellas el limón, un cultivo de gran importancia económica para el país y en especial para la provincia de Tucumán. Los síntomas inducidos por el CTV son diversos, encontrándose árboles asintomáticos portadores del virus y otros con diversas sintomatologías (Rocha Peña *et al.*, 1998). Los síntomas que provocan mayor impacto económico son el declinamiento rápido y la muerte de los naranjos y la acanaladura en la madera de los naranjos y limoneros ácidos. No existe una estrategia de control aplicable para todas las variedades, pero en líneas generales se recomienda el empleo de material de propagación certificado y el uso de pies tolerantes o resistentes al CTV.

El *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) es el que afecta más negativamente al cultivo de frutilla produciendo merma en el vigor de la planta y síntomas severos que incluyen enanismo, distorsión de la hoja, reducción de tamaño, manchas y disminución en el rendimiento y calidad de la fruta (Converse, 1987; Maas, 1998; Martin y Tzanetakis, 2006; Xiang *et al.*, 2014). SMYEV es transmitido de manera persistente por el insecto vector *Chaetosiphon fragaefolii* y no es posible su transmisión en forma mecánica. Las pérdidas producidas por este virus tratan de ser reducidas mediante el uso de plantas saneadas por multiplicación *in vitro*, aunque esta estrategia tiene como contrapartida el aumento de los costos de producción.

1.3.4 Estrategias empleadas para el control de la virosis

En general, las estrategias de manejo para controlar las enfermedades virales consisten en el empleo de medidas preventivas que incluyen el uso de semillas u órganos vegetativos certificados libres de virus, la destrucción de plantas infectadas, la eliminación de los posibles reservorios de virus y la modificación de prácticas de

siembra y cosecha. Si el virus tiene un vector de transmisión conocido, el control o exclusión del vector es sumamente importante. Por ejemplo, insectos y hongos vectores pueden controlarse con insecticidas y fungicidas, respectivamente. Alternativamente, las enfermedades virales pueden controlarse por medio del uso de variedades tolerantes o resistentes a virus (Gergerich y Dolja, 2006).

En los últimos años se ha empleado la técnica de transgénesis, con la introgresión de genes de resistencia, para el desarrollo de cultivares resistentes a virus. Desafortunadamente, no existen genes R contra todos los virus devastadores y, cuando están disponibles, su introgresión en variedades de alto rendimiento resulta tediosa y no siempre exitosa. Entre los numerosos obstáculos de esta técnica, se puede mencionar la dificultad para cruzar líneas de élite con plantas no cultivadas y el arrastre de *loci* indeseados que reducen la aptitud agronómica del cultivo. Además en muchos casos, los genes R son superados por cepas que logran quebrar la resistencia (Boualem *et al.*, 2016). Ejemplos exitosos de la utilización de esta tecnología es el uso de cultivares genéticamente modificados resistentes a *Papaya Ringspot virus* (PRSV), que lograron disminuir considerablemente el impacto de este virus (Gonsalves *et al.*, 2004). Por otra parte, esta técnica también ha sido útil para el control del virus *Plum Pox Virus* (PPV), que produce una enfermedad denominada Sharka y que genera pérdidas devastadoras en la producción de durazneros y a otros cultivos de carozo (Scholthof *et al.*, 2011). La gran importancia de la enfermedad producida por este virus motivó el desarrollo de una variedad de duraznos genéticamente modificados, resistentes a PPV, que fue evaluada a campo durante diez años y que ha demostrado ser exitosa en el control de este virus (Polák *et al.*, 2012). En la era post-genómica, el desarrollo de herramientas como TALENs (del inglés, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) y CRISPRs (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), ha abierto ampliamente la posibilidad de diseñar una nueva generación de genes de resistencia que afecten funciones virales importantes y consecuentemente el *fitness* del mismo. El trabajo pionero en evolución artificial de genes R, en el patosistema Rx-PVX, ha sentado las bases para ello. Se identificaron mutantes Rx, que presentan un reconocimiento mejorado (mayor sensibilidad), generando resistencia de amplio espectro sobre cepas de PVX y el virus del mosaico Poplar (PopMV) (Farnham y Baulcombe, 2006; Harris *et al.*, 2013).

Otro método de control, que ha sido ensayado bajo condiciones de crecimiento monitoreadas, consiste en la aplicación de compuestos químicos que generan tolerancia frente a ciertos patógenos. La aplicación de AS y AJ ha sido una estrategia eficiente para controlar la incidencia de varios patógenos virales, entre ellos el *cucumber mosaic virus* (CMV), el TMV y el *Turnip crinkle virus* (TCV) en distintas especies. Por medio de esta estrategia se obtuvo una disminución de entre un 80 a un 90 % en la acumulación viral (Shang *et al.*, 2011). Sin embargo, este método de control aún no ha sido ensayado en condiciones de campo.

1.3.5 Características generales del ciclo de infección viral en hospedantes susceptibles

El inicio de las infecciones virales comienza con el ingreso de los virus a las células vegetales; para ello los mismos deben traspasar la cutícula de las células e ingresar al citoplasma celular. Este ingreso suele ser facilitado por medio del daño mecánico inducido a la planta o por insectos vectores. Posteriormente, se produce el desensamblado del virión y la traducción/replicación del genoma viral en los tejidos inoculados. Los virus codifican para proteínas virales de movimiento (MP, del inglés *Movement Protein*) que, por medio de la alteración de los plasmodesmos, permiten el movimiento entre células. A través de los plasmodesmos, los complejos de transporte viral se desplazan hacia nuevos tejidos (Figura 5), permitiendo que el virus se disperse. Además, los virus son transportados hacia los tejidos sistémicos a través del floema (transporte de larga distancia). Durante el transporte de larga distancia se produce la translocación del virus desde las células del mesófilo hacia los elementos cribosos, pasando por las células del parénquima vascular y las células acompañantes. Los elementos cribosos están conectados a las células acompañantes por medio de plasmodesmos especializados denominados poros de plasmodesmos. Estos poros poseen a su vez, un tamaño de exclusión mayor que el de los plasmodesmos, lo que permite que el ingreso de las macromoléculas hacia los elementos cribosos ocurra por simple difusión. Sin embargo, se especula que las partículas virales no atraviesan estos poros por simple difusión, sino de manera regulada (Hipper *et al.*, 2013; Folimonova y Tilsner, 2018). Una vez que las partículas virales ingresan a los elementos cribosos son transportadas hacia los tejidos sistémicos siguiendo la ruta de los fotoasimilados

(Figura 5) (Hipper *et al.*, 2013). Esto determina un patrón general para la dispersión de los virus, en el cual las raíces, tubérculos y hojas superiores jóvenes son los primeros tejidos en ser invadidos. El arribo a los tejidos sistémicos tarda entre 2 y 5 días para la mayoría de los virus.

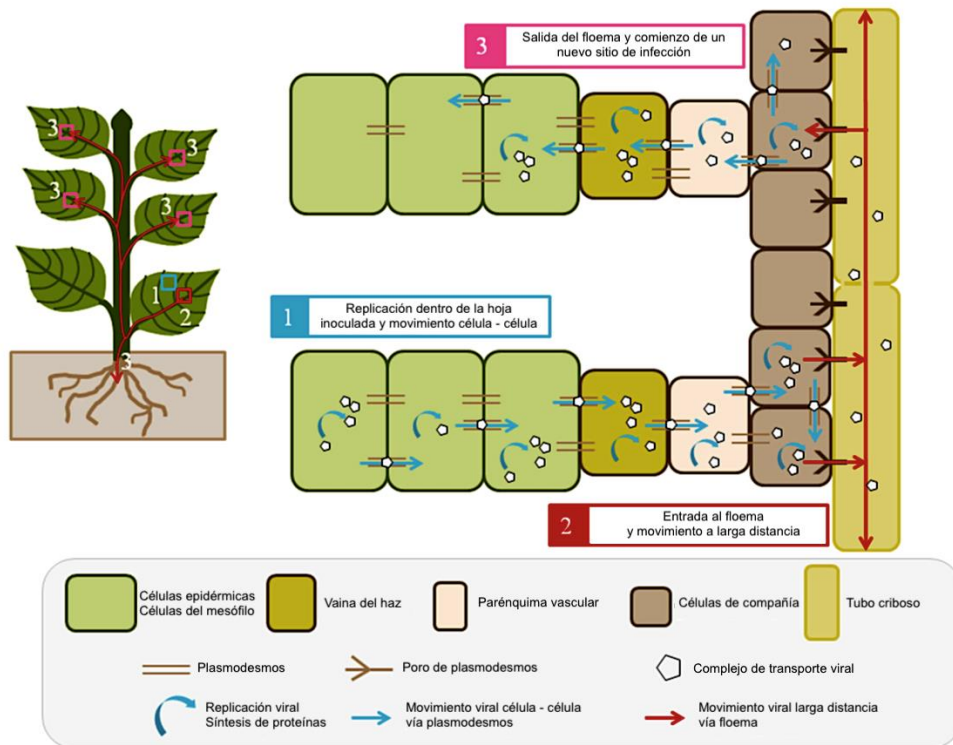


Figura 5 | Esquema del transporte viral hacia los tejidos sistémicos, movimiento entre células por medio de los plasmodesmos (1), movimiento de larga distancia (2), comienzo de un nuevo ciclo de replicación (3). Adaptado de Hipper *et al.*, (2013).

1.4 Clasificación de los virus

La clasificación de los virus se basa en: I) la naturaleza del ácido nucleico que compone el genoma del virus (ADN o ARN), II) el tipo de genoma (cadena simple o doble; polaridad positiva o negativa), III) el número de moléculas que conforman el genoma (fragmentado o no fragmentado) IV) la morfología de las partículas virales (en forma de bastón, filamentosas, etc) V) el mecanismo de transmisión (mecánica, por semillas, por polen o mediada por un organismo vector) y VI) el efecto citopático que produce (inclusiones, asociación con cloroplastos, núcleos, etc.) entre otras características.

1.4.1 El género *Tobamovirus*

El virus TMV-Cg (del inglés, *Crucifer infecting Tobacco Mosaic Virus*) pertenece al género *Tobamovirus*, de la familia *Virgaviridae* (ICTV *International Committee on Virus Taxonomy*, 2011. <http://ictvonline.org>). El miembro tipo de este género es el Virus TMV. Los Tobamovirus son capaces de infectar a la mayoría de las Solanáceas (papa, tomate, tabaco), y en particular la variante TMV-Cg es capaz de infectar a la planta modelo *Arabidopsis* (Yamanaka *et al.*, 1998). La infección en plantas de tabaco con el virus TMV produce un mosaico característico en las hojas (Figura 6, A) y un menor crecimiento de las plantas. Por su parte, las plantas de *Arabidopsis* infectadas con el virus TMV-Cg no muestran el síntoma típico de mosaico, pero sí evidencian un menor desarrollo del tamaño de la roseta (Figura 6, C y D).

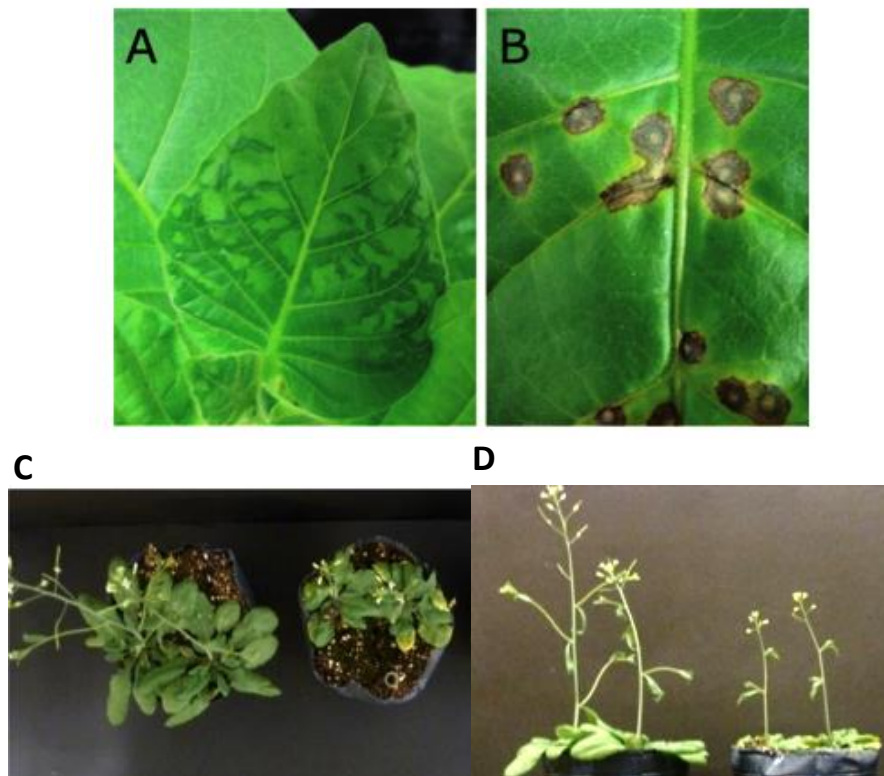


Figura 6 | Virus del mosaico del tabaco (TMV). **A**, Infección sistémica de *Nicotiana tabacum* cv. Turk que muestran el mosaico característico asociado a TMV. **B**, Lesiones locales necróticas en *N. tabacum* cv. Glurk, producto de la resistencia del gen-N luego de la inoculación con TMV. Imágenes tomadas de Scholthof et al., (2011). **C** y **D**, Síntomas producidos por el virus TMV-Cg en roseta y tallo, en plantas de *Arabidopsis*. NI corresponde a plantas no infectadas y TMV-Cg a plantas que desarrollan síntomas de la infección. Imágenes tomadas de Zavallo et al., (2015)

Los Tobamovirus poseen un genoma de ARN de cadena simple, positiva, no fragmentado. Los viriones forman partículas rígidas, alargadas, de 300 nm x 12 nm de diámetro (Figura 7, A). El genoma del TMV codifica para un total de 4 proteínas: dos de ellas (126 kDa y 183 kDa) forman la replicasa viral, y las otras dos son la proteína MP (30 kDa) y la de la cápside (CP) (17,5 kDa). Las proteínas de 126 y 183 kDa son traducidas a partir del ARN genómico, mientras que las proteínas MP y CP son traducidas a partir de ARN sub-genómicos (Figura 7, B) (Murphy *et al.*, 1995).

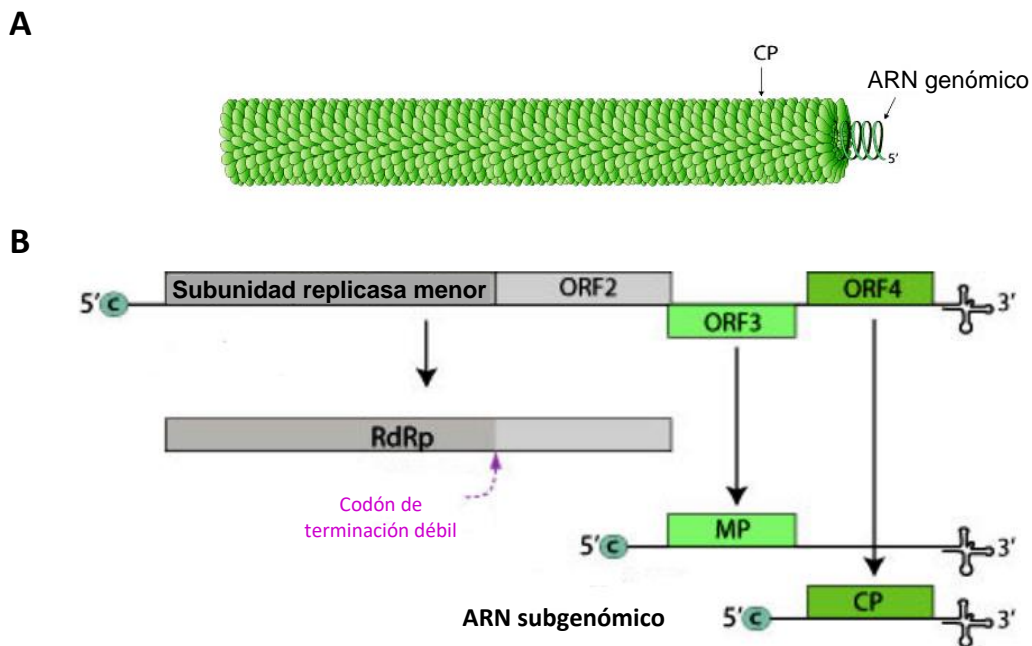


Figura 7 | A, Reconstrucción tridimensional del virión a partir de la CP cristalizada. **B,** Esquema de la estructura del genoma del TMV. Se muestran los ORFs que codifican para las subunidades mayor y menor de la replicasa y los ARN subgenómicos que codifican para la MP y la CP.

Los tobamovirus se transmiten fácilmente por inoculación mecánica. No se conocen insectos vectores y solo eventualmente se pueden llegar a transmitir por semilla (Scholthof *et al.*, 2011). El ciclo viral comienza con la entrada del virus a la célula vegetal y el posterior desensamblado del virión en el citoplasma. A partir del ARN genómico se traducen las proteínas que componen la replicasa viral que se encarga de sintetizar la hebra complementaria (negativa) del genoma viral, la cual sirve a su vez como molde para la transcripción de los ARNs sub-genómicos. Su posterior traducción genera en primer lugar a la MP y luego a la CP (Figura 8). Finalmente, el

virus puede trasladarse desde la célula de ingreso a la célula contigua y así sucesivamente hasta alcanzar el sistema vascular y generar una infección sistémica. Este proceso suele demorar entre 2 a 3 días en *Arabidopsis* infectada con el virus TMV-Cg.

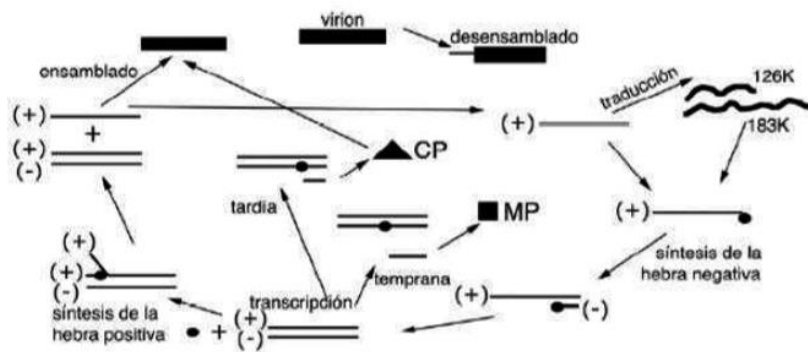


Figura 8 | Esquema del ciclo viral del TMV en el citoplasma de una célula vegetal comenzando con el desensamblado viral y finalizando con la conformación del virión. Adaptado de Fernández Valiela (1995).

1.5 Antecedentes que enmarcan el trabajo de tesis

La frutilla, pertenece a la familia *Rosaceae*, género *Fragaria* y es el principal cultivo hortícola en la provincia de Tucumán (Kirschbaum *et al.*, 2017). La frutilla cultivada actualmente se reconoce como un híbrido entre las especies americanas *F. virginiana* y *F. chiloensis* y se designa como *Fragaria ananassa* (Hancock, 1999) y ha reemplazado casi universalmente a la especie silvestre, *Fragaria vesca*, por la productividad, mayor tamaño de sus frutos y también por ser plantas más vigorosas. Entre las enfermedades que afectan al cultivo de frutilla (*Fragaria ananassa*), la antracnosis, una enfermedad holonecrótica que ataca todos los tejidos de la planta, es la que afecta más negativamente a este cultivo y causa grandes pérdidas en el rendimiento y produce finalmente la muerte de las plantas (Howard *et al.*, 1992; Freeman y Katan, 1997). Esta enfermedad es causada por hongos del género *Colletotrichum* spp. En la provincia de Tucumán se identificaron las tres especies de *Colletotrichum* que integran el complejo fúngico responsable de la enfermedad : *C. acutatum* (Ramallo *et al.*, 2000), siendo esta la especie de mayor incidencia con una

distribución en la provincia cercana al 95%, *C. fragariae* (Mena *et al.*, 1974) y *C. gloeosporioides* (Mónaco *et al.*, 2000).

La infección de la frutilla por *Colletotrichum* spp. ha sido muy estudiada e interacciones compatibles e incompatibles, según los diferentes cultivares de frutilla, han sido reportadas (Smith y Black, 1990; Denoyes-Rothan *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 2007). En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de INSIBIO se determinó que plantas del cv Pájaro de frutilla presentan resistencia total cuando son desafiadas con el aislado local SS71 de *Acremonium strictum*, patógeno de frutilla. Sin embargo, esta cepa SS71, de comportamiento avirulento frente al cv. Pájaro, resultaba ser altamente virulenta frente a los cvs. Chandler, Milsei, Rosa Linda, Enzed Donna y Hecker de frutilla. Esta cepa aunque inicialmente fue identificada como *C. fragariae*, posteriormente fue re-caracterizada como *Acremonium strictum* mediante pruebas microbiológicas y moleculares (Racedo *et al.*, 2013).

Debido al comportamiento altamente contrastante de la cepa SS71 frente al cv. Pájaro en comparación con los otros cvs. de frutilla ensayados, se decidió investigar su posible capacidad para inducir resistencia frente a la enfermedad de antracnosis. Para ello se definió un sistema de protección cruzada en el cv. Pájaro utilizando el aislado avirulento SS71 y otro altamente virulento de *C. acutatum* (M11). Este último aislado fue empleado en el desafío de las plantas pre-inoculadas con SS71, debido a que es capaz de producir la muerte de las plantas al cabo de 14 días. El sistema de protección cruzada se puso de manifiesto inoculando primero las partes aéreas de plantas sanas con conidios activos del aislado SS71 y luego de tres días con conidios activos de M11, observándose que las plantas no presentaban ningún síntoma de enfermedad (Salazar *et al.*, 2007), es decir que las plantas del cv. Pájaro pre-inoculadas con el patógeno avirulento SS71 se volvían resistentes a una infección posterior con la cepa virulenta M11. En trabajos posteriores desarrollados en nuestro laboratorio, se demostró también que esta resistencia se debe, al desarrollo de una respuesta defensiva de tipo SAR por acción del patógeno avirulento SS71 (Salazar *et al.*, 2007). Esta respuesta fue caracterizada por tener efecto sistémico, de amplio espectro y con memoria temporal, es decir que la señal puede transmitirse por estolones a las plantas hijas. Además, la protección se mantiene durante los 60 días posteriores a la inoculación e inclusive contra otros aislados fúngicos de diferentes especies de *Colletotrichum* spp. y también

contra *Botrytis cinerea* (Salazar *et al.*, 2007). Esta resistencia va acompañada de la activación de diferentes mecanismos de defensa que incluyen cambios anatómicos asociados al reforzamiento de la pared celular, estallido oxidativo por generación de ROS en el mesófilo y en tejido vascular, acumulación de la hormona vegetal AS y de las proteínas de defensa PR (Salazar *et al.*, 2007). Posteriormente, Grellet-Bournonville *et al.*, (2012) demostraron que la defensa observada causada por el aislado SS71 sería dependiente de la vía del AS ya que SS71 induce la acumulación de dicha fitohormona y la expresión del gen *PR1*. Por otro lado, se observó que el sobrenadante del aislado avirulento de *A. strictum* (SS71) también inducía una respuesta de defensa en plantas de frutilla cv. Pájaro, con acumulación de ROS, deposición de calosa y lignina (Chalfoun *et al.*, 2011). Esto permitió identificar y purificar al menos uno de los inductores de la defensa desencadenada por SS71, denominado AsES (*Acremonium strictum* *elicitor subtilisin*). Se demostró que AsES es una proteína extracelular de tipo subtilisina o subtilasa de 288 aa y 34 kDa (Genbank, nº de acceso JX684014.2) (Chalfoun *et al.*, 2013) perteneciente a la familia S8, subfamilia S8A. Exhibe alta identidad con serinoproteasas de tipo subtilisinas como Proteinasa K de *Trichoderma album* y Carlsberg de *Bacillus subtilis* y baja identidad (menos del 45%) con las proteasas completamente secuenciadas de *Acremonium* spp. (Chalfoun *et al.*, 2013). Se demostró que el inductor AsES activa una respuesta de defensa que se caracteriza entre otros eventos por influjo de calcio, estallido oxidativo bifásico, acumulación de compuestos fenólicos, reforzamiento de la pared celular por deposición de calosa y lignina, acumulación de AS y sobreexpresión de genes asociados a la defensa (Hael-Conrad *et al.*, 2018). Esta respuesta va acompañada de SAR y micro-HR observándose protección sistémica en diferentes cultivares de frutilla frente a *C. acutatum* y *B. cinerea* (Hael-Conrad *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos condujeron a la inscripción de la proteína AsES y el procedimiento de su purificación en el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INPI) (Patente EPC Nº 12.720.221.6-1410) y en registro internacional (AR/10.03.11/ARA P110100854). Esta patente impulsa el desarrollo de una estrategia sostenible usando la proteína AsES como una práctica de manejo fitosanitario en frutilla y otros cultivos de interés agronómico. Estudios posteriores demostraron que AsES confiere protección contra *Botrytis cinerea* en *Arabidopsis* a través de la activación de las tres principales vías de señalización de defensa mediadas por AS, AJ y ET. Esto último se

demostró utilizando plantas transgénicas nahG, y las mutantes de los genes, *npr1*, *ics1*, *coi1.16*, *jar1*, *dde2.1*, *ein2* y *etr1* de *Arabidopsis* (Hael-Conrad *et al.*, 2015). Por otra parte, se observó que AsES induce la producción de etileno, la maduración y la protección frente a patógenos naturales en frutos de palta (Perato *et al.*, 2018).

Recientemente, se demostró que el bioestimulante llamado PSP1 (del inglés, *plant stimulation and protection*) y desarrollado en base a la proteína AsES como principal compuesto activo, protege contra *Corynespora cassiicola* en soja, la estría roja (*Acidovorax avenae*) en caña de azúcar y el tizón de la espiga (*Fusarium graminearum* Schwabe) en trigo (Chalfoun *et al.*, 2018a). A su vez, Chalfoun *et al.*, (2018b), reportaron que PSP1 reduce además el desarrollo del tizón tardío en soja cultivada en condiciones de campo.

La totalidad de los ensayos reportados hasta ahora y que involucran a la proteína AsES, fueron realizados en primera instancia con el sobrenadante crudo del aislado SS71 de *A. strictum* y más recientemente con la versión purificada de proteína AsES. Este último proceso, además de bajos rendimientos, aprox. 670 µg de AsES puro/L de cultivo de SS71, según lo reportado por Chalfoun (2009), conlleva un extenso período de procesamiento y purificación que puede extenderse, en condiciones de laboratorio, hasta los 120 días. Debido a ello, surge la necesidad de obtener la proteína AsES de forma recombinante con el objeto de aumentar los rendimientos y disminuir los costos de producción. Por otra parte, y debido a que el mecanismo exacto por el cual la proteína AsES es percibida por la planta, así como la implicancia de la actividad proteolítica en la inducción de la defensa aún deben ser elucidados, se requiere la obtención de AsES y de mutantes inactivas de la misma para tal fin. Asimismo, el descubrimiento de la potencial aplicación de AsES para el biocontrol de nuevos patógenos de naturaleza diversa así como el entendimiento de su mecanismo de acción, permitirán el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento que pueden emplearse para conferir una resistencia duradera y de amplio espectro en plantas

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo se sustenta en las siguientes **hipótesis**:

i) La actividad inductora de la defensa no depende de la actividad proteolítica de AsES

ii) La actividad inductora de AsES promueve también la activación de la inmunidad antiviral en plantas.

El **objetivo general** del presente trabajo es estudiar el mecanismo molecular de acción de la subtilasa AsES, determinando para ello la implicancia de la actividad enzimática y su naturaleza como inductor en la activación de la defensa en plantas. El plan tiene como propósitos finales contribuir a un mayor entendimiento de los mecanismos de defensa y contradefensa que se activan en la interacción planta-patógeno y proponer una nueva estrategia para el biocontrol de enfermedades en plantas.

Los **objetivos específicos** propuestos son:

1. Obtener la proteína AsES de forma recombinante y optimizar su proceso de purificación.
2. Determinar si la actividad inductora de AsES está vinculada a su actividad como proteasa, mediante la generación de mutantes inactivas y péptidos de diferentes regiones de la misma.
3. Evaluar la actividad inductora de la defensa de la proteína AsES recombinante y de las diferentes versiones obtenidas, mediante marcadores moleculares y observaciones fenotípicas en plantas de Arabidopsis.
4. Investigar el impacto de AsES en la infección viral en plantas de diferentes especies.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

Para el clonado de vectores por métodos tradicionales se empleó la cepa de *Escherichia coli* químicamente competente DH5 α y para la expresión de las proteínas de interés, se emplearon las cepas BL21 (DE3) y SHuffle. En todos los casos, las cepas bacterianas crecidas a 37°C hasta el momento de la inducción, en medio Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) suplementado con carbenicilina (100 μg / ml).

Para los ensayos de expresión heteróloga en forma transitoria, se empleó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Para evaluar la capacidad inductora de defensa, se emplearon plantas de Arabidopsis, cultivar Columbia (Col-0) no transgénicas y la triple-mutante: *fls2, efr, cerk1* (Xin *et al.*, 2016), referidas en adelante como *fec*, y la triple mutante *fls2 efr bak1-5* (Xin *et al.*, 2016) (todas en *background* Col-0). Por otra parte, la activación de la inmunidad antiviral en plantas fue evaluada en plantas de Arabidopsis, cultivar Col-0 y polimutante *fec* y en plantas salvajes de *N. benthamiana*.

Para los ensayos realizados en Arabidopsis, las plantas fueron crecidas en una cámara Percival (Percival Scientific, EE.UU) en condiciones controladas a 22°C y bajo un fotoperíodo de 16 h de luz (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad. Para los ensayos realizados con *N. benthamiana*, las plantas fueron crecidas en invernaderos con temperaturas dentro del rango de 20 a 26 °C con ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

La cepa BMM de *B. cinerea* empleada en los ensayos de infección, fue gentilmente proporcionada por Brigitte Mauch-Mani (Universidad de Neuchatel, Suiza). Para su crecimiento, la misma fue cultivada en medio agar papa dextrosa (APD) 1,5% a 22°C con 16 h de luz (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 15 días y se trabajó en todos los casos con una cepa activa obtenida a partir de un cultivo monospórico. El procedimiento de infección realizado se detalla en ensayos de resistencia inducida.

El plásmido pJL24, empleado en los ensayos de infección con TMV, fue gentilmente cedido por Eduardo Peña (Universidad Nacional de La Plata, Argentina).

3.2 Técnicas generales de ingeniería genética

Las técnicas de digestión con enzimas de restricción, ligación de DNA, obtención de células de *E. coli* químicamente competentes y de *A. tumefaciens* electrocompetentes y la transformación de ambas, electroforesis de ADN en geles de agarosa y de PCR, se realizaron según protocolos clásicos (Sambrook *et al.*, 1989).

Todas las enzimas de restricción y modificantes fueron provistas por New England Biolabs (EE.UU).

La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen, Alemania) y las purificaciones de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación se realizaron con columnas del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) según lo indicado en el manual de uso.

La concentración de las muestras de ácidos nucleicos fue cuantificada mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technology).

La secuenciación de todas las construcciones obtenidas fue realizada por el método de Sanger mediante electroforesis capilar en el servicio de secuenciación de The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK y en el Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

3.2.1 Procedimientos de clonado

La secuencia nucleotídica codificante (SCD) para la proteína fúngica AsES completa (AsESc, con los dominios I9+S8), fue sintetizada, codón-optimizada para expresión en *E. coli*, clonada en el vector PUC19 (New England Biolabs, EE.UU) y luego subclonada en el vector de expresión pET-52b(+) (Novagen, EE.UU) por la empresa GenScript (EE.UU).

Cebadores específicos fueron diseñados para introducir los sitios de restricción *EcoRV* y *EcoRI* junto con una secuencia que codifica una etiqueta de 10 Histidinas (10 X-His) en el extremo 3' terminal (Tabla 1). El amplicón obtenido fue clonado en el vector de expresión pMAL-p5x (New England Biolabs, EE.UU).

De igual modo, la secuencia codificante para la proteína AsES madura (AsESm, sólo con el dominio S8) fue clonada en el vector PUC19 (New England Biolabs, EE.UU) y luego subclonada en el vector de expresión pMAL-p5x, utilizando el constructo pMAL-

p5x/AsESc como templado. Para ello, se emplearon los cebadores que se muestran en la Tabla 1.

Nombre	Secuencia (5'-3')
AsES comp F	CGCGATATCGCACCCGACCCGCCGTGATG
AsES comp R	CAGGGAATTCTTAGTGGTGGTGATGGTGATG
AsES mat F	CGCGATATCGCCTATACCACCCAAGCAAGC

Tabla 1 | Listado de cebadores utilizados para el clonado de AsESc y AsESm en el vector pMAL-p5x. Los sitios de corte de *EcoRV* y *EcoRI*, se encuentran subrayados.

Por otra parte, fragmentos de la proteína madura (Frag-1, Frag-2 y Frag-3) fueron clonados en el vector de expresión pMAL-c4E (New England Biolabs, EE.UU), entre los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*, utilizando como molde la construcción pMAL-p5x/AsESm. Se emplearon los primers F y R indicados en la Tabla 2, según el fragmento a clonar.

El clonado en sentido correcto de todos los insertos fue corroborado mediante corte con enzimas de restricción y posterior secuenciación.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Frag 1-c4E F	CGCGAATTCGCTATACCACCCAAGCAAG
Frag 1-c4E R	CAGAAGCTTTTAGCGGGAACGACTGTCAG
Frag 2-c4E F	CGCGAATTCAGTGATTCCGGCTCAGGTTC
Frag 2-c4E R	CAGAAGCTTTTAGCCAGAAATCGTGTTGG
Frag 3-c4E F	CGCGAATTCGCGTCTTTTAGTAATTACGG
Frag 3-c4E R	CAGAAGCTTTTAGTGGTGGTGATGGTGATG

Tabla 2 | Listado de cebadores utilizados para el clonado de fragmentos de AsESm en el vector pMAL-c4Ex. Los sitios de corte de *EcoRI* y *HindIII*, se encuentran subrayados.

3.2.2 Construcciones empleando el sistema de clonado Gateway

Cebadores específicos, que incluyen una secuencia codificante para el péptido señal PR1 y el sitio CACC en el cebador 5' directo, fueron diseñados y utilizados en una reacción de PCR para generar el producto de amplificación correspondiente. Luego,

este producto fue clonado direccionalmente en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher scientific, EE.UU), con resistencia a kanamicina (Figura 9, A). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de recombinación, mezclando 5-10 ng del vector de destino pEarlyGate 103 (Earley *et al.*, 2006) (Figura 9, B), 20-50 ng del vector de entrada con el inserto de interés, 6 μ l de buffer T.E y 1 μ l de LR *clonase reaction mix* (Invitrogen, EE.UU). Luego de 4 h de incubación a 25 °C, se transformaron bacterias de *E. coli* DH5 α . Posteriormente, se procedió a la selección de transformantes positivas en medio LB suplementado con kanamicina. Esta misma reacción de recombinación y posterior selección de transformantes, fue realizada para el vector de destino pGWB 405 (Nakagawa *et al.*, 2007), con resistencia a estreptomomicina (Figura 9, C).

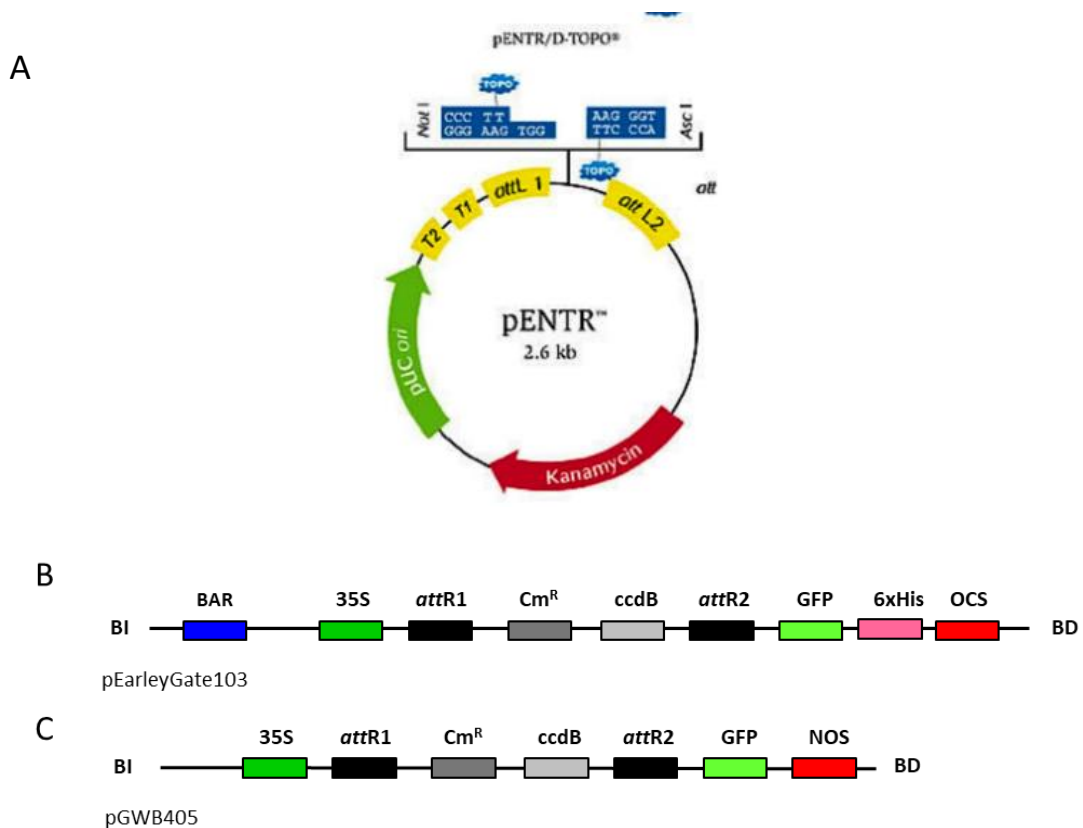


Figura 9 | Vectores del sistema de clonado Gateway. **A**, Vector de entrada pDONR/Kan. Figura adaptada del manual de Invitrogen del Gateway®pDONR™ Vectors. **B**, Vector pEarlygate 103 diseñado por Earley *et al.*, (2006). **C**, Vector pGWB405 diseñado por Nakagawa *et al.*, (2007). Entre los bordes izquierdo (BI) y derecho (BD) se indican: BAR: la resistencia al herbicida Basta para selección de plantas transgénicas. 35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor. *attR1* y *attR2*: sitio de recombinación. Cm^R: resistencia a cloranfenicol. GFP: proteína fluorescente verde. 6xHis: etiqueta de 6 histidinas. OCS. Terminador. NOS: terminador

3.3 Mutagénesis sitio-dirigida

Para obtener la mutante en el sitio activo (reemplazo de Ser por Ala) de la proteína AsES completa (I9+S8*), se empleó la técnica *overlap extention* PCR (Figura 10) (Ho *et al.*, 1989). Para ello, en una primera ronda se amplificó el ORF (del inglés, *Open Reading Frame*) en dos fragmentos donde uno de los extremos de cada fragmento contenía la mutación deseada. Los extremos 5' de los ORFs se amplificaron con los cebadores AsES comp F (Tabla 1) y AsES mat mut R (Tabla 3). Mientras que el extremo 3' se amplificó con el primer AsES mat mut F (Tabla 3) y AsES comp R (Tabla 1). En una segunda ronda de PCR empleando los productos de la primera como molde, se amplificaron los ORFs completos con las mutaciones empleando los cebadores AsES comp F y AsES comp R (Tabla 1). Para la obtención de la mutante madura (S8*) se procedió de igual manera, empleando los cebadores AsES mat mut F (Tabla 3) y AsES comp R (Tabla 1) y AsES mat F (Tabla 1) y AsES mat mut R (Tabla 3) en la 1ª ronda de PCR y los cebadores AsES mat F y AsES comp R (Tabla 1) en la 2ª ronda de PCR.

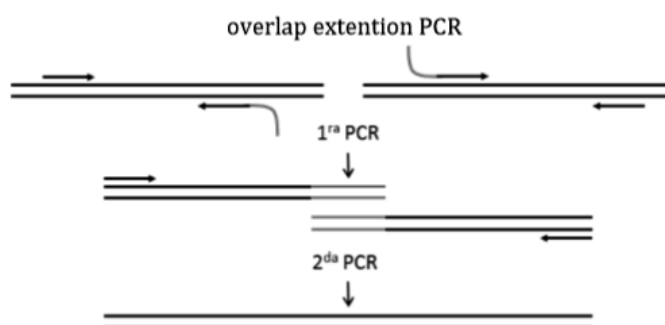


Figura 10 | Representación esquemática de la *overlap extention* PCR. En el primer paso se amplifican los dos segmentos que luego en la segunda PCR se unirán. Pueden utilizarse cebadores internos con mutaciones en la secuencia no complementaria para incorporar dichos cambios en el producto final. Adaptado de Ho *et al.*, (1989).

Nombre	Secuencia (5'-3')
AsES mat mut F	CGATTCTGGCACGgcgATGGCTCCCCGCATATTGC
AsES mat mut R	CAATATGCGGGGAAGCCATcgCGTGCCAGAAATCG

Tabla 3 | Listado de cebadores utilizados para la mutagénesis sitio-dirigida

3.4 Ensayos de expresión heteróloga

3.4.1 *En sistema procarionta: E. coli*

Las cepas químicamente competentes de *E. coli*, BL21 (DE3) y SHuffle fueron transformadas con las construcciones de interés por shock térmico. A partir de una colonia individual obtenida luego de la transformación en placas de LB-agar suplementadas con carbenicilina (100 µg/ml), se largó un cultivo ON de 5 ml de medio LB suplementado con carbenicilina (100 µg/ml). El cultivo inicial fue luego utilizado como inóculo del cultivo principal. En el caso de expresión de las proteínas dirigidas al espacio periplásmico, el cultivo principal fue suplementado con glucosa 0,2 % (p/v) e incubado con agitación constante (200 r.p.m.) a 37°C hasta alcanzar una $D.O_{600nm}=0,6$. La inducción de la expresión de la/las proteínas de interés se realizó con diferentes concentraciones de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG): 0,01; 0,05; 0,5; y 1mM según el caso y se utilizaron diferentes temperaturas de incubación post-inducción: 4°C, 28°C y 37°C.

3.4.2 *En sistema eucariota: N. benthamiana*

Las colonias de *A. tumefaciens* cepa GV3101 que contenían las construcciones de interés fueron crecidas en medio LB suplementado con los antibióticos gentamicina (25 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml) por 48 hs a 28°C. Luego, se inocularon 7 ml de medio de cultivo (medio LB suplementado con MES 10 nM pH 5,7, gentamicina 25 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml y acetosiringona 25 µM) con 400 µl del cultivo crecido durante 48 h y fue posteriormente crecido a 28°C durante 18 h. Luego, estos cultivos, fueron centrifugados para recuperar las células a 2.000 g y temperatura ambiente. Por último, se resuspendieron las células en buffer de infiltración (MES 10 nM, pH 5,7, MgCl₂ 10 nM y acetosiringona 150 µM) a una $DO_{600nm}=1$.

Para las co-agroinfiltraciones se combinaron los diferentes cultivos con el cultivo de la construcción pBin-p19, inhibidor del silenciamiento génico, de tal manera de obtener densidades ópticas de 0,8 y 0,2. Finalmente, fueron incubados a temperatura ambiente durante al menos 3 h.

Las infiltraciones se realizaron con una jeringa sin aguja mediante la aplicación de una presión contra la parte abaxial de la hoja y haciendo presión con el dedo en el

lado opuesto, evitando la rotura del tejido. El procedimiento se repitió de manera de infiltrar la hoja en toda su extensión. Para este experimento, se usaron hojas jóvenes, completamente expandidas (3^o a 5^o hoja). Se tomaron 10 discos de 0,5 cm de diámetro de los parches agroinfiltrados a los 3 días posteriores al tratamiento (dpt) y se realizó un *pool* para su caracterización molecular.

Como control de agroinfiltración y expresión de GFP, se utilizó el vector pBin61-GFP, cedido gentilmente por el Dr. David Boulcombe. La construcción pBin61-P19, fue cedida gentilmente por la Dra. Ziegler-Graff.

3.5 Análisis de proteínas

Luego de la expresión de las proteínas de interés, se procedió a la extracción de proteínas totales, que incluye proteínas citoplasmáticas solubles e insolubles y de los diferentes compartimientos. Por otra parte, se realizó también una extracción de proteínas específicas, presentes en el espacio periplásmico de *E. coli* y en el espacio apoplastico de *N. benthamiana*, para evaluar la expresión sitio-dirigida de AsES a los diferentes compartimientos celulares.

3.5.1 Extracción de proteínas totales

3.5.1.1 De *E. coli*

El cultivo celular bacteriano fue centrifugado a 10.000 rpm a 4°C durante 12 min y luego fue congelado a -20°C. Luego de descongelar el pellet celular en hielo, el mismo fue resuspendido en buffer de lisis PBS 1 X, con adición de PMSF 1mM. Utilizando el sonicador Fisherbrand™ Q 500 con sonda (Thermo Fisher Scientific, EE.UU), se lisó la muestra por intervalos de 20 s. con 10 s de descanso, durante 2 min, a una amplitud del 30%. Las proteínas presentes en la solución luego del lisado celular corresponden a proteínas totales. Las proteínas solubles se obtienen en solución, luego de centrifugar el lisado celular.

3.5.1.2 De *N. benthamiana*

Se procesaron y homogeneizaron 10 discos de tejido vegetal de 0,5 cm con 150 μ L de buffer de extracción: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 10%, Nonidet P 40 0,1 %, PMSF 1 mM, cocktail inhibidor de proteasas 1 % (v/v).

3.5.2 Extracción de proteínas periplásmicas

Se procedió acorde a lo descrito por Sroga y Dordick (2002). Para ello, el cultivo inducido fue centrifugado a 4.000 *g* durante 15 min a 4°C y el pellet celular resuspendido en 20 ml de la solución Osmótica I (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 2,5 mM, CaCl₂ 2 mM, sacarosa al 20%, PMSF 1 mM). Posteriormente, se incubó en un baño con hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 4.000 *g* durante 15 min a 4°C. Luego de eliminado el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en 10 ml de Solución Osmótica II fría (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, CaCl₂ 10 mM, PMSF 1 mM) e incubado en hielo durante 20 min con agitación suave. El fluido resultante del shock osmótico (fso) previo, fue obtenido luego de la centrifugación a 8.000 *g* durante 20 minutos a 4°C.

3.5.3 Extracción de proteínas del apoplasto

El lavado de fluido apoplástico (lfa) fue obtenido a los 3 dpt, sumergiendo las hojas infiltradas en 1 ml de buffer de extracción. Luego, fueron sometidas a vacío (-25 en Hg) durante 2 minutos y centrifugadas durante 15 min a 4°C a 900 *g*, usando un tubo Falcon de 50 ml como recipiente cotenedor. El lfa fue recuperado, filtrado por un filtro de 0,22 μ m, y almacenado a -80°C para posterior análisis molecular.

3.6 Identificación de proteínas

3.6.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas obtenidas fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida de concentración 10 %. Para ello, iguales volúmenes de muestra fueron calentados a 100 °C durante 5 min con iguales volúmenes de *Loading* buffer 4X (Tris-HCl 300 mM, glicerol 30%, SDS 6 %, azul de bromofenol 0,05 %). Previo calentamiento, 1,4-Dithiothreitol (DTT) al 0,05 % fue adicionado a las muestras. La electroforesis se realizó a 100-120 V constantes en buffer

Tris-Glicina (25 mM Tris-HCl pH 8,8; 190 mM glicina; 0,1% SDS) y se utilizó el equipo MiniPROTEAN 2 System (BioRad, EE.UU). Se utilizó un marcador proteico preteñido de peso molecular (PM) comprendido entre 10 – 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, EE.UU)

Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron desmontados y las proteínas teñidas con el colorante azul de Coomassie o bien electrotransferidas a membranas de PVDF para ensayos de western blot.

3.6.2 Electrotransferencia

Se realizó tanto la técnica húmeda como semi-seca según la dificultad para identificar la proteína de interés. En ambos casos, se utilizó una membrana de PVDF Amersham Hybond P 0.45 (GE Healthcare, EE.UU) pre-activada con metanol.

En el caso de la transferencia húmeda, el *cassette* fue montado dentro de la cuba (BIORAD, EE.UU) y llenada con buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). La electrotransferencia se realizó a 4°C y se aplicó voltaje constante de 100 V por 1,5 h o bien de 30 V, ON. Por otra parte, para la transferencia semi-seca se armó el “sándwich” y se utilizó el equipo Trans-Blot® de BIORAD (EE.UU). Se aplicó voltaje constante de 25 V durante 30 min a temperatura ambiente.

3.6.3 Ensayos de western blot

Luego de la transferencia, la membrana fue incubada en solución de bloqueo TBST-leche (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05 %, leche descremada 5 %), 3 h a temperatura ambiente o bien ON a 4°C. Luego, se procedió a la incubación con el anticuerpo 1º en la dilución recomendada (realizada en solución de bloqueo TBST-leche) durante 3 h. Posteriormente, la membrana fue lavada entre 3 y 5 min con TBST y luego incubada con la dilución apropiada del anticuerpo 2º. Al cabo de 1 h de incubación, la membrana fue lavada en forma seriada, 2 veces con TBST y una vez con TBS durante 15 min.

Los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina (AP) fueron revelados utilizando los sustratos NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma-Aldrich, EE.UU) y BCIP (5 bromo-4

cloro-3 indoil fosfato, Sigma-Aldrich, EE.UU), siguiendo las especificaciones del fabricante en oscuridad hasta la aparición de bandas.

Los anticuerpos conjugados a peroxidasa fueron revelados por quimioluminiscencia utilizando sustrato comercial Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Para ello y acorde a las especificaciones del proveedor, la membrana fue incubada con el sustrato durante 3 min y luego expuesta a oscuridad entre 3 s y 5 min, con películas radiográficas Kodak X-Omat (Kodak). Luego las placas fueron reveladas en la máquina reveladora con las soluciones Revelador/Fijador READYMATIC (Kodak).

3.6.3.1 Anticuerpos utilizados

- IgG monoclonal de ratón anti-His (Invitrogen)
- IgG monoclonal de ratón anti-His conjugado a peroxidasa para revelado por ECL (Invitrogen)
- IgG monoclonal de ratón anti-MBP conjugado a peroxidasa para revelado por ECL (New England BioLabs)
- IgG de conejo anti-GFP (Roche)
- Anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP)
- Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP)

3.6.4 Tinción con azul de Coomassie

Se incubaron los geles en una solución de azul de Coomassie 0,05 % (Coomassie Brilliant Blue R250 0,05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) por 2 o 3 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante mediante incubación en solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %), que se reemplazó reiteradas veces. El gel se decoloró hasta que las bandas proteicas se visualizaron con nitidez.

3.7 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas solubles en las muestras fue determinada usando el kit de ensayo de proteínas (Protein Assay Kit II; BioRad) basado en el método de Bradford (1976). Las concentraciones de las proteínas de interés purificadas fueron estimadas por comparación con una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras de interés junto con diluciones seriadas al medio de BSA (desde 250 ng/μl hasta 31,125 ng/μl) se resolvieron en geles de poliacrilamida que posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie como se describió previamente. Las imágenes de los geles fueron tomadas con el G:BOX (Syngene, EE.UU) y las bandas visualizadas se analizaron con el Gel-Pro Analyzer software v3.1.

3.8 Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas/péptidos blanco se realizó por cromatografía de afinidad y se basó en todos los casos en las etiquetas añadidas en ambos extremos de las proteínas; con la proteína MBP ubicada en el extremo $-NH_2$ terminal y las 10 histidinas (10x His-tag) ubicadas en el extremo COO^- terminal.

En el caso de la purificación de las proteínas fusionadas a MBP, la purificación fue realizada en *batch* y se siguió el protocolo descrito en el Manual *pMAL™ Protein Fusion & Purification System* de New England BioLabs. Para ello, se adicionó una cantidad adecuada de resina (capacidad de unión: 6/8 mg por ml de volumen de resina en la columna) al tubo con el extracto con la fracción soluble, previamente equilibrado en buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM). La muestra fue luego incubada con agitación suave durante al menos 1 h a 4°C y luego centrifugada a 800 r.p.m durante 15 min a 4°C. La muestra fue lavada 3 veces con el mismo buffer de equilibrio, centrifugada a igual velocidad en todos los casos y posteriormente eluida con buffer de elución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, maltosa 10 mM). Las fracciones de la elución fueron recolectadas por separado y sometidas a análisis de presencia de proteína *target* y pureza correspondientes.

La purificación de las proteínas con His-tag se realizó en columnas, utilizando las Ni-NTA spin columns (Thermo Scientific, EE.UU) y siguiendo las recomendaciones del proveedor. El extracto crudo/periplasmático, previamente adicionado con NaCl 100 mM para equilibrar, fue cargado en la columna también equilibrada con buffer de

equilibrio (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, imidazol 20 mM). Luego se realizó una incubación de 1 h a 4°C en un agitador orbital y se procedió al centrifugado a 700 g durante 2 min a 4°C. Se realizaron 3 lavados con buffer de equilibrio/lavado y finalmente se procedió a la elución con buffer de elución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, imidazol 500 mM). Las fracciones eluidas fueron recolectadas por separado y sometidas a los análisis correspondientes.

3.9 Almacenamiento de las muestras

Una vez optimizado el proceso de purificación, las fracciones eluidas fueron unidas y desaladas con agua MiliQ mediante ultrafiltración, usando las columnas Vivaspín (Sartorius, Reino Unido). Las muestras fueron luego adicionadas con glicerol al 20% y congeladas a -20°C.

3.10 Determinación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue evaluada mediante hidrólisis enzimática del sustrato peptídico cromogénico N-Succinyl-L-Ala-L-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (Suc-AAPF-pNA; (Sigma-Aldrich, EE.UU), según lo descrito por Chalfoun et al., (2013). Se diluyeron 0,2 µg/ml de cada proteína en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) hasta un volumen final de 500 µl. Después de 2 minutos de preincubación a 37°C, 10 µl de Suc-AAPF-pNA 5 mM fue añadido (concentración final 0,1 mM) a la mezcla de reacción e incubado durante otros 30 minutos en las mismas condiciones. Se empleó AsES-WT-(purificada a partir del sobrenadante de *A. strictum*), como control interno positivo en la misma concentración y condiciones que las proteínas analizadas (Chalfoun et al., 2013). Todos los ensayos de actividad proteolítica se realizaron por triplicado.

La actividad proteolítica de cada proteína se estimó como la concentración de pNA liberada por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{405 \text{ nm}}$) de 9,62 mM⁻¹ cm⁻¹, a 37°C y pH 7,5; donde la concentración de pNA se determinó espectrofotométricamente a 405 nm. La tasa de autoproteólisis del sustrato Suc-AAPF-pNA también fue evaluada y restada para cada valor de reacción medido. Una unidad de actividad proteolítica fue definida como la liberación de 1 µmol de pNA por minuto a 37°C y pH 7,5.

3.11 Ensayos de qPCR

3.11.1 Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc para qPCR

El ARN total fue extraído a partir de 100 mg de tejido foliar de plantas de Arabidopsis de 20 días de edad, previamente tratado y procesado en nitrógeno líquido, utilizando Trizol Reagent (Invitrogen, EE.UU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría mediante Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) y su pureza e integridad fueron determinadas mediante la relación 260/280 nm. Posteriormente fue tratado con DNasa I (Invitrogen, EE.UU). La síntesis del ADN complementario a la hebra de ARNm se realizó con la enzima retro-transcriptasa MMLV (Invitrogen, EE.UU) y el empleo de oligonucleótidos al azar, a partir de 1,5 µg de ARN puro. Todos los experimentos de q-PCR, fueron realizados en el equipo StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, EE.UU) y se emplearon un mínimo de entre 6 y 8 réplicas biológicas.

3.11.2 Diseño de oligonucleótidos para qPCR

Oligonucleótidos específicos fueron diseñados mediante el software PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) para la evaluación de la expresión de genes. La lista de oligonucleótidos utilizados se detalla en la Tabla 4.

El factor de elongación *EFα* (AT5G60390) fue determinado como el gen de referencia más estable para las condiciones ensayadas (Rodriguez, 2015).

Nombre	Secuencia (5`-3`)
EF1α F	ATTGGTAACGGTTACGCCCC
EF1α R	TCTCCTTACCAGAACGCCTGTC
PR1 F	ACAACCTAAGAGGCAACTGCAG
PR1 R	CCTTCTCGCTAACCCACAT
WRKY70 F	CACCAACGCAGAAACTCCCA
WRKY70 R	TTCTCCGTGGACGAACCATG
ERF6 F	TCGAATCCTCCTCGCGTTACTG
ERF6 R	TTCGGTGGTGCATCTTCAACG
FRK1 F	ATCTTCGCTTGGAGCTTCTC
FRK1 R	TGCAGCGCAAGGACTAGAG
WRKY53 F	AAATCCCGGCAGTGTTC
WRKY53 R	TCTTGCGATGATGACTCTCG

Tabla 4 | Listado de cebadores utilizados en ensayos de qPCR

3.11.3 Realización de qPCR, obtención y análisis de datos de expresión

Las condiciones experimentales para la realización de qPCR se establecieron a partir de las normas internacionales MIQE (Bustin *et al.*, 2009). Los datos de fluorescencia crudos fueron extraídos del cicladador y las eficiencias de amplificación para cada gen fueron calculadas usando el software LinReg PCR (Ruijter *et al.*, 2009). Los análisis de expresión relativa y los análisis estadísticos fueron realizados mediante el software fgStatistics (Di Rienzo *et al.*, 2013) utilizando el gen *EF1* como normalizador y calculando las relaciones de expresión mediante el algoritmo desarrollado por Pfaffl (2001). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos niveles de expresión cuyos p-valores fueron menores a 0,05 (indicados con *).

3.12 Ensayos de resistencia inducida (RI) frente a infecciones

3.12.1 Tratamiento con el inductor-Infección de Arabidopsis con *B. cinerea*

Plantas de Arabidopsis de 4 semanas de edad fueron tratadas con las proteínas recombinantes a evaluar mediante el depósito de una gota de 6 μ l en el lado adaxial de la hoja N^o 5 durante 48 h. El vector vacío de expresión, purificado y desalado, fue designado como control y la proteína AsES-WT, purificada a partir del sobrenadante de *A. strictum*, según lo descrito por Chalfoun *et al.*, (2013) fue usada como control positivo de protección contra *B. cinerea*. Luego del periodo de inducción, se eliminaron las gotas remanentes y se colocaron 6 μ l de la suspensión de esporas (5×10^4 ml⁻¹) en la misma área foliar. Los síntomas se evaluaron a las 48 h y 72 h posteriores a la infección (hpi). El área necrótica total fue cuantificada utilizando el software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) y fue presentada como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas control (tratadas con vector vacío) y las proteínas recombinantes ensayadas (p < 0,05).

3.12.2 Tratamiento con el inductor -Infección de Arabidopsis con el virus

TMV-Cg

Plantas de Arabidopsis en estadio 1.06 de desarrollo (18 días de edad aproximadamente) (Boyes, 2001) fueron completamente asperjadas con una solución

60 nM de las proteínas recombinantes a evaluar. Luego de 48 h de inducción, la 3ª hoja fue rociada con carborundum; se agregaron 5 µl de una solución conteniendo el virus TMV-Cg diluido en una solución de 20 mM NaHPO₄ (pH 7) y se procedió a la abrasión suave de la superficie de la hoja. En las plantas control, el tratamiento se realizó con el vector de expresión vacío, purificado y desalado y la abrasión se realizó en presencia del inóculo viral. Todas las infecciones fueron realizadas luego del mediodía.

Las muestras de tejido fueron tomadas de las hojas 8, 11 y 13 (ubicadas inmediatamente por encima de la hoja inoculada, excluyendo esta última) a los 5 dpi y fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta la extracción de ARN.

3.12.2.1 Cuantificación del título viral de TMV-Cg

El título viral de TMV-Cg en plantas de *Arabidopsis* se cuantificó mediante la técnica de qPCR. Para ello, el ARN total de las muestras infectadas fue aislado y luego retrotranscrito a ADNc, según se indica en la sección 3.11.1 de materiales y métodos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la detección del virus TMV-Cg se detallan a continuación:

Nombre	Secuencia (5`-3`)
TMV-Cg CP F (Nº accesión: D38444)	TGTCGCAATCGTATCAAAC
TMV-Cg CP R (Nº accesión: D38444)	CTGTATCTGGAAACCGCTG

Tabla 5 | Listado de cebadores utilizados en ensayos de q-PCR

3.12.3 Tratamiento con el inductor -Infección de *N. benthamiana* con el virus TMV

Plantas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad fueron infiltradas en el lado abaxial de una hoja joven, completamente expandida, con una solución 60 nM de la proteína AsESc hasta cubrir la totalidad de la misma (aprox. 500 µl de solución). Luego de 48 h de inducción, sobre la misma hoja tratada, se esparció carborundum con 20 µl de un extracto de viriones que poseen la construcción pJL24, diluida en buffer NaHPO₄

20 mM (pH 7) y se realizó una abrasión mecánica suave. La construcción pJL24, es capaz de expresar en el huésped, bajo el control del promotor constitutivo 35S, todos los genes del virus TMV sumado a una proteína reportera, *Green fluorescent protein* (GFP), que puede ser detectada bajo luz UV (Lindbo, 2007) (Figura 11).

A partir de los 4 dpi, los focos de infección iniciales fueron cuantificados en forma visual bajo luz UV y comparados con el de las plantas control-inoculadas (tratadas con el vector de expresión vacío). Los resultados fueron presentados como la media \pm SE de tres experimentos independientes (n=10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas control y las proteína AsESm ensayada ($p < 0,05$).

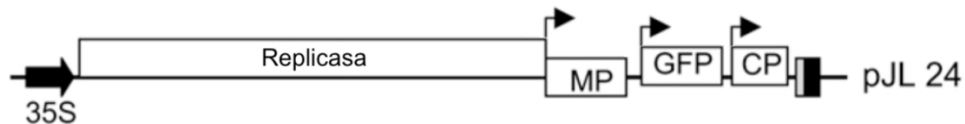


Figura 11 | Mapas del plásmido utilizado en el ensayo de infección en *N. benthamiana*. Se representan las regiones de T-ADN. La flecha oscura representa el promotor 35S duplicado de CaMV. La caja negra, representa la secuencia terminadora de la señal poliA de CaMV. Las flechas curvas representan promotores subgenómicos. Los ORFs están representados por cajas blancas y sus identidades están etiquetadas en las mismas. Figura adaptada de Lindbo (2007).

3.13 Medición del movimiento célula a célula del virus TMV

La velocidad del movimiento célula a célula del virus TMV en plantas de *N. benthamiana* pre-tratadas con AsESm (S8), fue evaluada a partir de los 4 dpi. El diámetro de focos iniciales de infección fue determinado al azar en 20 de ellos en cada planta, mediante el uso de un calibre. Las mediciones fueron realizadas a partir del momento de la visualización macroscópica de los puntos de GFP y a diferentes tiempos post infección hasta los 7 días. Se empleó un n=10 plantas por tratamiento y los resultados fueron expresados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas control y las proteína AsES ensayada ($p < 0,05$).

3.14 Evaluación de caracteres fenotípicos

3.14.1 Medición de inhibición del crecimiento en plántulas de *Arabidopsis*

La inhibición del crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* (en inglés, *seedling growth inhibition*, SGI) se evaluó según lo descrito en Stegman et al., (2017). Para ello, las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas en superficie mediante esterilización gaseosa con dióxido de cloro. Posteriormente, fueron sembradas en medio MS agar 0,5 X, con vitaminas (Duchefa), y sometidas a vernalización en oscuridad durante 2 días. Luego, fueron crecidas durante 5 días en condiciones de luz y humedad óptimas, según se indica en la sección 3.1 de materiales y métodos. A continuación, las plántulas fueron transferidas a una placa estéril de 48 pocillos con 1 ml medio MS suplementado con sacarosa al 1% y conteniendo las proteínas recombinantes/péptidos en una concentración 60 nM. Se utilizó flg22 (100 nM) como control positivo de la inhibición del crecimiento (Gómez-Gómez y Boller, 2000) y el vector vacío pMAL-p5x, como control negativo (denominado mock). El peso fresco de las plántulas se midió 5 días después de realizada la transferencia. Se utilizó un n=20 plántulas por tratamiento y se colocaron 4 plántulas por pocillo.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Expresión heteróloga de AsES en *E. coli*

La proteína AsES es una serin proteasa extracelular de tipo subtilisina, producida por el aislado avirulento SS71 del hongo *A. strictum*. (Chalfoun *et al.*, 2013). El rendimiento final reportado en el proceso de purificación de esta subtilisina fúngica fue de 0,67 mg/L cultivo de SS71 y un tiempo de procesamiento mínimo de 90 días (Chalfoun, 2009). Dado que la obtención y purificación de AsES a partir del sobrenadante de *A. strictum* implica un procesamiento complejo y costoso que conlleva sobre todo una enorme inversión de tiempo, se planteó como parte del primer objetivo de esta tesis doctoral la obtención de la proteína AsES en forma recombinante de manera de aumentar el rendimiento y disminuir los tiempos de producción.

Las subtilasas tienen una tríada catalítica conservada caracterizada por los aminoácidos aspartato, histidina y serina (Dodson y Wlodawer, 1998) y han sido clasificadas de acuerdo con MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) dentro de la familia S8, subfamilia S8A .

La proteína AsES es sintetizada como un precursor inactivo de 388 aminoácidos, compuesto por un péptido señal (PS), un pro-péptido N-terminal (I9) y un dominio peptidasa (S8) (Figura 12). El precursor inactivo sufre una maduración autocatalítica para liberar una enzima activa de manera gradual. Primero, el PS media la secreción de la enzima fuera de la membrana citoplásmica, donde es escindido por una señal peptidasa. Luego, el dominio I9, que inhibe temporalmente la actividad de la enzima y actúa como una chaperona, es eliminado y se obtiene una proteína activa (dominio S8) que consta de 283 aminoácidos. La proteína madura (S8) es la que retiene la actividad proteolítica y además, induce respuestas de defensa de la planta (Chalfoun *et al.*, 2013). En la secuencia correspondiente a la proteína AsES, fueron detectados a su vez en forma putativa 4 residuos de cisteínas que podrían estar implicadas en la formación de dos puentes disulfuro y dos sitios de unión Ca^{2+} , ambas características compartidas por otras serin proteasas como por ej. Proteinasa K (Bajorath *et al.*, 1988).

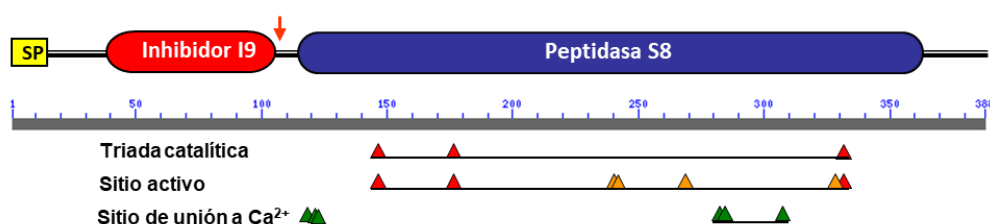


Figura 12 | Esquema de la estructura primaria de la pro-proteína AsES, que muestra los dominios conservados identificados. PS indica péptido señal y abarca desde los residuos aminoácidos 1 a 15. I9 indica dominio inhibidor, desde los residuos 38 a 105. S8 indica dominio peptidasa desde los residuos 115 a 365. (▲) Indica los aminoácidos de la triada catalítica, (▲) indica los aminoácidos del sitio activo y (▲) indica los posibles sitios de unión a Ca^{2+} . La flecha roja corresponde al sitio de escisión del dominio inhibidor, ubicado en la alanina 105.

4.1.1 Elección del vector y cepa bacteriana para expresión

La secuencia codificante para la pro-proteína AsESc (con los dominios I9+S8) fue clonada en el vector de expresión pET-52b(+) bajo el control de promotor T7, inducible por IPTG (Figura 13). En primera instancia la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), usada de rutina en experimentos de expresión de proteínas fue transformada y fueron evaluados diferentes parámetros para optimizar el proceso de expresión, entre los que se destacan diferentes concentraciones de IPTG, entre 0,05 y 0,5 mM y diferentes temperaturas de inducción, ensayada en un rango entre 37°C a 16°C (no mostrado).

Cabe destacar que las condiciones fueron orientadas en todo momento a la obtención de la/las proteínas *target* en forma soluble de manera de simplificar el proceso de obtención. Por ello, se analizó con especial énfasis la fracción soluble luego de la lisis celular.

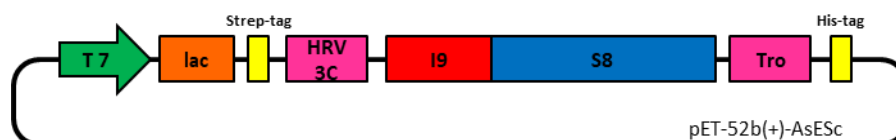


Figura 13 | Esquema del vector plasmídico utilizado con la respectiva secuencia de interés clonada. (■) Corresponde al promotor T7, (■) el operón lac; (■) etiquetas para facilitar la purificación: Strep-tag y His-tag; (■) sitio de reconocimiento de las proteasas HRV 3C y trombina. (■) dominio I9 de la subtilasa AsES; (■), dominio S8 peptidasa de AsES

El peso molecular esperado para la proteína AsESc (Strep-tag-I9-S8-His-tag) es de 45 kDa y para la proteína madura, AsESm (S8-His-tag), en el caso de que la misma se exprese en forma funcional y por lo tanto se escinda del dominio I9, de 34 kDa.

Las muestras fueron tomadas a diferentes tiempos post-inducción: 0,5; 1; 2 y 4 h e igual volumen (20 μ l) de las mismas fue sembrado para realizar SDS-PAGE. En la figura 14, A y B, se muestra la fracción soluble de los cultivos inducidos, analizados a diferentes tiempos posteriores a la inducción. En ninguno de las fracciones analizadas logra observarse, a simple vista, la expresión diferencial de la proteína AsESc (ni AsESm) respecto a las condiciones iniciales de partida (cultivo no inducido).

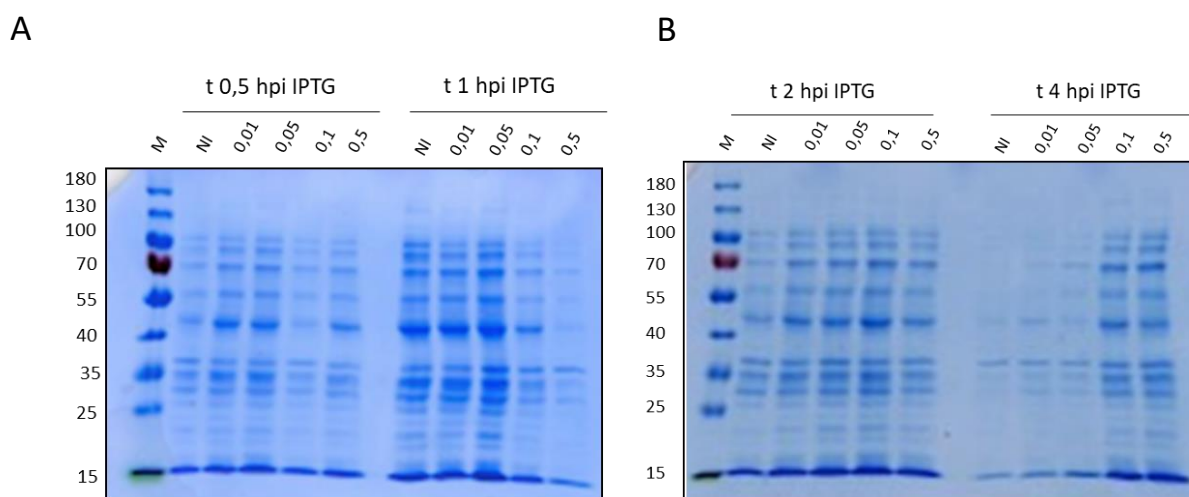


Figura 14 | Expresión en BL21 (DE3). Se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos post-inducción. Las muestras correspondientes a la fracción soluble fueron lisadas y separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. **A**, Fracciones muestreadas a la 0,5 h y 1 hpi. **B**, Fracciones tomadas a la 2 h y 4 hpi. M: marcador de peso molecular. NI: cultivo no inducido. 0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 corresponden a las diferentes concentraciones mM de IPTG que se usaron para inducir el cultivo.

Posteriormente y debido a la ausencia de expresión de la proteína AsES en forma soluble utilizando la cepa BL21 (DE3), se buscó como alternativa el uso de una cepa modificada genéticamente denominada SHuffle®T7. La misma, presenta un estado redox alterado que favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma y consecuentemente logra una mayor eficiencia de plegado, aumentando la capacidad de generar proteínas solubles activas (Lobstein *et al.*, 2012).

La figura 15, A y B, muestra la fracción soluble del cultivo SHuffle inducido a diferentes temperaturas (37°C y 28°C) y con diferentes concentraciones de IPTG (0,05 y 0,1 mM).

Nuevamente, en ninguno de los casos ensayados se logró la expresión diferencial de AsESc o AsESm en forma soluble.

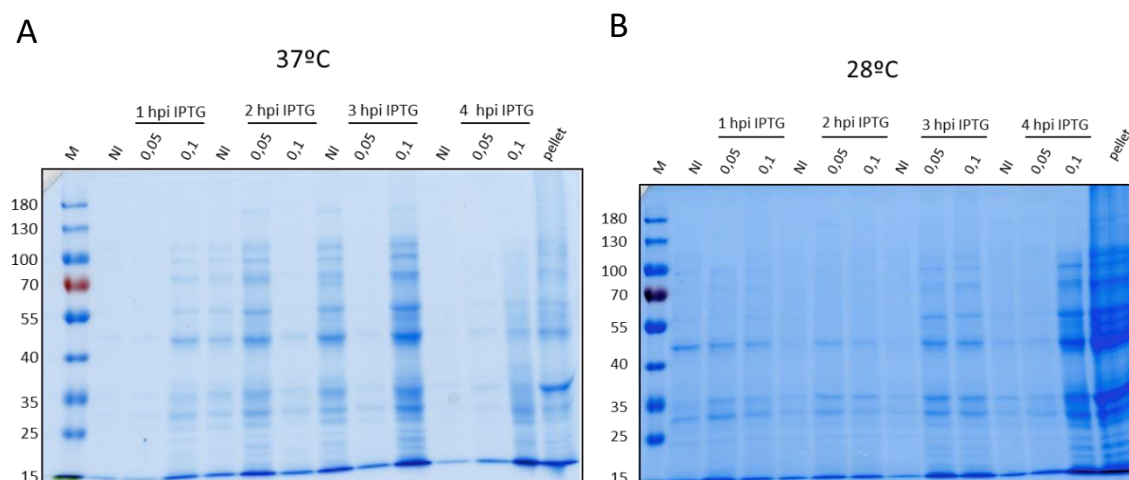


Figura 15 | Expresión heteróloga utilizando la cepa SHuffle T7. Se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos post-inducción. Las muestras correspondientes a la fracción soluble fueron lisadas y separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. **A**, Fracciones muestreadas a la 0,5 h y 1 hpi. **B**, Fracciones tomadas a las 2 h y 4 h posteriores a la inducción. M: marcador de peso molecular. NI: cultivo no inducido. 0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 corresponden a las diferentes concentraciones mM de IPTG que se usaron para inducir el cultivo.

Debido a las dificultades de expresión de AsES en las condiciones anteriormente ensayadas, hipotetizamos que la ausencia de proteína soluble podría estar relacionada con un plegamiento incorrecto o bien con una posible degradación por acción de proteasas propias del huésped. Por ello, decidimos cambiar radicalmente de estrategia y expresar y secretar la proteína blanco al periplasma bacteriano. Para ello se empleó el plásmido pMAL-p5x (Figura 17) en donde se clonó la SCD de interés entre los sitios *Bam*HI y *Sall*. El mismo, se encuentra bajo el control de un promotor inducible (*tac*). El sitio de múltiple clonado (SMC) está posicionado de manera tal de permitir la fusión de la proteína de interés a la proteína de unión a maltosa (42,5 kDa) (MBP, del inglés, *Maltose Binding Protein*,) además de a una secuencia señal en el extremo N-terminal. La proteína MBP en este vector, fue diseñada para unirse fuertemente a amilosa por lo que, además de favorecer la formación de proteínas solubles, puede usarse como etiqueta para purificación por afinidad. Cabe mencionar que la etiqueta de His-tag

ubicada en el extremo COO⁻ terminal de la proteína fue incorporada a la secuencia de AsES durante la etapa clonado y no forma parte del vector comercial.

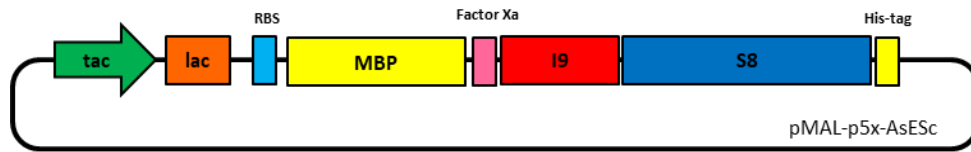


Figura 16 | Esquema del vector plasmídico pMAL-p5x con la respectiva secuencia de interés clonada. (■) Corresponde al promotor tac, (■) el operón lac; (■) indica el sitio de unión del ribosoma, (■) corresponde a etiquetas para purificar: MBP y His-tag; (■) sitio de reconocimiento del Factor Xa. (■) dominio I9 de la subtilisina AsES; (■), dominio S8 de AsES.

La expresión se realizó en la cepa BL21 (DE3) y de manera exploratoria, las condiciones de inducción fueron 0,05 mM de IPTG y una temperatura de 37°C. Las proteínas del periplasma fueron extraídas del cultivo bacteriano al cabo de 4 h de incubación, mediante shock osmótico según se indica en la sección 3.5.2 de materiales y métodos. La detección de la proteína AsESc/AsESm se realizó mediante SDS-PAGE y tñido con Coomassie Brilliant Blue y/o western blot con anticuerpos específicos.

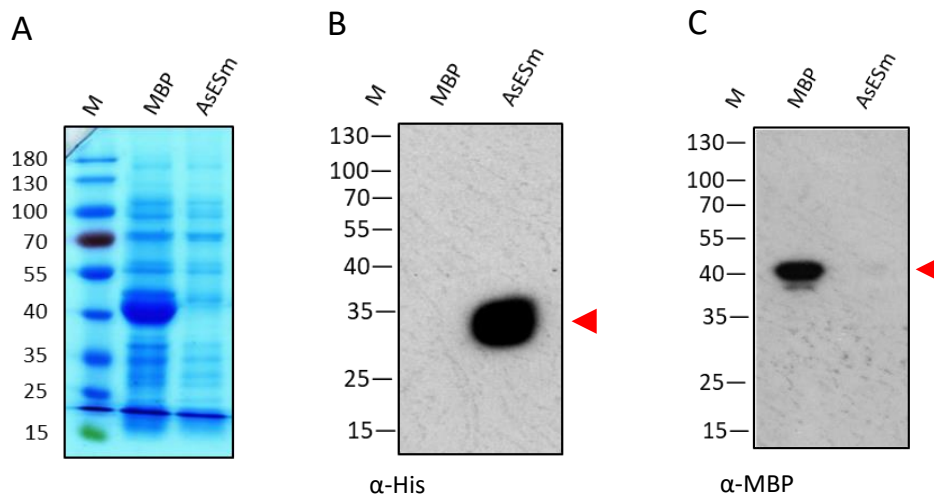


Figura 17 | Detección de AsES recombinante en el fluido osmótico. Se tomaron muestras de las proteínas periplasmáticas extraídas y fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. **A**, Tinción con Coomassie. **B**, Western blot α -His. **C**, Western blot, α -MBP. La proteína MBP fue usada como ctrl. (-) correspondiente al cultivo transformado con el vector vacío, inducido. AsESm: corresponde al cultivo transformado con la construcción p5x-AsESc, inducido.

En la figura 17, B se muestra la presencia de la proteína AsES en la fracción periplásmica. Cabe destacar que la proteína de 34 kDa detectada con anticuerpos α -His (señalada con flecha roja), corresponde a la versión madura de AsES (S8-His-tag). Estos resultados demuestran que la proteína AsESc (MBP-I9-S8-His-tag) expresada sufre un proceso de maduración post-traducciona, que implica la escisión y degradación del dominio inhibidor I9 luego de la secreción al espacio periplásmico y que el mismo ocurre de forma autocatalítica y análoga a lo que se observa para la proteína AsES-WT, aislada de *A. strictum*.

4.1.2 Optimización del proceso de expresión y purificación

La temperatura tiene un efecto muy marcado en cuanto al plegamiento y la estabilidad de las proteínas (Jana y Deb, 2005). Así y con el objeto de lograr una mejora en el rendimiento de AsES, se evaluaron diferentes temperaturas de incubación, en un rango de 37°C a 4°C, durante la etapa de inducción del cultivo. Luego, se procedió a la extracción de las proteínas periplásmicas y a su separación mediante SDS-PAGE al 10%. Nótese que la evaluación del nivel de rendimiento de la expresión de proteínas fue realizada a simple vista sobre la proteína MBP (42,5 kDa), del vector vacío empleado como control y se infirió que la concentración sería extrapolable a la proteína AsES (que no puede ser identificada a simple vista en esta etapa).

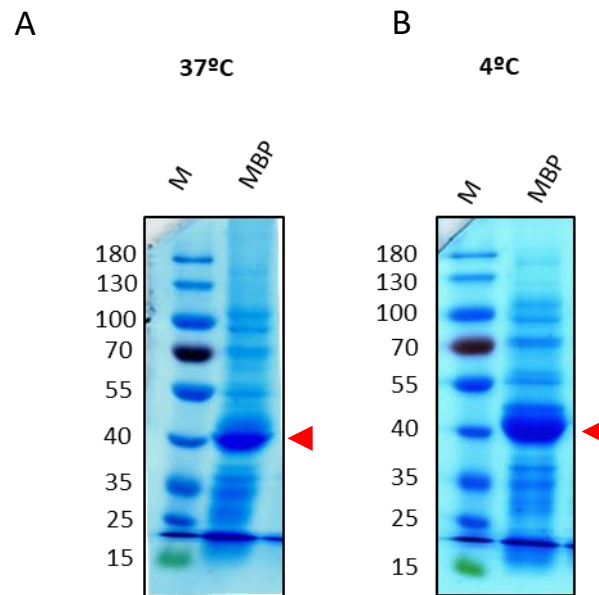


Figura 18 | Presencia de proteína MBP en la fracción periplásmica a diferentes temperaturas de inducción. Se tomaron muestras de las proteínas periplásmicas extraídas y fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. **A**, Tinción con Comasie. Proteínas periplásmicas resultantes de una incubación de 4 h, a 37°C. **B**, Tinción con Comasie. Proteínas periplásmicas resultantes de una incubación ON, a 4°C.

Como puede observarse en la figura 18, A, la cantidad de proteína MBP presente en la fracción periplásmica luego de una incubación a 37°C durante 4 h, fue significativamente menor a la presente en la misma fracción proveniente de una incubación a 4°C, ON (Figura 18, B). Estos resultados, presentaron a su vez correlación positiva con la cantidad de proteína AsES presente en la fracción periplásmica incubada en iguales condiciones. Puede observarse en la figura 19 que a una incubación a 37°C, la proteína AsESc (MBP-I9+S8-His-tag), de 87,2 kDa, no sufrió el proceso de maduración y escisión del dominio I9 (Figura 19, A), mientras que a 4°C y una incubación de al menos 12 h, la misma resultó en la proteína AsES madura (S8-His-tag) (Figura 19, B).

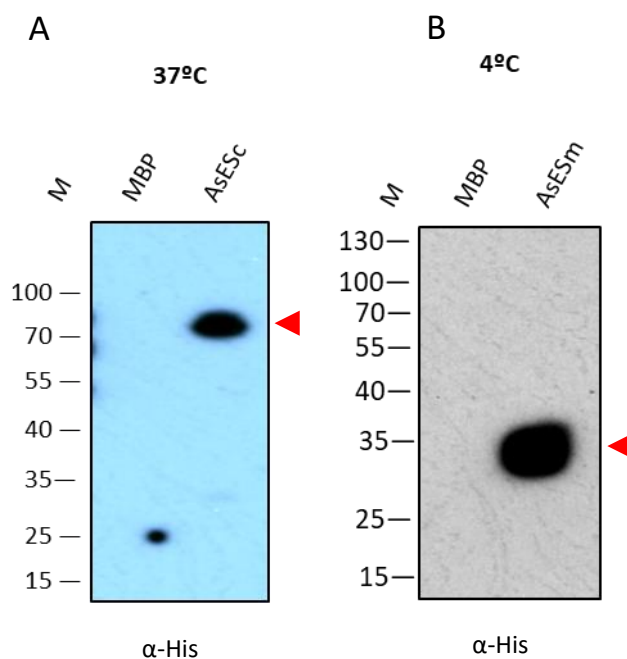


Figura 19 | Detección de proteína AsES en la fracción periplásmica a diferentes temperaturas de inducción. Se tomaron muestras de las proteínas periplásmicas extraídas y fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. **A**, Proteína AsESc presente en fracción periplásmica luego de una incubación a 37°C durante 4 h, detectada mediante western con anticuerpo α -His. **B**, Proteína AsESm presente en fracción periplásmica luego de una incubación a 4°C, ON detectada mediante western con anticuerpo α -His.

Se evaluó también el rendimiento durante una incubación a temperatura intermedia de 28°C durante 4 h. El resultado en este caso fue similar al observado para 37°C, es decir la proteína AsESc, logra ser expresada y secretada pero no sufre el proceso de maduración (Figura no mostrada).

Respecto al inductor, se evaluaron concentraciones crecientes de IPTG en un rango de entre 0,01 y 0,5 mM y no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de proteína de interés expresada (no mostrado). Se establecieron así como condiciones óptimas para la expresión de AsES, una incubación a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0,6$ momento en el cual se realiza una inducción con 0,05 mM de IPTG. La incubación prosigue a 4°C durante al menos 12 h y se procede a la extracción de las proteínas periplásmicas según se indica en la sección 3.5.2 de materiales y métodos.

La purificación de la proteína AsES recombinante se realizó por cromatografía de afinidad, haciendo uso de la etiqueta de histidinas ubicada en el extremo COO^- terminal de la misma. Se procedió según se describe en la sección 3.8 de materiales y métodos, manteniendo la temperatura a 4°C. Al momento de la elución, se evaluaron

diferentes concentraciones de imidazol y se seleccionó como óptima una concentración de 500 mM ya que concentraciones inferiores no lograron despegar toda la proteína de interés unida a la resina. Luego de la optimización del proceso en su totalidad, se obtuvieron rendimientos de aprox. 0,8 mg proteína pura AsES/L de cultivo en un periodo de producción máximo de 4 días.

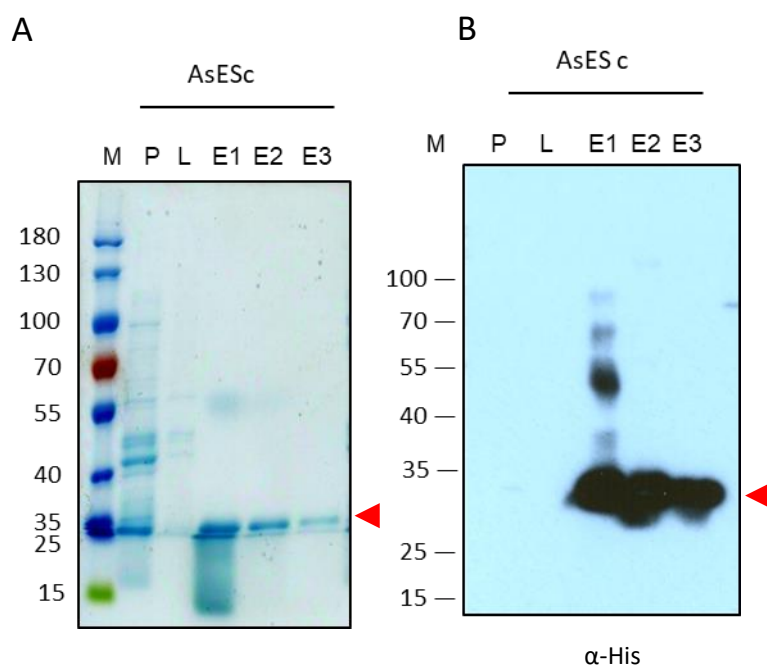


Figura 20 | Purificación de la proteína AsES por cromatografía de afinidad. Las muestras corresponden a diferentes fracciones de la etapa de purificación, separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. **A**, Tinción con Coomassie. Se sembraron 20 μ l de cada fracción. **B**, Western blot α -His. Se sembraron 3 μ l de cada fracción. M: marcador de peso molecular. P: Percolado o *flow-through*. L: lavado. E1, E2, E3: corresponden a la 1^o, 2^o y 3^o elución respectivamente.

En la figura 20, A puede observarse la proteína AsESm purificada (señalada con flecha roja) en las fracciones correspondientes a las 3 eluciones realizadas. Usando un método de detección más sensible, es posible observar en la fracción correspondiente a la 1^o elución (Figura 20, B) diferentes intermediarios proteicos que derivan en la proteína AsESm. Sin embargo, en las fracciones correspondientes a la 2^o y 3^o elución no se observan dichos intermediarios. Teniendo en cuenta esta evidencia, especulamos que el proceso de maduración de AsES en *E. coli* se iniciaría luego de la secreción al espacio periplásmico y que, dependiendo de diversos factores, entre ellos la temperatura, la maduración podría completarse durante la etapa de purificación.

4.2 Efecto del uso de un inhibidor de proteasas en la degradación de AsES

Con el objeto de evitar la degradación de proteínas blanco por acción de proteasas contaminantes propias del huésped, suele adicionarse de manera rutinaria en experimentos de expresión, uno o más inhibidores de proteasas. En este trabajo de tesis, durante el proceso de extracción de proteínas del periplasma y de purificación, se incluyó en todos los buffers un inhibidor irreversible específico de serin proteasas, denominado PMSF. Como la proteína de interés AsES es también una serin proteasa, la misma resulta inhibida por defecto al finalizar la purificación. Así, y con la finalidad de obtener proteína pura y activa, decidimos eliminar la presencia de este inhibidor de los buffers de extracción y purificación y evaluar el rendimiento y estabilidad de AsES.

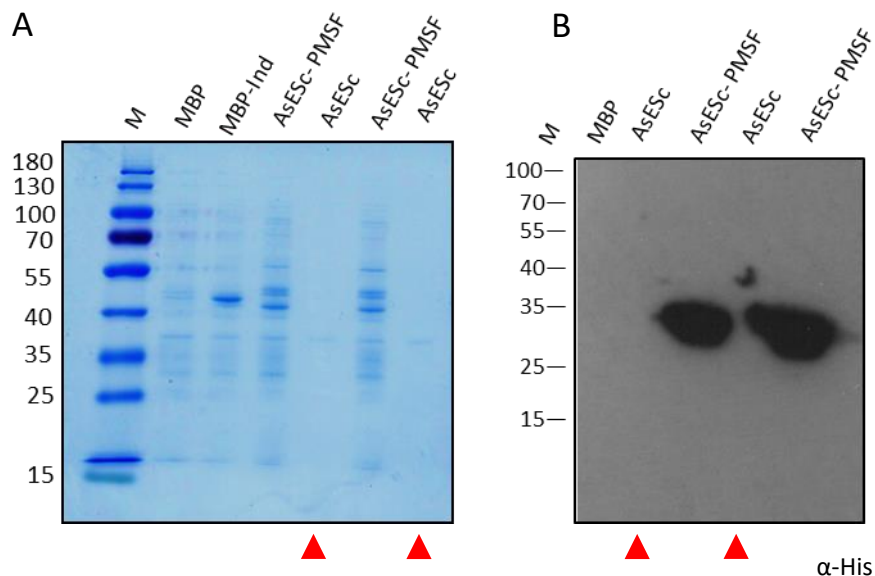


Figura 21 | Detección de la proteína AsESc en condiciones de no inhibición e inhibición enzimática. Las muestras corresponden a proteínas periplásmicas extraídas, provenientes de dos cultivos inducidos en forma independiente. Las alícuotas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10 %. Se indica con flecha roja la ausencia de proteína AsES en ausencia de PMSF. **A**, Tinción con Coomassie. Se sembraron 20 μ l de cada fracción. **B**, Western blot α -His. Se sembraron 3 μ l de cada fracción. M: marcador de peso molecular. AsESc: Proteína extraída sin PMSF. AsESc-PMSF: Proteína extraída con agregado de PMSF.

En ausencia de PMSF, indicado con flecha roja en la figura 21, A, las muestras correspondientes a la proteína AsESc y provenientes de cultivos independientes, presentaron un alto nivel de degradación. De forma contrastante, las mismas muestras

extraídas en presencia de PMSF, no presentaron aparente degradación. Estos resultados se correlacionan a su vez con los visualizados a partir del western blot en donde la proteína AsESm (S8-His-tag), sólo puede detectarse en presencia de PMSF. En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína AsES cuando es expresada en *E. coli* sufre un mayor grado de autoproteólisis que el reportado en el sistema eucariota o bien que producto de la acción de proteasas contaminantes endógenas, que no están inhibidas en ausencia de PMSF, la proteína AsES es degradada en su totalidad.

En base a estos resultados, y a la imposibilidad de eliminar el PMSF durante el proceso de purificación, se decidió evaluar la actividad inductora de la defensa de AsESm empleando proteína inhibida enzimáticamente.

4.3 Expresión de AsES en plantas de *N. benthamiana*

Los sistemas de expresión basados en plantas se consideran una plataforma valiosa para la producción de proteínas recombinantes ya que permiten la producción flexible y de bajo costo de productos bioactivos de alta calidad (Gecchele *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta el origen eucariota de AsES y el posible requerimiento de modificaciones post-traduccionales que determinen su estabilidad y que no pueden ser provistas por el sistema bacteriano utilizado, se decidió expresar la proteína AsES en plantas de *N. benthamiana*, en forma transitoria. El sistema Gateway fue utilizado para realización de los clonados. En el extremo NH₂-terminal se incluyó el péptido señal de la proteína PR1 de Arabidopsis, de localización apoplástica, buscándose con ello reproducir la secreción experimentada por AsES-WT en *A. strictum*. Los vectores de expresión utilizados permiten a su vez generar una proteína de fusión a GFP con la ventaja dual de admitir la identificación de la proteína *target* con anticuerpos α -GFP y determinar la localización subcelular de la misma.

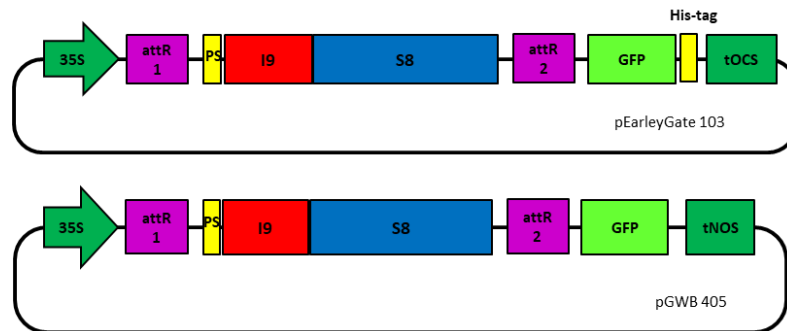


Figura 22 | Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en los ensayos de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*. pEarleyGate 103 y pGWB 405 son vectores binarios utilizados para la expresión de AsESc fusionada a GFP-His y GFP respectivamente. 35S indica el promotor del CAMV. tOCS y tNOS corresponden a los terminadores de octopina y nopalina, respectivamente. attR1 y attR2 indican el sitio donde ocurre la reacción de recombinación LR. SP indica el péptido señal de PR1 fusionado a la SCD de AsES. GFP corresponde a la proteína GFP. Todos los vectores binarios fueron introducidos en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*.

Plantas de *N. benthamiana* fueron co-infiltradas con soluciones de *A. tumefaciens* conteniendo los vectores binarios pEarleyGate 103 y pGWB 405, que expresan la proteína AsESc fusionada a GFP (Figura 22) y el vector pBin-GFP, como control (+) de expresión de GFP. La cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, fue utilizada como control (-) de expresión. Se evaluaron dos densidades ópticas diferentes (0,2 y 0,8) de cada construcción. A los 3 dpt, se tomaron muestras de las hojas agroinfiltradas y se extrajeron proteínas totales y fluido apoplástico para ser posteriormente analizadas por western blot (Figura 23, A y B).

En las fracciones correspondientes a las proteínas totales, para las dos DO analizadas, pudieron detectarse la proteína GFP (27 kDa), expresada como parte del vector pEarleyGate 103, y la proteína GFP-His (28,3 kDa), expresada como parte del vector pGWB405 (Figura 23, B). Por el contrario, no se detectó ninguna versión de la proteína AsES fusionada a GFP siendo entre las opciones, la proteína AsESc (I9+S8)-GFP-His (73 kDa) o bien la proteína madura, AsESm (S8)-GFP-His (62 kDa). Llamativamente, la detección de la proteína GFP, ubicada en el extremo COO⁻ de la proteína de fusión, demuestra que la traducción fue completada y que por lo tanto, hubo expresión de la proteína de interés. Por otra parte, la no detección de ninguna variante proteica de AsES (tampoco GFP libre) en el lavado de fluido apoplástico

estaría posiblemente relacionada al grado de dilución que presenta la mencionada fracción.

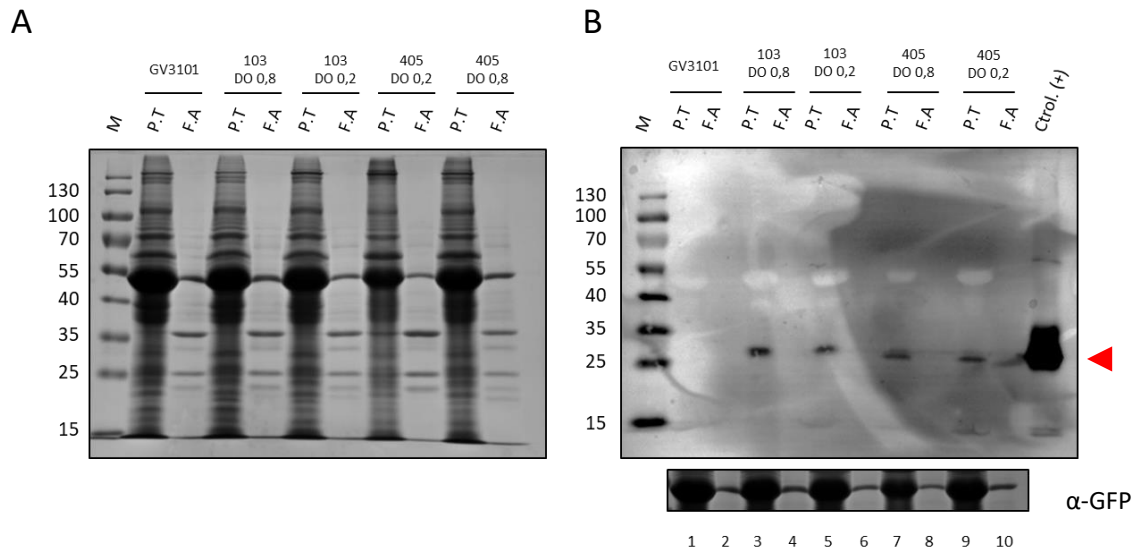


Figura 23 | Detección de la proteína AsESc expresada en *N. benthamiana*. Las proteínas totales (10 µl) y el fluido apoplástico (20 µl), ambos extraídos a partir de las hojas agroinfiltradas con pBin-p19 más pEarleyGate 103, pGWB405 y pBin-GFP, fueron corridas en gel de poliacrilamida al 10% (panel A) y analizado por western blot (panel B). La detección se realizó con anticuerpo α-GFP. La proteína Rubisco, teñida con Coomasie, fue utilizada como control de carga para cada muestra (panel inferior).

4.4 Obtención de mutantes de AsES afectadas en el sitio activo

Con el objeto de evaluar el grado de participación de la actividad enzimática de AsES en la activación de la respuesta de defensa en plantas, decidimos obtener, tanto de la proteína AsES completa (I9+S8), como de la versión madura (S8), mutantes afectadas en el sitio activo. Para ello y mediante la técnica de *overlap extension PCR* descrita en la sección 3.3 de materiales y métodos, se reemplazó la Serina 226 (Ser) del sitio activo por Alanina (Ala). La SCD de AsES con la mutación incorporada fue clonada en el vector pMAL-p5x. Se generaron así las construcciones de las mutantes denominadas AsESc^{S226A} y AsESm^{S226A} respectivamente, de secreción periplásmica que fueron introducidas en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Las condiciones de expresión y purificación empleadas para ambas mutantes fueron iguales a las optimizadas para la proteína AsESc, descritas anteriormente en este trabajo. Luego de la inducción a bajas temperaturas se tomaron muestras de las proteínas periplásmicas, de los

diferentes pasos de purificación y se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y western blot (Figura 24, A y B).

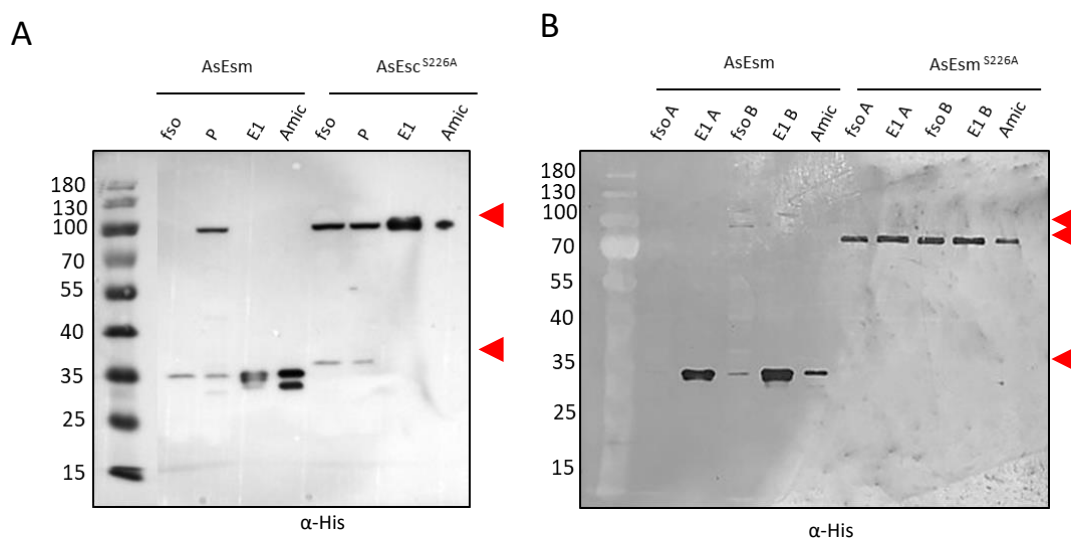


Figura 24 | Obtención de las mutantes de AsES expresadas en *E. coli*. Muestras de proteínas periplásmicas totales y de los pasos de purificación y desalado fueron tomadas, separadas mediante SDS-PAGE al 10% y analizadas por western blot. **A**, Western blot para la proteína AsESm y AsESc^{S226A}, identificadas con anticuerpo α -His. **B**, Western blot para la proteína AsESm y AsESm^{S226A}, identificadas con anticuerpo α -His. M: Marcador de peso molecular. fso: fluido de shock osmótico. P: percolado. E1: 1^o elución con imidazol. Amic: desalado y concentrado con amicones.

En la figura 24, región inferior izquierda A, se observa la detección de la proteína AsESm (S8-His), en su versión madura (34 kDa) y en forma contrastante, en la región superior derecha, se observa la versión mutante, AsESc^{S226A} (MBP-I9-S8*-His) (87 kDa). Nuevamente, en la figura 24, B, se detecta en la región inferior izquierda la proteína AsESm (S8-His), en su versión madura y en la región superior derecha, la versión mutante de AsESm^{S226A} (MBP-S8*-His) (77 kDa). Nótese que la diferencia de peso molecular entre AsESc^{S226A} y AsESm^{S226A}, es debido a la ausencia del dominio I9 en la última proteína y que ambas se encuentran fusionadas a la proteína MBP. En el caso de la mutante AsESc^{S226A}, no se observa el proceso de autocatálisis y por lo tanto escisión del dominio I9, lo que es un indicativo de ausencia de actividad enzimática.

4.5 Determinación de la actividad proteolítica tipo subtilisina

A fin de confirmar la ausencia de actividad proteolítica de las proteínas recombinantes AsESm (S8-His) y de las mutantes AsESc^{S226A} (MBP-I9-S8-His) y

AsESm^{S226A} (MBP-S8-His), se evaluó la capacidad de las mismas de hidrolizar el sustrato cromogénico Suc-AAPF-*p*NA mediante la medición de liberación de *p*NA que absorbe a $\lambda=405$ nm (Moallaei *et al.*, 2006). Para ello se procedió según se indica en la sección 3.10 de materiales y métodos.

Tratamiento	Actividad proteolítica (U ml ⁻¹)	Actividad proteolítica específica (U mg proteína ⁻¹)
AsES-WT	28,80	76,43 <i>a</i>
AsESm	0,014	0,24 <i>b</i>
AsESc ^{S226A}	0,013	0,22 <i>b</i>
AsESm ^{S226A}	0,016	0,32 <i>b</i>

Tabla 6 | Ensayo proteolítico para detectar actividad enzimática con el péptido Suc-AAPF-*p*NA. Las letras minúsculas indican diferencias significativas según los p-valor corregidos por Bonferroni ($p < 0,001$) obtenidos después de realizar ANOVA y la posterior prueba LSD post-hoc. Cada valor representa la media (S.D.) de tres replicas independientes.

La tabla 6 muestra los valores de actividad proteolítica y actividad proteolítica específica (referida a la concentración de cada proteína en la mezcla de reacción). La proteína AsES-WT, purificada a partir del sobrenadante de *A. strictum*, fue utilizada como control positivo de actividad enzimática. Las proteínas AsESm, y las mutantes AsESc^{S226A} y AsESm^{S226A} no presentan diferencias significativas en los parámetros analizados entre ellas y si lo hacen respecto a la proteína control (AsES-WT). A partir de estos resultados y como era previsible, puede concluirse que las proteínas AsESm (inhibida con PMSF) y las mutantes afectadas en el sitio activo AsESc^{S226A} y AsESm^{S226A}, no presentan actividad proteolítica tipo subtilisina *in-vitro*.

4.6 Obtención de péptidos de AsES

La actividad inductora de la defensa de determinados compuestos como flagelina, factor de elongación, proteínas de la familia de cerato-plataninas, etc. reside en epitopes inmunogénicos que forman parte de la estructura de la proteína (Felix *et al.*, 1999; Kunze *et al.*, 2004; Frías *et al.*, 2011). Con la finalidad de evaluar si fragmentos pertenecientes a la región madura de AsES son capaces de reproducir el

efecto inductor de la proteína global, se expresaron y purificaron 3 fragmentos/péptidos superpuestos entre sí en 25 aa y que en conjunto, abarcan la totalidad de la región S8 de la proteína AsES (Figura 25).

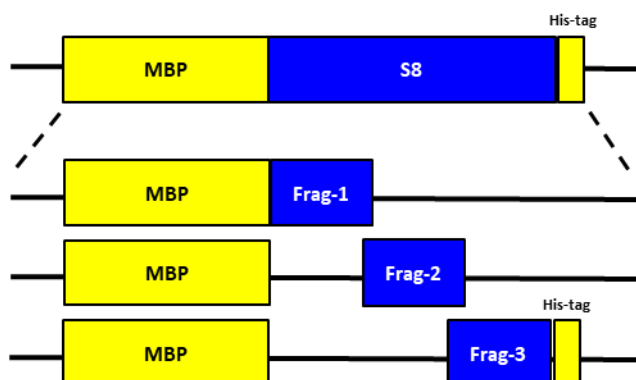


Figura 25 | Esquema de la secuencia codificante para los fragmentos de AsES clonada en el vector pMAL-C4E.

La SCD para los fragmentos de AsES, denominados Frag-1, Frag-2 y Frag-3, según se indica en la figura 25, fue clonada en el vector pMAL-C4E. Los péptidos fueron expresados en el citoplasma y luego de la lisis celular fueron extraídos de la fracción soluble y purificados mediante cromatografía de afinidad haciendo uso en este caso, de la proteína MBP como etiqueta para facilitar la purificación.

kDa	Frag-1	Frag-2	Frag-3	MBP
Frag-1	12,6			
Frag-2		13,3		
Frag-3			10,6	
MBP	59,4	59,2	58,2	42,5

Tabla 7 | Tabla indicativa del peso molecular esperado para cada fragmento de AsES, según si está fusionado o no a MBP.

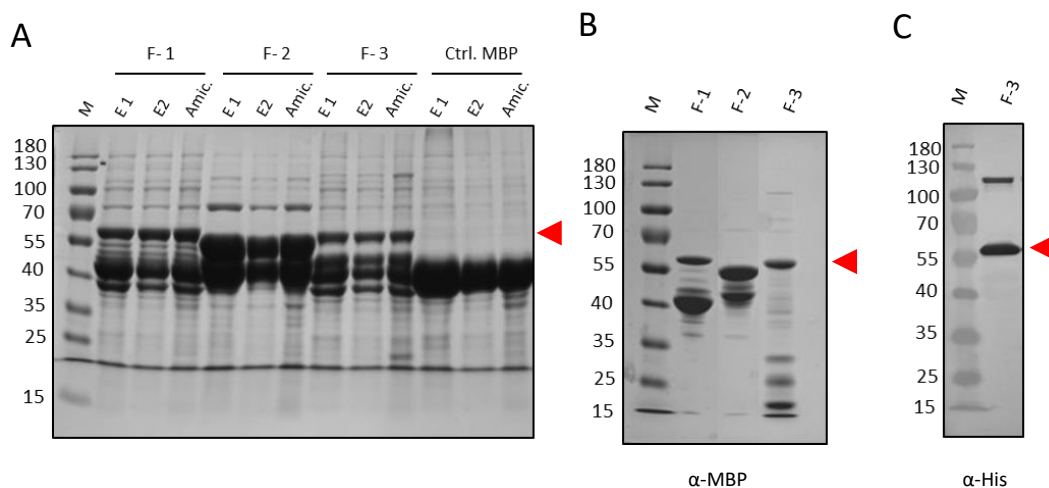


Figura 26 | Obtención de fragmentos de AsES expresados en *E. coli*. Muestras del proceso de purificación y de la fracción desalada, fueron tomadas, separadas mediante SDS-PAGE al 10% y **A**, analizadas por Coomassie y **B**, western blot, con los anticuerpos α -MBP y **C**, α -His (C, sólo para el fragmento 3). M: Marcador de peso molecular. E1-E2: N° de elución del proceso de purificación. Amic: desalado y concentrado con amicones.

Según se muestra en la figura 26, A, los fragmentos de AsES pudieron ser expresados en forma soluble y consecuentemente purificados. La presencia de los mismos pudo confirmarse mediante western blot con anticuerpos específicos (Figura 26, B y C). Si bien la purificación de los fragmentos de interés muestra no estar optimizada debido a la existencia de otras especies proteicas en las fracciones purificadas (Figura 26, A y B), puede notarse la presencia de una proteína mayoritaria, incluso en mayor cantidad que los fragmentos de interés, cuyo peso molecular se corresponde con el de MBP (42,5 kDa). La naturaleza constitutiva de MBP en el huésped de expresión, podría explicar estos resultados debido a que se une fuertemente a la resina de amilosa y resulta co-eluida junto a los fragmentos de interés durante el agregado de maltosa. Si bien, la expresión de la misma puede ser disminuida con el agregado de glucosa al medio, no puede ser eliminada completamente. Con ello, sería necesaria una segunda purificación o bien una purificación alternativa, que en el caso de los fragmentos 1 y 2 no se realizó y en el caso del fragmento 3, se optó por purificación con la resina de Ni-NTA, haciendo uso del His-tag. (Figura 26, C).

4.7 Validación funcional de la actividad inductora de la defensa

4.7.1 Estudio de la protección frente a *B. cinerea* inducida por la proteína AsES recombinante y sus variantes inactivas en plantas de *Arabidopsis*

En nuestro grupo de trabajo, fue previamente reportado que el pre-tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con la proteína AsES, produce la activación de las defensas que deriva en protección frente al patógeno *B. cinerea*, de manera dosis y tiempo dependiente (Hael-Conrad *et al.*, 2015). Con la finalidad de confirmar que las proteínas recombinantes obtenidas, AsESm y las mutantes AsESc^{S226A} y AsESm^{S226A}, tienen actividad inductora similar, plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas de edad fueron pre-tratadas y 48 horas después fueron infectadas con *B. cinerea*. El efecto protector se evaluó en plantas Col-0 y en la triple mutante *fls2, efr, cerk1 (fec)*, que tiene mutados los genes de los principales PRR, cuyos ligandos, en caso de estar presentes como contaminantes trazas, pueden generar un falso efecto inductor.

A las 48 h posteriores a la infección (hpi), las plantas Col-0 y *fec* presentaron una reducción significativa (más del 60%) del área de la lesión en comparación con las plantas control (tratadas con el vector vacío), para los tratamientos AsESm y AsESm^{S226A} (Figura 27, paneles A y B). Este efecto protector se extendió a las 72 h con una reducción del área de la lesión de aproximadamente el 50% para ambos tratamientos (Figura 27, A, B, C y D). Por el contrario, si bien las plantas Col-0 y *fec*, tratadas con la proteína AsESc^{S226A}, presentaron una reducción significativa del área de lesión respecto a las plantas control (de aprox. el 30% a las 48 h y del 40% a las 72 h), esta diferencia resulta menor cuando se compara con los otros 2 tratamientos (AsESm y AsESm^{S226A}) realizados (Figura 27, A, B, C, D). Por otra parte, el tratamiento de plantas con la proteína AsES-WT, utilizada como control positivo de protección, presenta valores similares a los tratamientos con AsESm y AsESm^{S226A} (Figura 28, A y B). La proteína MBP, utilizada como control negativo de protección (para AsESm^{S226A} y AsESc^{S226A}), no genera una reducción significativa del área de lesión (Figura 28, A y B).

En conjunto, estos resultados indican que AsESm y AsESm^{S226A} tienen un efecto protector contra *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis*, de manera similar a lo observado para AsES-WT (Figura 28 y Figura 29) (Hael-Conrad *et al.*, 2015). La proteína

AsESc^{S226A} si bien posee un efecto protector diferencial, es menor al reportado para AsES-WT.

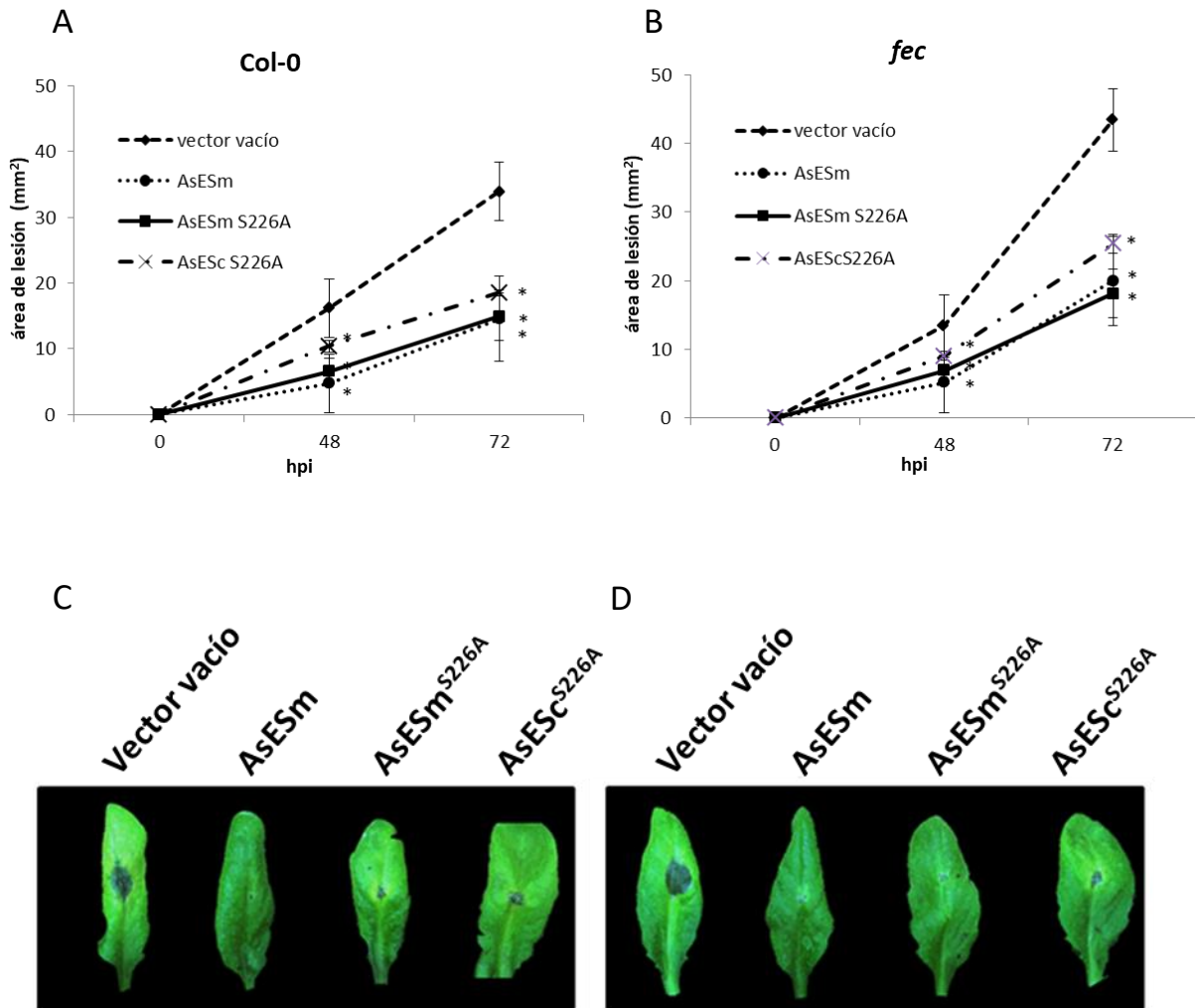


Figura 27 | Efecto protector de AsESm, AsESm^{S226A} y AsESc^{S226A} contra *B. cinerea* en plantas de Arabidopsis. Curso temporal del desarrollo del área de lesión causada por *B. cinerea* en plantas de Arabidopsis, ecotipo Col-0 (A) y en la mutante *fls2, efr, cerk1* (background Col-0) (B). Las plantas fueron tratadas con AsES (60 nM), AsESm^{S226A} (60 nM) y AsESc^{S226A} (60 nM) durante 48 h y el área de lesión fue evaluada a las 48 h y 72 h posteriores a la infección (hpi). Los valores se presentan como la media \pm SE y fueron obtenidos de tres experimentos independientes (n=8). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre las plantas tratadas respecto al control según la prueba t-test ($p < 0,05$). Aspecto fenotípico de las hojas infectadas con *B. cinerea* a las 72 hpi, de plantas Col-0 (C) y mutante *fec* (D) Se muestra una imagen representativa de cada tratamiento.

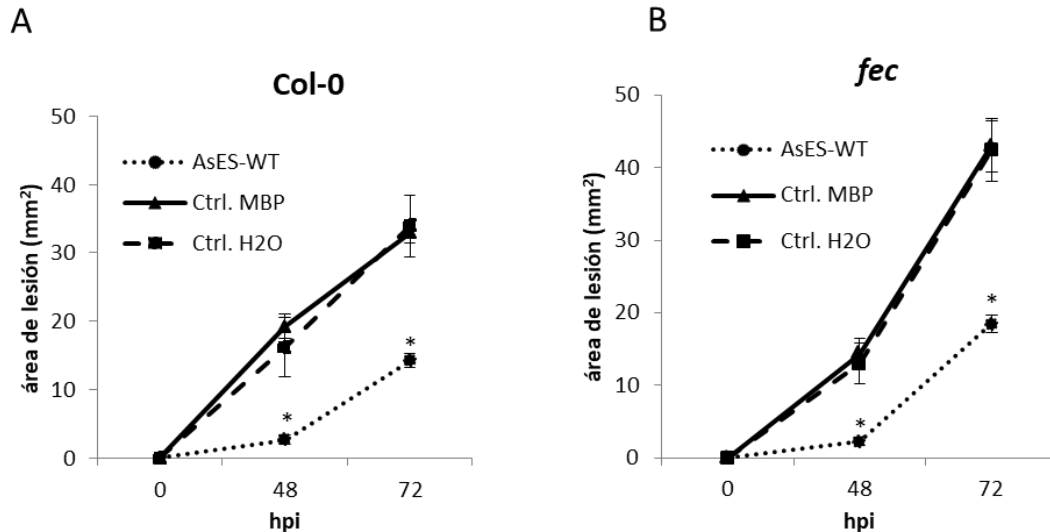


Figura 28 | Curso temporal del desarrollo del área de la lesión causada por *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis*. **A**, *Arabidopsis*, ecotipo Col-0. **B**, *Arabidopsis* mutante *fec* (*background* Col-0). AsES-WT (60 nM), control de protección positivo y proteína pura MBP (60 nm), control negativo para AsESm^{S226A} y AsESc^{S226A} fueron rociados en las hojas de las plantas a evaluar y 48 h después fueron infectadas. El área de la lesión se evaluó a las 48 y 72 hpi. Los valores medios \pm SE se obtuvieron de tres experimentos independientes (n=8). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre el control y los tratamientos analizados, según t-test ($p < 0,05$).

4.7.2 Estudio de la activación de genes asociados a defensa en plantas de *Arabidopsis*

Nuestro grupo de trabajo reportó anteriormente que el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con la proteína AsES-WT, deriva en la activación de las vías de señalización del ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y del etileno (ET) y que existe además, un *cross-talk* hormonal entre los genes inducidos de las vías del AS y ET (Hael-Conrad *et al.*, 2015). Con el objeto de determinar si las proteínas AsESm y AsESm^{S226A} son capaces de activar una respuesta de defensa a través de las principales vías de señalización, se analizó la expresión de un set de transcritos cuya expresión es dependiente de los niveles de AS, AJ y ET. Entre los genes marcadores estudiados se encuentran *PR-1* (Spoel *et al.*, 2009) y *WRKY70* (Li *et al.*, 2006) por su conocido papel regulador en la vía del AS. Se evaluó también la expresión de *ERF6* dado su rol central en la ruta de señalización mediada por JA/ET (Moffat *et al.*, 2012). Debido a que la mayor reprogramación transcripcional inducida por AsES-WT fue observada entre las 4 hpt y las 48 hpt (Chalfoun *et al.*, 2013; Hael-Conrad *et al.*, 2015), decidimos centrarnos en esta ventana de tiempo para los análisis de expresión génica. Dada la importancia

de evitar resultados falsos positivos (sobreexpresión génica inducida por contaminantes), los tratamientos fueron realizados a ambos tiempos en plantas mutantes *fec*. El grado de expresión en las plantas Col-0 se analizó sólo a las 4 h, ya que la intención fue emplearlas simplemente como control de comportamiento de las proteínas evaluadas.

El análisis de qPCR mostró que el nivel de expresión de *PR-1* fue significativamente mayor a las 4 hpt en plantas *fec*, después del tratamiento con AsESm y AsESm^{S226A} y en comparación con las plantas control (tratadas con el vector vacío) (Figura 29, A). El mismo efecto de incremento en el nivel de expresión, se observó en las plantas Col-0 a igual tiempo (Figura 30, A). A las 48 hpt, si bien el mayor nivel de expresión de *PR-1* se mantuvo, fue levemente menor para ambos tratamientos, en comparación con las plantas control (Figura 29, A). Por otra parte, la expresión de *WRKY70* se indujo significativamente a las 4 hpt, para ambos tratamientos (Figura 29, B) en las plantas *fec* y también en Col-0 (Figura 30, B). Sin embargo, a las 48 hpt la expresión disminuyó (Figura 29, B). En contraste, *ERF6* disminuyó su expresión de manera significativa a las 4 hpt tanto en las plantas *fec* (Figura 29, C) como en Col-0 (Figura 30, C) y se mantuvo inactivo a las 48 hpt, para ambos tratamientos (Figura 29, C). En conjunto, estos resultados indican que las proteínas recombinantes AsESm y AsESm^{S226A} producen un patrón similar de reprogramación transcripcional de los genes de defensa involucrados en las vías de señalización de AS y ET, al igual que AsES- WT.

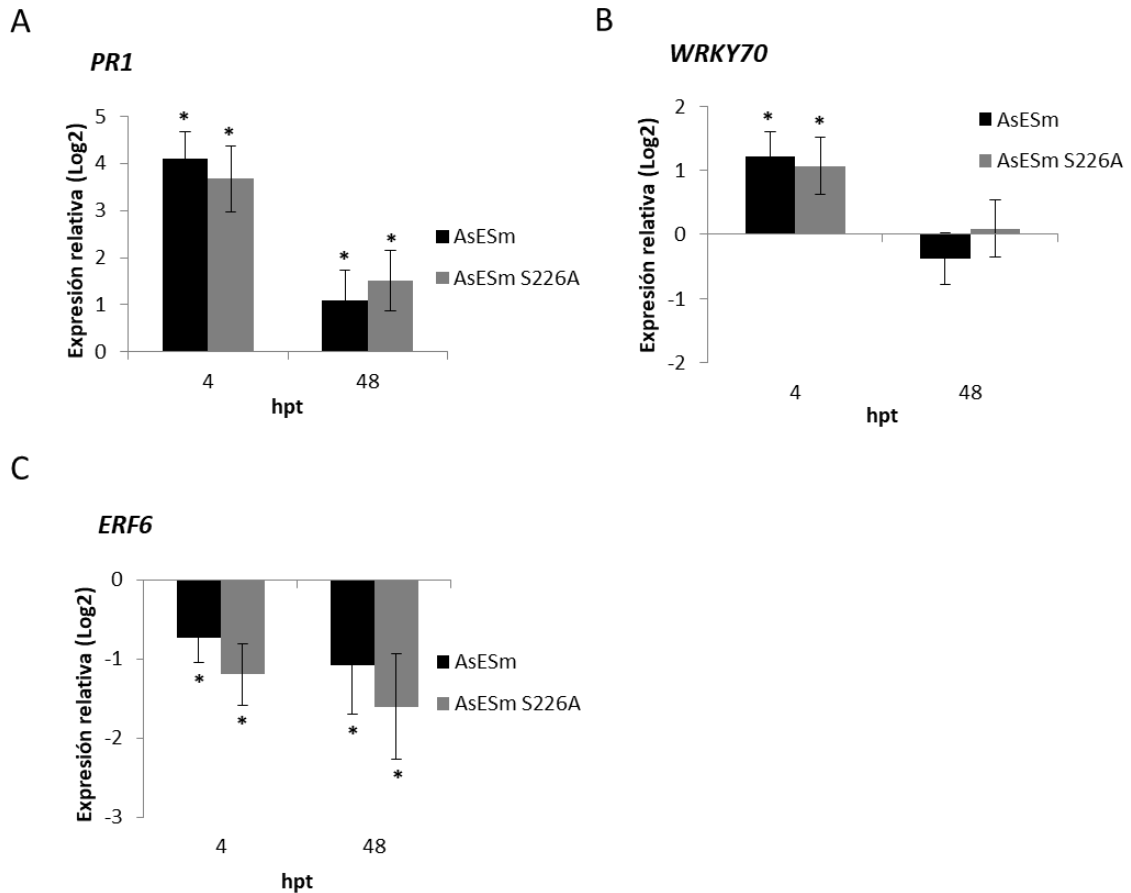


Figura 29]. Las proteínas AsESm y AsESm^{S226A} inducen el aumento del nivel de expresión de genes asociados a la defensa en plantas *fec*. Los niveles relativos de ARNm de *PR1* (**A**), *WRKY70* (**B**) y *ERF6* (**C**) fueron determinados por medio de la técnica de qPCR en plantas *fec* tratadas con AsESm (60 nM) y AsESm^{S226A} (60 nM) y comparadas con los niveles de expresión de plantas *fec* tratadas con el vector vacío, a las 4 y 48 hpt. Las plantas no inducidas (vector vacío) se utilizaron como control y su nivel de expresión se estableció arbitrariamente en uno (Log₂ (1) = 0). Los datos corresponden a la media ± S.E de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de P < 0,05).

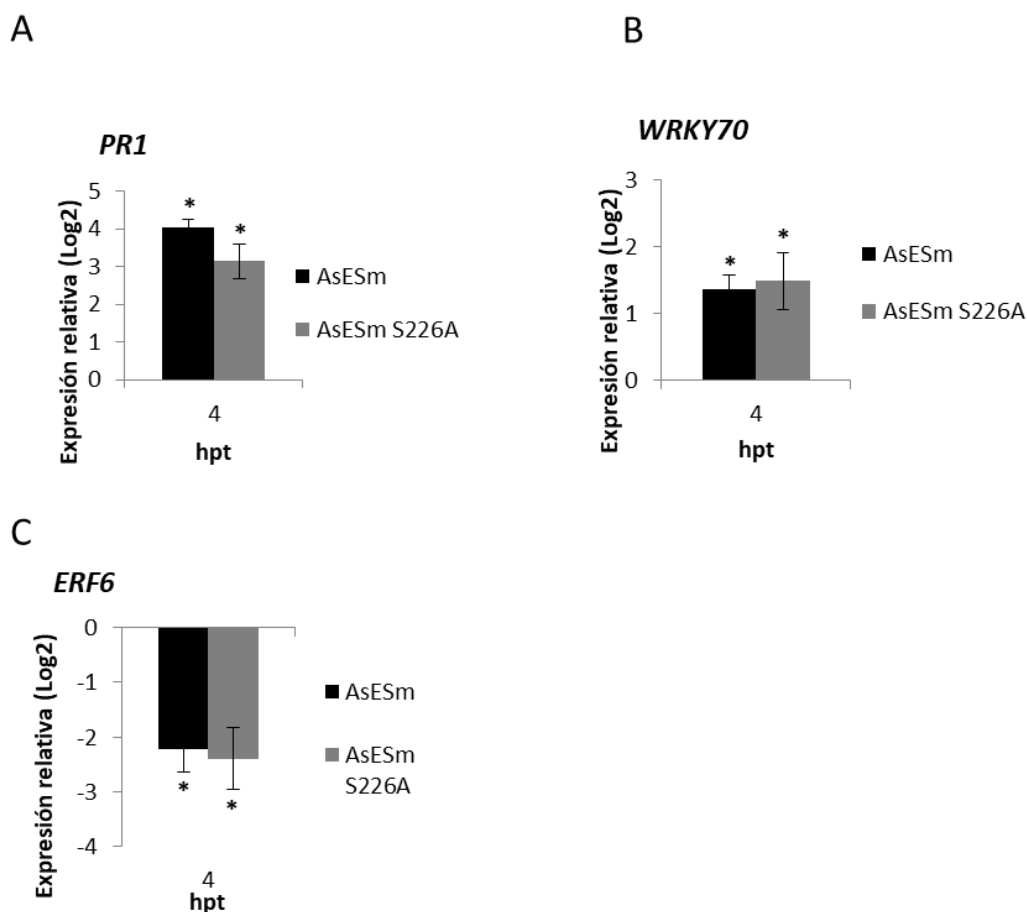


Figura 30 | Las proteínas AsESm y AsESm^{S226A} inducen la sobreexpresión de genes asociados a la defensa en plantas Col-0. Los niveles relativos de ARNm de *PR1* (A), *WRKY70* (B) y *ERF6* (C) fueron determinados por medio de la técnica de qPCR en plantas Col-0 tratadas con AsESm (60 nM) y AsESm^{S226A} (60 nM) y comparadas con los niveles de expresión de plantas Col-0 tratadas con el vector vacío, a las 4 hpt. Las plantas no inducidas (vector vacío) se utilizaron como control y su nivel de expresión se estableció arbitrariamente en uno (Log₂ (1) = 0). Los datos corresponden a la media ± S.E de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de P < 0,05).

4.7.3 Estudio de la expresión de genes marcadores de tipo PTI

Debido a que AsES y AsESm^{S226A} mostraron la capacidad de activar genes de defensa asociados a las principales vías de señalización, nos preguntamos si estos cambios en la regulación transcripcional podrían estar también asociados a una respuesta de tipo PTI. Para ello, evaluamos los niveles de expresión de dos genes marcadores de PTI ampliamente estudiados que son *FRK1* y *WRKY53* (Asai *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012). Luego del tratamiento de las plantas *fec* con AsES

y AsES^{S226A}, se observó que de los niveles de expresión de *FRK1* y *WRKY53* aumentaron significativamente a las 4 hpt, pero esta regulación se perdió a las 48 hpt (Figura 31, A y B respectivamente). Igual comportamiento de sobreexpresión se observó en ambos genes a las 4 hpt en plantas Col-0 y para ambos tratamientos (Figura 32, A y B respectivamente). La expresión incrementada de genes marcadores asociados a PTI, revela que existe una asociación estrecha entre la defensa mediada por AsES y la activación de una respuesta de defensa de tipo PTI.

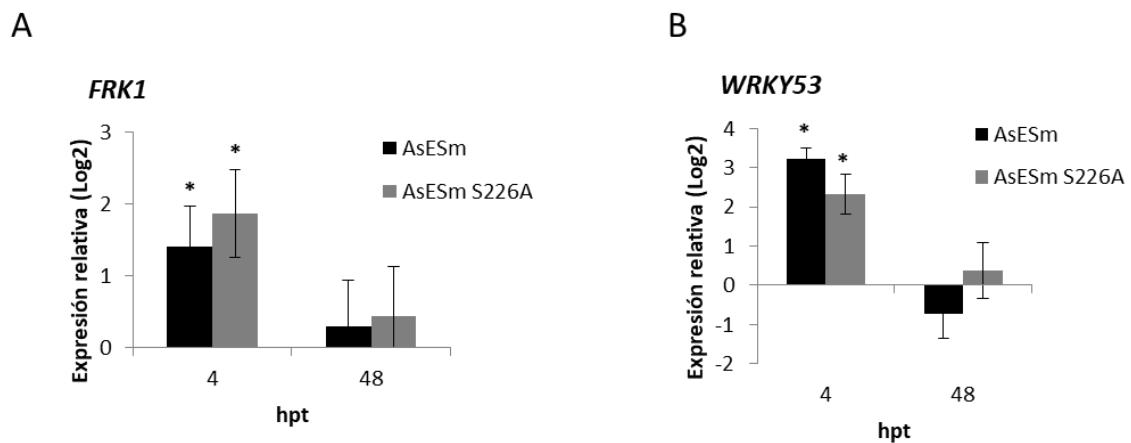


Figura 31 | Incremento en el nivel de expresión de genes marcadores de respuesta de tipo PTI inducido por AsESm y AsESm^{S226A} en plantas *fec*. Los niveles relativos de ARNm de *FRK1* (A) y *WRKY53* (B) fueron determinados por medio de la técnica de qPCR en plantas *fec* tratadas con AsESm (60 nM) y AsESm^{S226A} (60 nM) y comparadas con los niveles de expresión de plantas *fec* tratadas con el vector vacío, a las 4 y 48 hpt. Las plantas no inducidas (vector vacío) se utilizaron como control y su nivel de expresión se estableció arbitrariamente en uno ($\text{Log}_2(1) = 0$). Los datos corresponden a la media \pm S.E de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de P < 0,05).

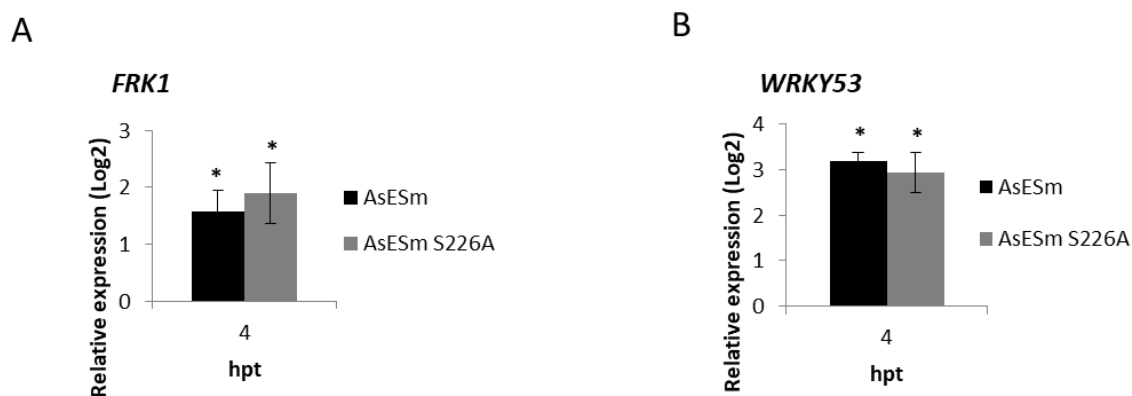


Figura 32 | Incremento en el nivel de expresión de genes marcadores de respuesta de tipo PTI inducido por AsESm y AsESm^{S226A} en plantas de *Arabidopsis* Col-0. Los niveles relativos de ARNm de *FRK1* (**A**) y *WRKY53* (**B**) fueron determinados por medio de la técnica de qPCR en plantas Col-0 tratadas con AsESm (60 nM) y AsESm^{S226A} (60 nM) y comparados con los niveles de expresión de plantas Col-0 tratadas con el vector vacío, a las 4 hpt. Las plantas no inducidas (vector vacío) se utilizaron como control y su nivel de expresión se estableció arbitrariamente en uno (Log₂ (1)=0). Los datos corresponden a la media \pm S.E de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de P <0,05).

4.7.4 Estudio de la inhibición del crecimiento en plántulas de *Arabidopsis* como respuesta a la activación de las defensas

Existe un fino balance antagónico entre el crecimiento e inmunidad en plantas. Así, se cree que la inhibición del crecimiento de una plántula (SGI, del inglés, *seedling growth inhibition*), representa una extrapolación del proceso de inhibición del crecimiento que normalmente ocurre con menos intensidad luego de la percepción de compuestos derivados de un patógeno/PAMP (Lozano-Durán y Zipfel, 2015). Dado que AsESm y AsESm^{S226A} activan la expresión de genes de tipo PTI, hipotetizamos que AsESm y AsESm^{S226A} también serían capaces de inhibir el crecimiento de las plántulas, otro evento característico ante una respuesta de tipo PTI. Los resultados mostraron que las plántulas *fec* sumergidas durante 5 días en medio MS suplementado con una solución de AsESm o AsESm^{S226A}, presentaron una reducción significativa en el peso fresco cuando fueron comparadas con las plantas mock (crecidas en medio MS suplementado con solución del vector vacío) (Figura 33, A y B). Por otra parte y como era previsible, las plántulas *fec* resultaron insensibles al péptido sintético flg22, utilizado en este ensayo como control (Figura 33, A y B).

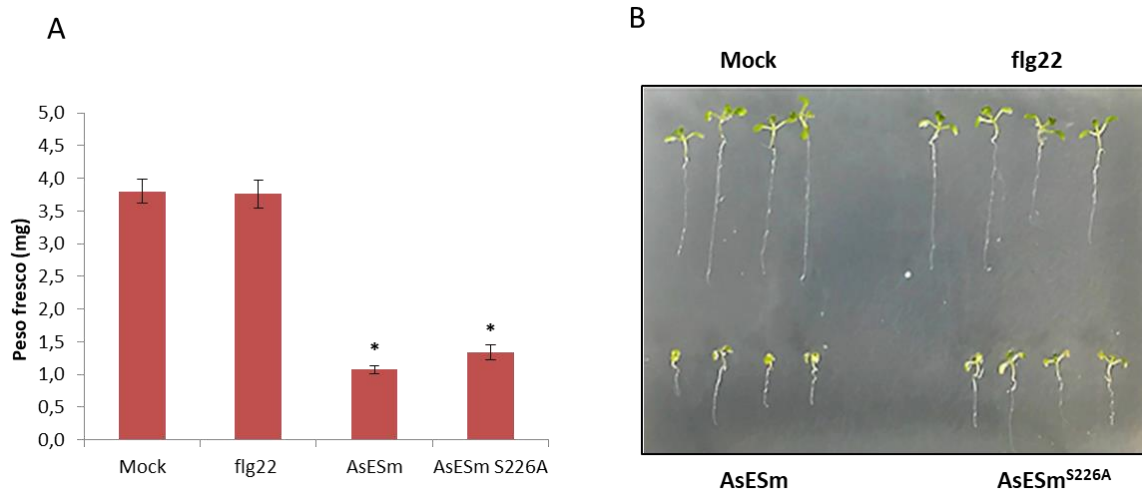


Figura 33 | Inhibición del crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* inducido por AsESm y AsESm^{S226A}. **A**, Las semillas de la mutante *fec* fueron germinadas durante 5 días en medio 0,5 X MS y luego transferidas durante un período adicional de 5 días al medio 0,5 X MS líquido suplementado con AsESm (60 nM) o AsESm^{S226A} (60 nM). Se usó flg22 (100 nM) como control de la mutante. Los datos corresponden a la media \pm SE de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de $P < 0,05$). **B**, Aspecto fenotípico de plántulas mutantes de *Arabidopsis* de 10 días (*fec*) tratadas con AsESm (60 nM), AsESm^{S226A} (60 nM) o flg22 (100 nM) durante 5 días.

Se muestra también como contraparte, el efecto en el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* Col-0, crecidas en medio MS suplementado con AsESm y AsESm^{S226A}. Puede observarse también una reducción significativa en el peso fresco total en comparación con las plantas mock al cabo de 5 días (Figura 35, panel A y B). El tratamiento de plántulas con el péptido flg22, muestra en este caso una reducción significativa del peso fresco en la variedad salvaje de *Arabidopsis* (Figura 34, A y B).

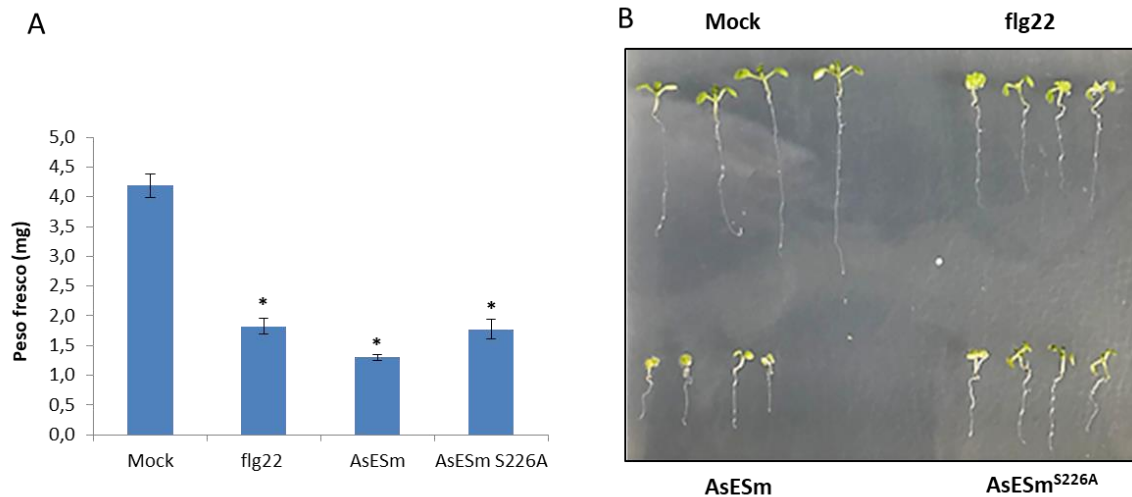


Figura 34 | Inhibición del crecimiento de las plántulas de Arabidopsis inducido por AsESm y AsESm^{S226A}. **A**, Las semillas de plantas de Arabidopsis Col-0 fueron germinadas durante 5 días en medio 0,5 X MS y luego transferidas durante un período adicional de 5 días al medio 0,5 X MS líquido suplementado con AsESm (60 nM) o AsESm^{S226A} (60 nM). Se usó flg22 (100 nM) como control positivo de inhibición del crecimiento. Los datos corresponden a la media \pm SE de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de $P < 0,05$). **B**, Aspecto fenotípico de plántulas Col-0 de Arabidopsis de 10 días tratadas con AsESm (60 nM), AsESm^{S226A} (60 nM) o flg22 (100 nM) durante 5 días.

4.7.5 Estudio de la participación del co-receptor BAK1 en la respuesta de defensa inducida por AsES

La proteína BAK1/SERK3 es una quinasa receptora con repeticiones ricas en leucina (LRR-RK) involucrada en los eventos iniciales de PTI, siendo requerida para la transducción de señales en respuesta a varios inductores de tipo PAMP en plantas (Zipfel y Robatzek, 2010; Kim *et al.*, 2013). Dado que AsESm y AsESm^{S226A} inducen eventos característicos de una respuesta de tipo PTI, nos propusimos investigar si BAK1 está implicado en transducción de señales inducidas por AsEs. Para ello, se realizaron ensayos de desafío contra *B. cinerea* en la triple mutante de Arabidopsis denominada *fls2, efr, bak1.5* (Xin *et al.*, 2016) la cual, además de tener mutados los genes de los receptores para flagelina y factor de elongación, es *knock-out* para la proteína BAK1 siendo por lo tanto incapaz de transducir una señal ante un inductor de tipo PAMP-BAK1 dependiente. Los resultados fueron comparados con los de la mutante *fec* y la variedad salvaje Col-0. Luego del tratamiento con AsESm o AsESm^{S226A}, las plantas mutantes *fls2, efr, bak1.5* no lograron reducir de manera significativa el

área de lesión respecto a las plantas control, de manera que no se observó protección contra *B. cinerea* a los tiempos evaluados (48 y 72 hpi) (Figura 35, A y B).

Los resultados hasta aquí obtenidos permiten concluir que BAK1 estaría implicado en la transducción de señales inducidas por AsES ya que en su ausencia se pierde la protección anteriormente observada contra *B. cinerea*. En conjunto, los resultados sugieren que la percepción de AsES es a nivel de membrana y que por lo tanto puede considerarse un inductor de tipo PAMP.

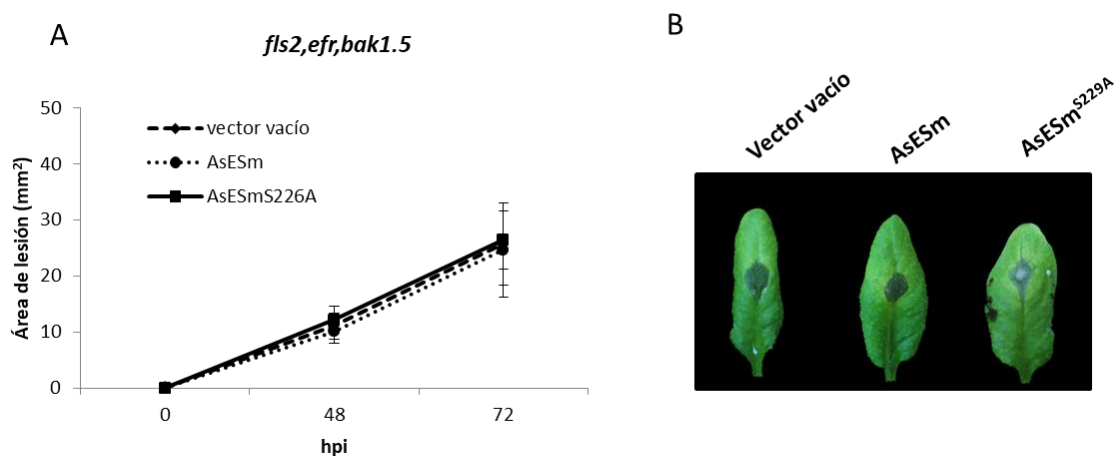


Figura 35 | El co-receptor BAK1 es requerido para la actividad inductora de AsES. **A**, Curso temporal del desarrollo del área de lesión causada por *B. cinerea* en plantas de *Arabidopsis* mutantes *fls2, efr, bak1.5* (*background* Col-0). Las plantas fueron tratadas con AsES (60 nM), AsESm^{S226A} (60 nM) durante 48 h y el área de lesión fue evaluada a las 48 y 72 horas posteriores a la infección (hpi). Los valores se presentan como la media \pm SE y fueron obtenidos de tres experimentos independientes (n = 8). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre las plantas tratadas respecto al control según la prueba t-test ($p < 0,05$). **B**, Aspecto fenotípico de hojas de plantas de *Arabidopsis* mutantes *fls2, efr, bak1.5* infectadas con *B. cinerea* a las 72 hpi.

4.7.6 Evaluación de la actividad inductora de fragmentos de AsES

Se demostró anteriormente en este trabajo de tesis que la actividad inductora de AsES no está ligada a la actividad enzimática ya que tanto la proteína inhibida por el agregado de un inhibidor específico como la proteína inactiva enzimáticamente por una mutación en el sitio activo, son capaces de inducir una respuesta de defensa en plantas de *Arabidopsis*. Debido a ello, nos propusimos investigar si la mencionada actividad inductora está determinada por un epítopo funcional que forma parte de la

estructura de la proteína. Así, los péptidos de AsES obtenidos según se detalla en la sección 4.6 de resultados y que en su conjunto abarcan la totalidad de la estructura primaria del dominio S8 de la proteína, fueron evaluados en su capacidad de imitar el efecto inductor de AsES. Para ello, en primera instancia se realizó un ensayo de inhibición de crecimiento en plántulas de *Arabidopsis*, tanto en la mutante *fec* como en la variedad Col-0 y se evaluaron dos concentraciones diferentes de cada péptido: la concentración mínima a partir de la cual la proteína AsES induce una respuesta de defensa (60 nM) y una concentración 33 veces superior (2 μ M). Los resultados mostraron que para la menor concentración evaluada no se observó una disminución significativa en el peso fresco total de las plántulas en ninguna de las variantes analizadas (datos no mostrados) mientras que para la mayor concentración (2 μ M), se observó una disminución significativa en el peso fresco para los tratamientos F-2 y F-3, tanto en las plántulas Col-0 como en la mutante *fec* (Figura 36).

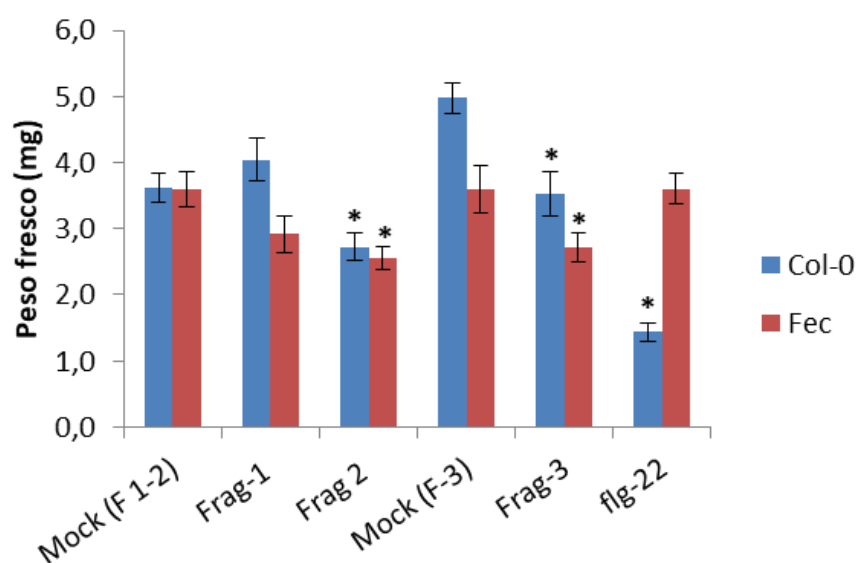


Figura 36 | Los fragmentos 2 y 3 inhiben el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis*. Las semillas de plantas de *Arabidopsis* Col-0 y *fec* fueron germinadas durante 5 días en medio 0,5 X MS y luego transferidas durante un período adicional de 5 días al medio 0,5 X MS líquido suplementado con Frag-1 (2 μ M), Frag-2 (2 μ M) y Frag-3 (2 μ M). Se usó flg22 (100 nM) como control positivo de inhibición del crecimiento en la variedad Col-0. Las plantas mock corresponden a aquellas tratadas con el vector vacío purificado con resina de amilosa (para Frag-1 y 2) o con vector vacío purificado con resina de Ni-NTA (Frag-3) según la etiqueta que se usó para purificar cada péptido. Los datos corresponden a la media \pm SE de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de $P < 0,05$).

Posterior al ensayo de inhibición, se realizó un ensayo de q-PCR en donde se evaluó el nivel de expresión de los genes *PR1*, *WRKY70* y *FRK1* a las 4 hpt, tiempo en el cual se observó previamente la mayor sobreexpresión inducida por la proteína AsES. En forma contraria a los resultados obtenidos anteriormente, ninguno de los 3 fragmentos evaluados logró aumentar el nivel de expresión de los genes analizados. Adicionalmente los genes evaluados mostraron una disminución significativa del nivel de expresión al tiempo evaluado (Figura 37).

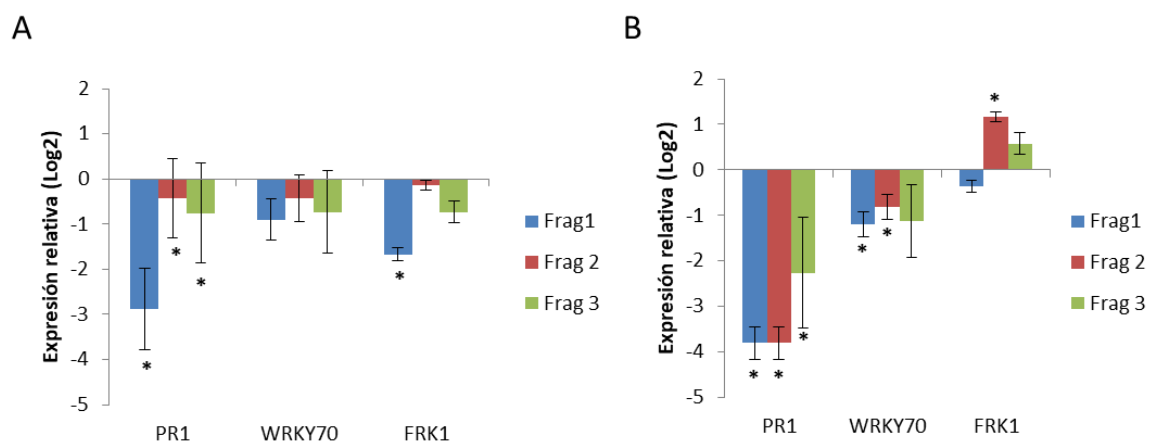


Figura 37 | Los fragmentos de AsES inducen la sub-expresión de genes asociados a la defensa. Los niveles relativos de ARNm de *PR1*, *WRKY70* y *FRK1* fueron determinados por medio de la técnica de qPCR en plantas Col-0 (A) y *fec* (B) tratadas con Frag-1 (2 μ M), Frag-2 (2 μ M) y Frag-3 (2 μ M) y comparadas con los niveles de expresión de plantas Col-0 y *fec* respectivamente, tratadas con el vector vacío, a las 4 hpt. Las plantas no inducidas (vector vacío) se utilizaron como control y su nivel de expresión se estableció arbitrariamente en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). Los datos corresponden a la media \pm S.E de ocho réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = valores de $P < 0,05$).

4.8 Estudio del efecto de AsES en las infecciones virales

Estudios recientes han proporcionado evidencia de que las plantas utilizan el sistema inmune innato para combatir patógenos virales de manera similar a la utilizada para patógenos no virales. Y si bien, en los sistemas animales está bien documentado el hecho de que los virus codifican para PAMPs que son reconocidos por PRR a nivel de membrana, como por ej. los ácidos nucleicos derivados de virus, la evidencia reciente

ha extendido el concepto de PTI viral a los sistemas de interacción planta-virus (Zorzatto *et al.*, 2015; Gouveia *et al.*, 2017).

4.8.1 Determinación del nivel de acumulación viral en plantas de *Arabidopsis* tratadas con AsES

Con la finalidad de evaluar si la proteína AsES es capaz de activar la defensa antiviral y de manera análoga a su actividad inductora frente a patógenos fúngicos y bacterianos, plantas de *Arabidopsis*, tanto de la variedad salvaje perteneciente al cultivar Col-0 como de la mutante *fec*, fueron tratadas por aspersión con la proteína AsESm y luego infectadas en un estadio 1.08 con el virus TMV-Cg. Se tomaron muestras a los 5 días post infección del tejido sistémico infectado, específicamente de las hojas 8, 11 y 13 y se cuantificó mediante qPCR el nivel de ARNm de la proteína CP. Los resultados mostraron una disminución significativa en el nivel de acumulación viral, determinado por una baja en el nivel de ARNm de Cg-CP a los 5 dpi, tanto en las plantas Col-0 WT como en la mutante *fec*, en donde a su vez, la disminución registrada fue aún mayor (Figura 38).

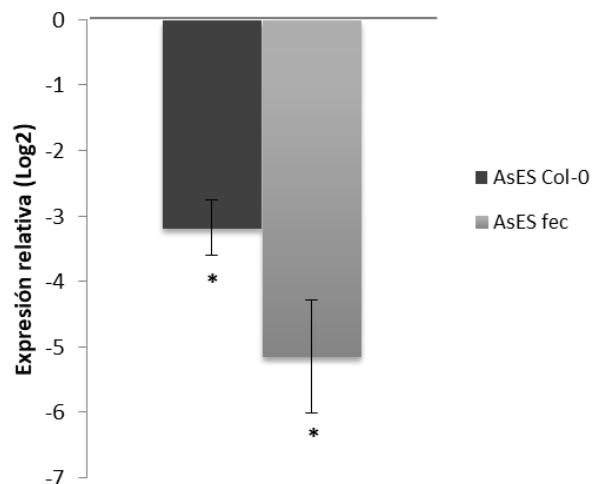


Figura 38 | Análisis del nivel de acumulación viral a los 5 dpi en plantas tratadas con la proteína AsESm. El nivel relativo de ARNm del gen *CgCP* fue determinado por medio de la técnica de qPCR en plantas infectadas con el virus TMV-Cg, tanto en la variedad WT-Col-0 como en la mutante *fec* y comparado con el nivel de expresión en plantas WT Col-0 y *fec* tratadas con el vector vacío e infectadas. El nivel de expresión en las plantas control, tratadas con el vector vacío, fue arbitrariamente fijado en uno ($\text{Log}_2(1) = 0$). Se muestra el valor medio de 8 réplicas biológicas \pm SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0,05).

4.8.2 Caracterización de la actividad antiviral de AsES en el sistema *N. benthamiana*-TMV-GFP

Para determinar si la actividad antiviral de AsES es especie-dependiente, analizamos su efecto en un sistema ampliamente estudiado como lo es *N. benthamiana*-TMV. Para ello, plantas de 4 semanas de edad fueron infiltradas con la proteína AsESm y luego de un período de 48 h de inducción, se procedió a la infiltración con viriones de TMV (construcción pJL24), que expresan además de los genes del virus, la proteína GFP (absorción 460-500 nm/emisión 510-560 nm). A partir de los 3 dpi, al iluminar las plantas con luz ultravioleta (UV) pueden observarse puntos o *spots* de color verde fluorescente que corresponden al sitio inicial de infección (foco de infección), los cuales aumentan de tamaño (movimiento célula a célula) y/o se visualizan en tejidos distales (movimiento sistémico) conforme avanza la infección.

Si bien las observaciones bajo luz UV se realizaron diariamente a partir de los 48 hpi, los *spots* fluorescentes adquirieron un tamaño visible macroscópicamente a partir de los 4 dpi. A los 5 dpi, se observó que las plantas pre-tratadas con AsESm presentaron un menor N° de puntos verdes fluorescentes en el tejido local en comparación con las plantas control infectadas, tratadas con la construcción del vector vacío purificado (Figura 39, A y B).

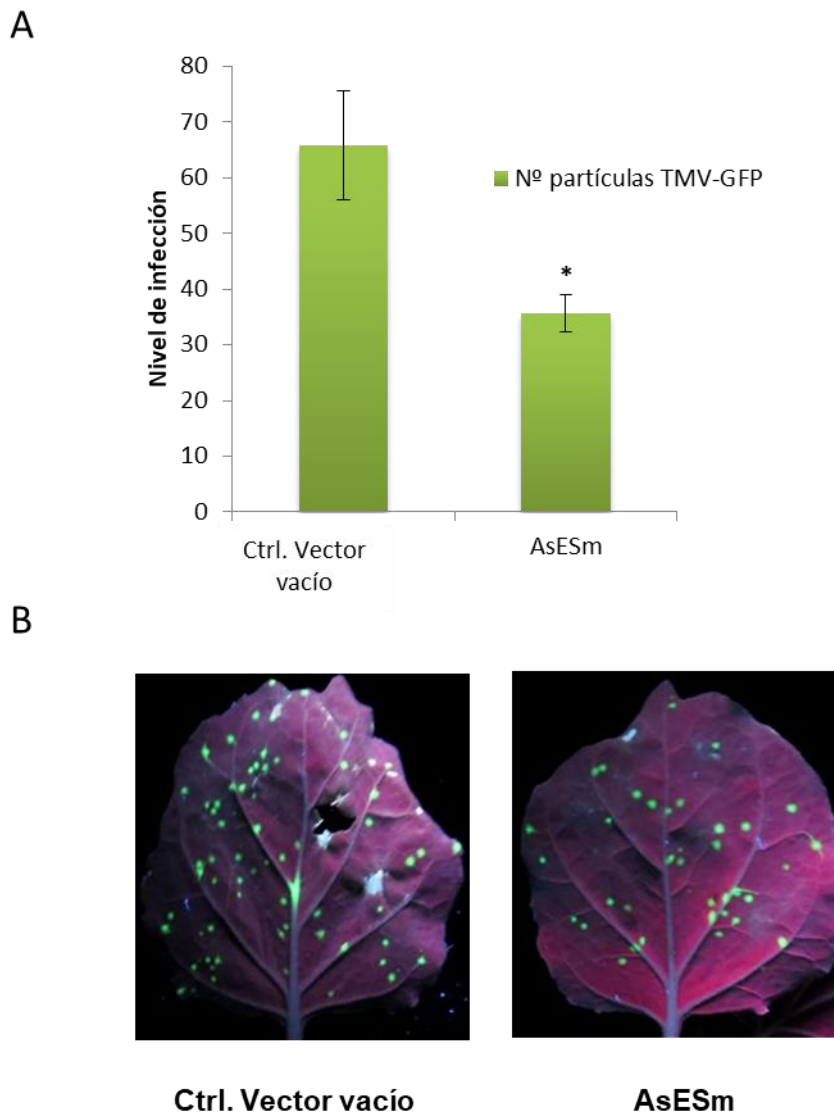


Figura 39 | Análisis del nivel de infectividad viral a los 5 dpi en plantas de *N. benthamiana* tratadas con la proteína AsESm. **A**, El nivel de infección fue determinado como Nº de puntos-GFP por hoja infiltrada. Se muestra el valor medio de 6 réplicas biológicas \pm SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0,05). **B**, Aspecto de la hoja de *N. benthamiana* bajo luz UV, infiltrada con vector vacío o AsESm e infectada con el virus TMV-GFP.

4.8.3 Análisis del efecto de AsES en el movimiento de las partículas virales de TMV

Con el objeto de determinar si el tratamiento de plantas con la proteína AsES deriva además en algún efecto sobre el movimiento viral, se evaluó la velocidad de movimiento célula a célula a lo largo del curso de la infección en el tejido local, correspondiente a la hoja infiltrada. Para ello y mediante el uso de un calibre, se midió

el diámetro de 20 puntos verdes fluorescentes de GFP al azar por réplica biológica y se graficó el promedio del diámetro de las partículas virales del total de las réplicas biológicas, en función del tiempo de infección. Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de la velocidad de movimiento de las partículas virales en plantas pre-tratadas con AsES respecto a las plantas control a los 7 dpi (Figura 40). No se observaron diferencias respecto a las plantas control entre los 4 y 6 dpi (Figura 40).

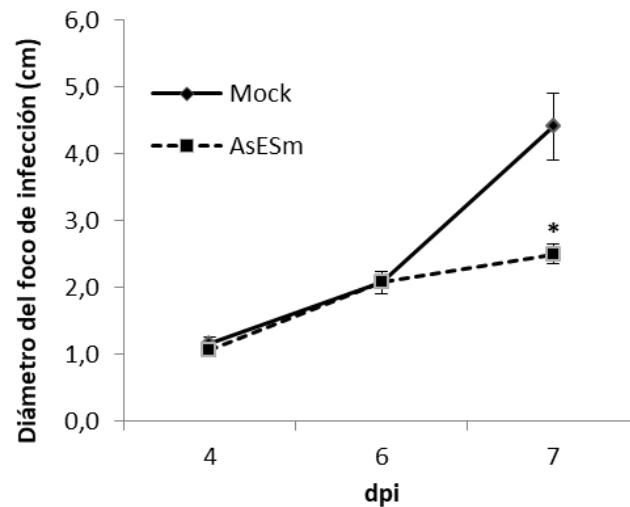


Figura 40 | Velocidad de movimiento intercelular en plantas de *N. benthamiana* tratadas con la proteína inductora AsESm. Se muestra el valor medio obtenido de 6 réplicas biológicas \pm SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0,05)

Respecto al movimiento sistémico viral en tejidos distales, pudo observarse un retraso del mismo hasta los 7 dpi en plantas tratadas con la proteína AsES (Figura 41, B y D) y respecto a las plantas control (tratadas con el vector vacío e infectadas con TMV-GFP) (Figura 41, A y C). Luego, a partir de los 8 dpi, tanto en las plantas tratadas con AsES como en las plantas control se observó movimiento sistémico aunque con distintos grados de dispersión. (No mostrado).

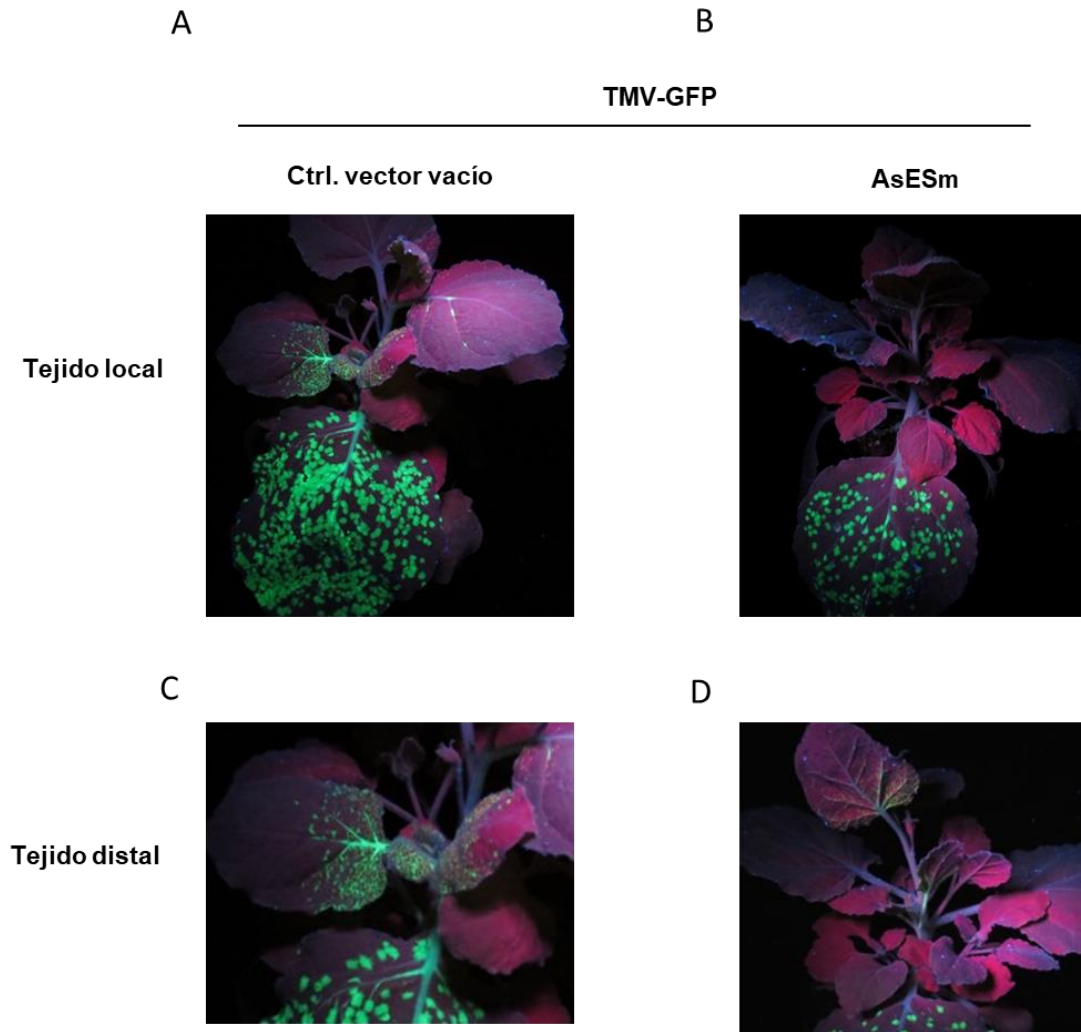


Figura 41 | Evaluación del movimiento sistémico de las partículas virales TMV-GFP en plantas de *N. benthamiana* a los 7 dpi. **A**, Plantas de *N. benthamiana* pre-infiltradas con el vector vacío (control) **B**, Plantas de *N. benthamiana* pre-infiltradas con inductor AsESm **C** y **D**, muestran un imagen ampliada en la zona de tejido distal correspondiente a las plantas control y al tratamiento con la proteína AsES respectivamente.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el pre-tratamiento de plantas de *N. benthamiana* con la proteínas AsES produce una menor acumulación viral en el tejido local y un retraso marcado en el movimiento sistémico del virus TMV. En conjunto los resultados sugieren que la proteína AsES es capaz de activar la inmunidad antiviral de la planta, independientemente de la especie evaluada.

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1 Obtención recombinante de la proteína AsES

Las proteasas son enzimas que ocupan un rol central tanto en el campo fisiológico como en el comercial en donde ejecutan una gran variedad de funciones, que se extienden desde el nivel celular hasta el nivel de órgano y de organismo (Rao *et al.*, 1998). Actualmente, las proteasas se clasifican según tres criterios principales: *i*) tipo de reacción catalizada, *ii*) naturaleza química del sitio catalítico, y *iii*) relación evolutiva respecto a la estructura. A su vez, y en base al grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas pueden clasificarse además en cuatro grandes grupos: serin proteasas, proteasas aspárticas, cisteín proteasas y metaloproteasas (Hartley, 1960).

Las subtilasas son miembro de la superfamilia de serin proteasas de tipo subtilisina y representan la clase de proteasas mejor caracterizadas (Siezen y Leunissen, 1997). Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas, pudiendo encontrarse en virus, bacterias y organismos eucariontes en donde juegan un papel importante en numerosos procesos biológicos, incluyendo nutrición, catabolismo de proteínas y activación de zimógenos, entre otros (Siezen y Leunissen, 1997; Rao *et al.*, 1998). En base a la homología de secuencia entre subtilasas, se ha propuesto una subdivisión en seis familias (Siezen y Leunissen, 1997), de las cuales solo tres están presentes en hongos (Hu y Leger, 2004): *i*) tipo proteinasa K (clase II), *ii*) kexinas y *iii*) tipo subtilisina (clase I).

La subtilisina AsES aislada de *A. strictum* (ID de secuencia: AFZ84667.2) pertenece a la familia de las subtilisinas del tipo proteinasa K, denominada así por la similitud de sus miembros a la ampliamente conocida proteinasa K producida por el hongo *Tritirachium album* Limber (Gunkel y Gassen, 1989). A su vez, y en base a homología de secuencia, la proteína AsES presenta alta identidad con SUB9, una serin proteasa de tipo subtilisina de *Trichoderma parareesei*, seguida por una proteinasa de tipo T de *Trichoderma reesei* QM6a, ambas producidas por hongos de la división Ascomycota, al igual que AsES.

En la actualidad, con la ayuda de la tecnología de ADN recombinante y la ingeniería de proteínas, las enzimas se pueden obtener en la calidad y cantidades deseadas para satisfacer los requisitos de los usuarios o las demandas de la industria,

considerando que la mayoría de los productos farmacéuticos de origen biológico que se producen hoy en día, provienen de la tecnología recombinante (Demain y Vaishnav, 2009).

Dentro de la variedad de huéspedes disponibles para expresión heteróloga, *E. coli* es el sistema más antiguo y más ampliamente utilizado (Terpe, 2006). Entre sus ventajas se destacan el rápido crecimiento, la facilidad de cultivo, los altos rendimientos de producto y los bajos costos de producción (Demain y Vaishnav, 2009). Debido a ello y sumado al antecedente de la producción exitosa de proteinasa K (Gunkel y Gassen, 1989) y proteinasa T (Samal *et al.*, 1989) en *E. coli*, se decidió emplear este sistema para la expresión de AsES.

Bajo condiciones rutinarias de expresión, la proteína AsES fue expresada en el citoplasma en forma insoluble, como cuerpo de inclusión. Entre los diversos motivos asociados a la producción de proteínas heterólogas insolubles se destacan *i*) la elevada carga metabólica durante la expresión de proteínas foráneas, lo que lleva a un suministro insuficiente de chaperonas para guiar el plegamiento correcto de los polipéptidos (Hoffmann y Rinas, 2004), *ii*) la alta proporción de codones raros para *E. coli* en los genes foráneos y *iii*) el ambiente reductor del citoplasma bacteriano, que inhibe la formación de enlaces disulfuro necesarios para el correcto plegamiento de la proteína (Basu *et al.*, 2011). Ha sido ampliamente estudiado el efecto de la temperatura durante la expresión de proteínas, en donde se comprobó que una disminución de la misma reduce a su vez el metabolismo celular y conduce a menores tasas de transcripción, traducción, división celular y reduce la agregación de proteínas (Vasina y Baneyx, 1997; Hunke y Betton, 2003; Rosano *et al.*, 2014). En el presente trabajo, se diseñó un protocolo de expresión que contempló una disminución de la temperatura durante la etapa de inducción y se optimizó además el uso de codones para expresión en *E. coli*. Por otra parte, AsES posee 4 residuos de cisteína que podrían estar involucrados en la formación de dos puentes disulfuro: Esta, es una característica que comparte con otros miembros de la familia de subtilasas del tipo proteinasa K, como proteinasa K y proteinasa T. Debido a ello, en primera instancia se empleó la cepa SHuffle T7 de *E. coli*, la cual está modificada genéticamente para favorecer la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma (Lobstein *et al.*, 2012; Fathi-Roudsari *et al.*, 2016). Ante la ausencia de proteína soluble detectable (Figura 15), se decidió

direccionar la proteína al periplasma. Este compartimiento, y a diferencia del citoplasma, es oxidante y alberga enzimas que catalizan la formación de enlaces disulfuro y su isomerización, así como chaperonas y proteínas de plegamiento específicas (Kadokura *et al.*, 2003; Messens y Collet, 2006; De-Marco, 2009). A su vez, entre las ventajas de la secreción compartimentalizada se destacan una simplificación del procesamiento río abajo, una actividad biológica mejorada y la mayor estabilidad y solubilidad del producto (Cornelis, 2000; Mergulhão *et al.*, 2005), que puede estar asociado al factor dilución, ya que el contenido proteico es menor al del citoplasma (Makrides, 1996).

La obtención de proteínas en forma soluble, normalmente constituye el cuello de botella del proceso de producción (Goulding y Perry, 2003). Entre las subtilasas fúngicas que fueron expresadas en forma soluble a partir de un direccionamiento compartimentalizado se destaca la Proteinasa K (Gunkel y Gassen, 1989). Asimismo, WF146, subtilasa bacteriana termófila producida por *Bacillus* sp. y subtilasa E, producida por *Bacillus subtilis*, constituyen ejemplos de proteínas expresadas en forma soluble en el periplasma de *E. coli* (Sroga y Dordick, 2002; Zhu *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, la fusión de la proteína AsES a MBP, la secreción de la misma al periplasma y la optimización del proceso de inducción a bajas temperaturas resultaron en una combinación exitosa que permitió la expresión de la proteína AsES en forma soluble. A su vez, si bien el rendimiento de la proteína recombinante fue menor al inicialmente esperado, cabe destacar que logró aumentar el rendimiento reportado para la proteína AsES purificada de *A. strictum* y redujo el tiempo de producción en un 95 % (Figura 20).

5.1.1 Caracterización del proceso de maduración de la proteína AsES

A nivel estructural, las subtilasas extracelulares se producen generalmente como precursores inactivos denominados zimógenos y están compuestos por un péptido señal, un propéptido N-terminal y un dominio maduro. Los precursores inactivos experimentan un proceso gradual de maduración para liberar la actividad enzimática lo que permite una regulación precisa de la actividad tanto espacial como temporalmente (Khan y James, 2008). El PS media la secreción de la enzima a través de la membrana citoplásmica, donde es escindido por una señal peptidasa. El pro-

péptido N-terminal generalmente funciona como una chaperona intramolecular para facilitar el plegamiento correcto del dominio maduro y también como un inhibidor potencial de la enzima madura para prevenir la activación prematura de la proteasa, maximizando así la eficiencia de maduración (Shinde y Thomas, 2011). La proteinasa K, por ejemplo, es expresada como un zimógeno constituido por un péptido señal de 15 aa, un pro-péptido de 90 aa y un dominio correspondiente a la proteína madura de 279 aa que se obtiene luego de que el pro-péptido es removido una vez que la proteína es secretada al medio (Gunkel y Gassen, 1989). Asimismo, se comprobó experimentalmente que esta maduración puede ocurrir a partir de un procesamiento *in vitro* también en *E. coli*. La Pro-subtilisina de *Bacillus subtilis*, madura a su forma activa de subtilisina cuando es expresada en *E. coli* (Ikemura y Inouye, 1988). Resultados similares se observaron para la subtilisina E de *Bacillus subtilis* a partir de la expresión de su pro-péptido (Ohta y Inouye, 1990).

A partir de una analogía establecida con subtilasas fúngicas relacionadas evolutivamente y con otras serin proteasas, se infirió que la proteína AsES es sintetizada como un precursor inactivo constituido por un péptido señal de 15 aa, un pro-péptido de 90 aa y una región de 283 aa correspondiente a la proteína madura. Este último corresponde a la proteína activa que se logra purificar a partir del sobrenadante de *A. strictum* (Chalfoun, 2009; Chalfoun *et al.*, 2013). Si bien se especulaba con que el pro-péptido de AsES se eliminaba en los pasos posteriores al proceso de secreción o bien inmediatamente luego de la secreción al medio extracelular, esto no había podido ser comprobado hasta ahora. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, pudo comprobarse que la proteína AsES (S8) sufre efectivamente un proceso de maduración post-traducciona, ya que a partir de la expresión de su pro-péptido (I9 +S8), se obtiene la proteína madura (S8) (Figura 21). A su vez se demostró que este procesamiento se inicia una vez que la proteína es secretada y ocurre en forma gradual ya que pueden observarse intermediarios proteicos durante dicho proceso (Figura 20 y Figura 24).

El proceso de maduración de algunas subtilasas ha sido ampliamente caracterizado y se demostró que ocurre autocatalíticamente (Shinde y Thomas, 2011). Así, la proforma recombinante de la proteasa WF146-WT, madura efectivamente a altas temperaturas mientras que la proforma mutante del sitio activo, que reemplaza la Ser 249 por Ala,

no lo hace (Yang *et al.*, 2008). En el caso de la proteína AsES se observó un proceso similar. Mientras que la pro-proteína AsES recombinante conduce a una proteína madura (S8), la versión mutante en el sitio activo de la pro-proteína (AsESc^{S226A}), no lo hace. Estos resultados demuestran que, al igual que lo observado para otras subtilasas, la proteína AsES madura de manera autocatalítica, para lo cual requiere de actividad enzimática (Figura 24).

5.1.2 Análisis de la estabilidad de la proteína AsES recombinante

Los cationes desempeñan un papel importante en la estabilización de proteínas al unirse a sitios específicos en su estructura terciaria (Alexander *et al.*, 2001). Así, en el caso de la subtilisina BPN, al unirse los cationes a sitios específicos en la estructura terciaria de la proteína, contribuyen con su energía de enlace a la estabilidad del estado nativo (Alexander *et al.*, 2001). Las proteasas microbianas extracelulares son ejemplos de proteínas que contienen típicamente uno o más sitios de unión a cationes. Por ejemplo, la termolisina, del organismo termófilo *Bacillus thermoproteolyticus*, contiene cuatro sitios de unión a Ca²⁺ (Matthews *et al.*, 1974) mientras que la proteinasa K y la termitasa tienen dos y tres sitios respectivamente, que hacen grandes contribuciones a su alta estabilidad (Betzl *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta la implicancia de estos iones en la estabilidad de otras proteínas de la familia y dado que la proteína AsESm posee dos sitios putativos de unión a Ca²⁺, hipotetizamos que el efecto de degradación observado (Figura 22, panel A y B) se debía a una posible inestabilidad en la estructura de la proteína asociado a la ausencia del catión. Luego de la inclusión de Ca²⁺ en los buffers tanto de extracción de proteínas periplasmicas como en los de purificación, el efecto de degradación prosiguió en ausencia de inhibidor (PMSF). En forma contrastante y aún en ausencia del inhibidor, el efecto de degradación no se observó en la pro-proteína mutante (AsESc^{S226A}). Debido a ello, atribuimos la aparente inestabilidad de la proteína AsES recombinante a la presencia de proteasas contaminantes propias del huésped (*E. coli*), que en presencia de PMSF, están inhibidas. Teniendo en cuenta la importancia de la accesibilidad al sustrato por parte de la/las proteasa/s (Gottesman, 1996), consideramos que el motivo de reconocimiento de la/s proteasas contaminantes, estaría accesible en la proteína AsES madura. En la pro-proteína y debido a la

conformación que adquiere, dicho motivo de reconocimiento sería inaccesible y por lo tanto no sería susceptible a degradación.

5.1.3 Expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*

La glicosilación es una modificación postraduccional común, que ocurre particularmente en proteínas transmembrana y de secreción en organismos eucariotas, arqueas y, en menor medida, en procariotas (Apweiler *et al.*, 1999; Dell *et al.*, 2010). Las proteínas eucariotas requieren glicosilación para un correcto plegamiento, oligomerización y solubilidad, mientras que los glicanos prolongan significativamente la estabilidad y el tiempo de vida media en muchos casos mediante la protección contra la proteólisis (Mitra *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2009).

Durante la caracterización bioquímica de AsES, se determinó que la proteína no presenta residuos glicosídicos (Chalfoun, 2009) sin embargo, por homología de secuencia con otras proteínas, las herramientas bioinformáticas predicen un único sitio de N-glicosilación. Debido a que esta modificación post-traduccional constituye una de las principales limitantes de *E. coli* como sistema de expresión, y en caso de que la inestabilidad de la proteína AsES recombinante esté asociada a una ausencia de residuos glicosídicos, se evaluó la expresión de AsES en plantas de *N. benthamiana* en forma transiente. Entre las ventajas que presenta este sistema de expresión en comparación con el bacteriano, se acentúan principalmente los altos niveles de acumulación de proteínas en los tejidos vegetales, el plegamiento y ensamblaje adecuados de complejos de proteínas y la ocurrencia de modificaciones post-traduccionales (Demain y Vaishnav, 2009).

Los ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* no resultaron positivos para la expresión de la proteína AsES. Contrariamente a lo esperado solo se detectó la presencia de GFP libre en la fracción citoplasmática. Entre las hipótesis que cobran mayor fuerza y que pueden atribuirse a la falta de expresión de la proteína de interés, se destacan una posible degradación de la misma en el espacio apoplástico. En varios sistemas de plantas transgénicas, el apoplasto y la pared celular han sido implicados en la producción de fragmentos proteolíticos (Stevens *et al.*, 2000; Sharp y Doran, 2001; Outchkourov *et al.*, 2003). La degradación de la proteína blancotambién podría estar relacionada a un plegamiento incorrecto o a la falta de formación de

puentes disulfuro, lo que aumentaría el ataque de proteasas (Dolja *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002). A su vez, la ausencia de fragmentos detectables de AsES no significa ausencia de actividad proteolítica ya que las proteasas vegetales pueden usar sitios de escisión relativamente inespecíficos y producir fragmentos tan pequeños como 6-9 aminoácidos (Callis, 1995). En cualquiera de los casos, se descarta que la presencia de la proteína GFP se deba a un corrimiento en el marco de lectura ya que la construcción utilizada para los ensayos fue debidamente secuenciada y muestra un clonado de la secuencia de interés en el marco de lectura correcto.

Teniendo en cuenta las numerosas ventajas que ofrecen las plantas, principalmente asociadas a los altos rendimiento y fácil escalamiento, no debería descartarse la expresión de la proteína AsES en este sistema sino orientarse hacia un cambio de estrategia y optimización que resulten exitosas.

5.2 Validación funcional de la actividad inductora de AsES

En los últimos años, un número creciente de proteasas han sido involucradas en diferentes aspectos de la inmunidad en plantas (Thomas y van der Hoorn, 2018). Las subtilasas, especialmente aquellas presentes en el secretoma de muchos patógenos de plantas, han ganado gran atención (Figueiredo *et al.*, 2018) y han sido implicadas, entre otros procesos, en la resistencia a patógenos y en el *priming* inmunológico (Ramírez *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2018).

En el caso de las subtilasas de plantas, si bien están asociadas a numerosas funciones del desarrollo, han ganado más prominencia debido a sus implicancias en las respuestas tanto a estreses bióticos como abióticos. Se han reportado subtilasas que ante un estímulo abiótico, participan en los mecanismos de resistencia a sequía y a estrés salino (Liu *et al.*, 2007; Liu y Howell, 2010; Che *et al.*, 2010; Budič *et al.*, 2013). Un ejemplo bien caracterizado es la subtilasa AtSBT6.1 de *Arabidopsis*, que escinde a la proteína de membrana tipo II localizada en el retículo endoplasmático (RE) (bZIP28). La escisión de bZIP28 es esencial para la activación de genes asociados con la respuesta al estrés salino (Liu y Howell, 2010).

Del mismo modo, la participación de subtilasas implicadas en defensa luego de un estímulo biótico se ha incrementado en los últimos años (Figueiredo *et al.*, 2018).

La primera evidencia de participación de subtilasas en las interacciones planta-patógeno fue reportada en plantas de tomate por (Granell *et al.*, 1987). Estos autores identificaron la acumulación de la subtilasa P69 en las hojas de tomate después de la infección con viroides del exocorte de cítricos (CEV). Posteriormente, se demostró que P69 consistía en una familia de genes con seis miembros estrechamente relacionados, llamados P69A a P69F (Jordá *et al.*, 1999, 2000) y se demostró que estos genes se expresan en diferentes condiciones. Así, P69A, P69D y P69E fueron asociados con procesos de desarrollo, mientras que P69B y P69C mostraron comportarse como genes asociados a la patogénesis (PR), ya que ambos fueron transcripcionalmente activados durante la infección con *Pseudomonas syringae* (Jordá *et al.*, 1999, 2000). También se demostró que la activación de P69B y P69C no estaba restringida al punto de inoculación del patógeno y que la expresión de ambos es inducida por AS (Tornero *et al.*, 1997; Jordá *et al.*, 1999).

En *Arabidopsis*, se identificó la serin proteasa AtSBT3.3, que se acumula en la matriz extracelular. Se hipotetizó que AtSBT3.3 podría escindir el dominio extracelular de una proteína más grande localizada en la membrana y que actuaría como receptor. Como consecuencia del desprendimiento proteolítico del ectodominio, el receptor podría activarse e iniciar un proceso de señalización inmunológica corriente abajo (Ramírez *et al.*, 2013). Del mismo modo, AtSBT6.1/S1P procesa el pro-péptido del FACTOR DE ALCALINIZACIÓN RÁPIDA 23 (RALF23) que se une al receptor quinasa FERONIA (FER) similar a la malectina (Srivastava *et al.*, 2009; Stegmann *et al.*, 2017).

En soja, la subtilasa extracelular Glyma18g48580 induce la expresión de genes de defensa en forma independiente de la actividad enzimática, por medio de un péptido interno de 12 aa (GmSubPep) (Pearce *et al.*, 2010). El inductor endógeno, se une a un receptor unido a membrana que a su vez induce vías de señalización de defensa y amplifica la respuesta inmune innata de la planta, similar a los inductores derivados de patógenos (Pearce *et al.*, 2010).

Los patógenos de plantas también presentan subtilasas que podrían estar involucradas en el mecanismo de ataque de los mismos (patogenicidad). En *Fusarium eumartii*, un hongo fitopatógeno que causa la pudrición seca de la papa, se aisló una subtilasa capaz de degradar proteínas PR de la papa, así como polipéptidos específicos de líquidos de lavado intercelulares y paredes celulares (Olivieri *et al.*, 1998, 2002).

Asimismo, *Fusarium graminearum*, patógeno necrótrofo que causa la enfermedad del tizón de la cabeza en trigo (Gottwald *et al.*, 2012), libera un arsenal específico de factores de virulencia, incluidas las subtilasas, que se producen durante casi todo el curso de la enfermedad (Pekkarinen y Jones, 2003; Walter *et al.*, 2010) y que estarían implicadas en la degradación de la pared celular del huésped durante la nutrición del patógeno. El hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*, produce la subtilasa VIPr1 la cual es empleada como agente de control biológico al degradar la cutícula de insectos (Yu *et al.*, 2012). Por otra parte, y dentro de las proteasas liberadas por hongos, las endoxilanasas producidas por *Trichoderma* spp. son potentes inductores de defensa en diversos tipos de plantas, capaces de inducir una respuesta HR, la producción de etileno y fitoalexinas en tabaco y tomate de manera independiente de su actividad enzimática (Sharon *et al.*, 1993; Enkerli *et al.*, 1999; Furman-Matarasso *et al.*, 1999)

Resultados anteriormente obtenidos en nuestro laboratorio sugirieron que la actividad enzimática de AsES estaría implicada en la inducción de la defensa en plantas. Se observó que cuando se inhibía la actividad proteolítica de AsES, se perdía la protección contra *C. acutatum* en plantas de frutilla. No obstante, la participación de la actividad enzimática de AsES en la inducción de la defensa, se evaluó solamente en el patosistema frutilla/*C. acutatum* y sin análisis bioquímicos o moleculares complementarios para confirmar dichos resultados. A su vez, cabe destacar que, proteinasa K y Carlsberg, dos subtilasas de alta identidad con AsES y catalíticamente activas, fueron evaluadas y no pudieron reproducir el efecto protector en frutilla (Chalfoun *et al.*, 2013). Además, teniendo en cuenta que la mayoría de las subtilasas carecen de especificidad de sustrato (Perona y Craik, 1995; Siezen y Leunissen, 1997), propusimos que la actividad proteolítica de AsES no estaría necesariamente vinculada a la actividad inductora. Para determinar si la proteína AsES actúa como un inductor en sí mismo o bien por medio de la proteólisis de una o varias proteínas del huésped que son sus sustratos, se investigó la capacidad de las proteínas AsES^m (S8) y AsES^m^{S226A} de inducir defensa en plantas de *Arabidopsis* contra *B. cinerea*. Los resultados revelaron que el pre-tratamiento de plantas con AsES^m, inhibida con PMSF y AsES^m^{S229A}, mutante inactiva generada por una mutación puntual en el sitio activo (Figura 24), (Tabla 6) promovieron una reducción significativa del área de lesión (Figura

27, A y B). Estos resultados a su vez, coinciden con el efecto de protección generado por AsES-WT en Arabidopsis (Figura 28, A y B) (Hael-Conrad et al., 2015).

5.2.1 Activación de genes asociados a la defensa

La percepción de patógenos generalmente conduce a una reprogramación profunda y dinámica de la expresión génica del huésped que es fundamental para montar una respuesta de defensa sólida y eficaz (Li *et al.*, 2016). Anteriormente, se demostró que AsES-WT induce la activación de la defensa en plantas a través de la vía del AS, asociada con la sobreexpresión de *PR1* en las primeras etapas de inducción, y las vías de señalización hormonales del AJ y del ET (Hael-Conrad et al., 2015). La señalización y el *crosstalk* hormonal juegan un papel fundamental en la regulación de las respuestas de defensa de las plantas (Pieterse *et al.*, 2009, 2012). Con la finalidad de demostrar que las proteínas recombinantes AsESm y AsESm^{S229A} generan una reprogramación transcripcional similar a AsES-WT, se analizó la expresión del siguiente sub-set de genes : *PR1*, que codifica para una proteína secretada y se usa a menudo como marcador molecular para las defensas dependientes de AS (Uknes *et al.*, 1992; Pieterse *et al.*, 2009, 2012); *WRKY70*, que tiene un papel fundamental en la determinación del equilibrio entre las vías de defensa dependientes de AS y las dependientes de AJ (Li *et al.*, 2006) y el gen *ERF6*, que está implicado en defensa y actúa como un regulador positivo de la vía del AJ/ET (Moffat *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2013).

Usando un enfoque de q-PCR, nuestros resultados demostraron que los tratamientos con las proteínas AsESm y AsESm^{S229A}, producen una reprogramación transcripcional por medio de la activación de la vía del AS (representado por la sobreexpresión de los genes *PR1* y *WRKY70*), con una distribución temporal similar a la de AsES-WT (Figuras 29 y 30). Del mismo modo y, sugiriendo que la proteína AsES activaría primeramente la vía de señalización del AS, la sub-expresión del gen *ERF6* puede ser explicada debido al *crosstalk* ampliamente documentado que existe entre las vías de señalización del AS y del AJ/ET en donde los estudios informan una interacción mutuamente antagónica (Glazebrook, 2005; Koornneef y Pieterse, 2008; Grant y Jones, 2009).

5.2.2 Implicancia de la actividad enzimática en la inducción de la respuesta de defensa

En el presente trabajo, se ha demostrado que la proteína AsESm, inhibida enzimáticamente por el agregado de un inhibidor específico y AsESm^{S226A}, mutante inactiva por una mutación en el sitio activo, son capaces de inducir la activación de una respuesta de defensa en *Arabidopsis*, evidenciada por la protección frente a *B. cinerea* y la sobreexpresión de genes asociados a la defensa. Nótese, que el comportamiento de las proteínas recombinantes es similar al de la proteína AsES-WT, utilizada como control positivo de inducción en ambos ensayos.

El hecho de que la proteína AsES, en iguales concentraciones, presente un comportamiento diferencial en cuanto a la capacidad de activar una respuesta de defensa dependiente de la actividad enzimática según la especie vegetal, podría asociarse a diferencias de especificidad en el reconocimiento.

Los PRR de plantas y animales han evolucionado para percibir PAMPs similares (por ejemplo, flagelina bacteriana). Sin embargo, tanto los epítopes reconocidos como los PRRs involucrados son distintos, lo que indica una evolución convergente (Zipfel, 2014). Las plantas pueden percibir un mismo inductor por medio de epítopes diferentes. Así por ejemplo, en *Arabidopsis* el factor de elongación (EF-Tu) puede ser percibido por medio de un epítipo de 18 aa (elf18) mientras que en arroz, un epítipo de 50 aa (EFa50), que deriva de la región central de la proteína, es capaz de inducir respuesta de defensa (Furukawa *et al.*, 2014). Considerando que presumiblemente la actividad proteolítica de tipo subtilasa no es suficiente para inducir defensa ya que otras serin proteasas catalíticamente activas evaluadas en frutilla, no fueron capaces de reproducir el efecto inductor, hipotetizamos que dicho efecto estaría vinculado a la estructura *per se* de la proteína AsES. A raíz de ello, el sitio de reconocimiento en frutilla podría involucrar uno o más aminoácidos del sitio activo o residuos adyacentes a ellos que se encuentran bloqueados total o parcialmente por la unión covalente del PMSF. En el caso de *Arabidopsis*, el reconocimiento de la proteína podría situarse en otra región peptídica que no se vería afectada por dicha inhibición.

5.2.3 ¿Es AsES un PAMP o un efector?

Por lo general, se considera que los PAMPs son compuestos de estructura conservada en diferentes clases de organismos y que asisten al *fitness* microbiano general, mientras que los efectores son específicos de especie, raza o cepa y contribuyen a la virulencia del patógeno. Sin embargo, no siempre es posible establecer una clara diferencia entre PAMPs y efectores. (Thomma *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2015). La proteína AsES no encaja necesariamente dentro del concepto de PAMP/efector ya que muestra características de ambas clases de moléculas. Como PAMP, actúa de manera ubicua y desencadena una respuesta de defensa no solo en diferentes cultivares de *F. ananassa*, a saber, Milsei Tudla, Camarosa y Pájaro (Chalfoun, 2009; Chalfoun *et al.*, 2013) sino también en diferentes especies silvestres de fresa como *F. vesca* (datos no publicados) y, esta respuesta de defensa se extiende a otras especies de plantas como *A. thaliana* (Chalfoun *et al.*, 2013; Hael-Conrad *et al.*, 2015) y cultivos como soja, caña de azúcar y palta (Chalfoun *et al.*, 2018 a,b; Perato *et al.*, 2018). Llamativamente, la actividad inductora de AsES es eficaz contra patógenos bacterianos y fúngicos (Chalfoun *et al.*, 2018a) y, dentro de ellos, contra hongos de diferentes estilos de vida (Chalfoun *et al.*, 2013, 2018a,b; Hael-Conrad *et al.*, 2015). También, se ha demostrado que AsES induce SAR (Hael-Conrad *et al.*, 2015, 2018) acompañado de microestallidos y micro-HR, estos dos últimos eventos observados sólo en *F. ananassa*. Con esta evidencia, es poco probable que el modelo de resistencia gen por gen sea válido para AsES (Flor, 1971).

La percepción de PAMPs por parte de diferentes PRRs (LRR-RK/RLP) genera una cascada de eventos que activan un conjunto de respuestas similares y que incluyen entre otros, la formación de ROS, la inducción y represión de genes asociados a defensa, la activación de una cascada de MAPK, etc. (Nühse *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002). La proteína quinasa receptor-asociada BAK1/SERK3 constituye un adaptador común capaz de integrar diversos sucesos de percepción con eventos de señalización temprana lo que conduce finalmente al establecimiento de la inmunidad contra un amplio rango de microorganismos invasores (Chinchilla *et al.*, 2007, 2009; Heese *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011). En este trabajo de tesis, se han podido observar eventos de tipo PTI clásicos, como inhibición del crecimiento de plántulas y activación de genes marcadores (*FRK-1*, *WRKY53*) como respuesta al tratamiento de

plantas de *Arabidopsis* con AsESm y AsESm^{S229A}. Además, la participación del co-receptor BAK1 en la respuesta de defensa mediada por AsES y evidenciado en este trabajo por la ausencia de protección frente a *B. cinerea* en mutantes BAK1, apoyan firmemente la idea de que AsES sería reconocido en la planta a nivel de membrana, como un PAMP.

Un paralelismo podría establecerse entre AsES y la xilanasas inductora de etileno (EIX), un inductor fúngico aislado de *Trichoderma viride* (Fuchs *et al.*, 1989). Entre otras respuestas de defensa, EIX induce la biosíntesis de etileno, la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis y HR en cultivares específicos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Bailey *et al.*, 1990, 1993; Ron *et al.*, 2000; Elbaz *et al.*, 2002). Aunque la interacción EIX con las plantas responde al modelo gen por gen (Flor, 1971; Furman-Matarasso *et al.*, 1999), ha sido demostrado que la actividad enzimática (β -1-4-endoxilanasas) no está involucrada en la inducción de la defensa ya que la proteína funciona *per se* como inductor (Enkerli *et al.*, 1999; Furman-Matarasso *et al.*, 1999; Rotblat *et al.*, 2002). La identificación de su receptor en tomate, LeEix2, una proteína con repeticiones ricas en leucina (RLP), confirma que EIX es un PAMP que se percibe a nivel de la membrana (Ron y Avni, 2004). Sin embargo, BAK1 no está involucrado en la percepción directa de EIX (Bar *et al.*, 2010).

Asimismo, evidencia categórica acerca de la naturaleza de AsES como PAMP será proporcionada con la identificación del correspondiente receptor de reconocimiento afín y con la demostración de su unión directa.

5.2.4 Búsqueda de un epítipo funcional

Una respuesta de defensa exitosa depende de una alta sensibilidad y especificidad en el reconocimiento con la habilidad de censar el peligro y consecuentemente activar el sistema inmune de la planta. Los patógenos, a su vez, proporcionan firmas o “patrones” característicos que sirven como una “tarjeta de identidad molecular” y permiten a la planta identificar al invasor externo (Albert, 2013). Como ejemplos destacados de péptidos o residuos inmunogénicos que derivan de estructuras microbianas típicas y que actúan como disparadores iniciales de una respuesta de defensa se destacan entre los más estudiados, elf18, constituido por 18 aa localizados en el extremo N-terminal de la proteína EF-Tu (Kunze *et al.*, 2004) y

flg22, un péptido de 22 aa que deriva de la región N-terminal más conservada del flagelo (Felix *et al.*, 1999). Curiosamente, el epítopo flg22 está enterrado en el interior del flagelo y no está expuesto al disolvente ni es accesible para su correspondiente receptor FLS2 (Samatey *et al.*, 2001; Yonekura *et al.*, 2003).

Una vez comprobado que la actividad enzimática de AsES no está involucrada en la inducción de defensas en *Arabidopsis* y con la finalidad de localizar la región inmunogénica inductora de la proteína, se evaluó la capacidad de 3 fragmentos/péptidos de la proteína AsES de disparar una respuesta de defensa. Si bien, los fragmentos 2 y 3 en una primera instancia mostraron la capacidad de inhibir significativamente crecimiento de plántulas de *Arabidopsis*, el efecto inductor no se correlacionó con la activación de genes asociados a la defensa (*PR1*, *WRKY70*, *FRK1*), en donde estos se mostraron sub-expresados. Una hipótesis que permitiría explicar lo observado es el hecho de que la conformación tridimensional de la proteína AsES no esté representada en los péptidos obtenidos. Así por ejemplo, si el epítopo funcional está ubicado en la región del sitio activo, éste no logra reproducirse con la conformación de los péptidos individuales.

Consideramos que antes de proponer una conclusión respecto a un posible epítopo funcional de AsES, es necesario evaluar nuevamente el efecto inductor de los péptidos, esta vez evaluándolos en forma conjunta, con concentraciones mayores y analizando otro tipo de repuestas de tipo PTI.

5.3 Activación de la inmunidad antiviral inducida por AsES

Los virus son parásitos intracelulares obligados, absolutamente dependientes de la maquinaria de la célula huésped para multiplicarse y propagarse. El genoma de estos patógenos consiste en ARN de simple cadena o de doble cadena o ADN que codifica pocos genes y generalmente se empaqueta en envolturas de proteínas llamadas cápside (CP). Los virus invaden todas las formas de vida y la infección viral causa trastornos fisiológicos que conducen a enfermedades (Boualem *et al.*, 2016).

Una vez infectadas, las plantas dependen de un complejo arsenal inmune antiviral para defenderse contra los virus invasores. Una de las primeras barreras de defensas antivirales de la planta es el silenciamiento génico (Ding y Voinnet, 2007). El mismo, también llamado ARN de interferencia (ARNi), es un mecanismo evolutivo,

conservado y específico de secuencia que defiende directamente las células huésped contra ácidos nucleicos extraños como virus y elementos transponibles (Voinnet, 2009). Esta defensa se desencadena por la presencia de moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc), los cuales son procesados por enzimas tipo Dicer (DCL) en pequeños ARN derivados de virus (siARN) que se cargan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se usan para guiar el silenciamiento del genoma viral (Wang *et al.*, 2011; Pumplin y Voinnet, 2013; Sharma *et al.*, 2013). Para resistir las infecciones virales, local y sistémicamente, las plantas generan siARN secundarios, una señal de silenciamiento móvil que se propaga desde el sitio de infección a los tejidos circundantes y en largas distancias a través de los plasmodesmos y el floema. Este proceso autónomo no celular estimula el silenciamiento del ARN en células no infectadas y depende de las proteínas RDR del huésped (Wang *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2010)

Otro tipo de respuesta de la planta frente a patógenos virales y similar al tipo de respuesta montada frente a patógenos no virales que tiene como finalidad prevenir la propagación del virus en la planta, es la HR que se produce como consecuencia de la interacción entre proteínas AvR/R (Coll *et al.*, 2011). Esta interacción AvR/R puede desencadenar una cascada de señalizaciones que culminan en la activación de MAPK y conducir a una rápida acumulación de ROS y hormonas de defensa, AS y AJ. A nivel celular, la HR se asocia con la entrada de iones calcio, la deposición de calosa en los plasmodesmos, la modificación de la permeabilidad de la membrana y una drástica reprogramación transcripcional que conduce a la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) (Culver y Padmanabhan, 2007; Carr *et al.*, 2010; Pallas y García, 2011).

La noción de que los virus codifican PAMPs que son reconocidos por PRRs, como por ej. los ácidos nucleicos derivados del virus, ha sido ampliamente documentada en los sistemas animales (Song y Lee, 2012) y, la evidencia reciente ha extendido el concepto de PTI viral a los sistemas de interacción planta-virus (Gouveia *et al.*, 2017). Recientemente, se ha comprobado la participación de la PTI en la defensa antiviral en *Arabidopsis*, al demostrar que las mutantes en el co-receptor quinasa BAK1/SERK3 presentan una susceptibilidad incrementada frente a diferentes virus de ARN y que las plantas responden de manera BAK1-dependiente frente a extractos crudos de plantas

infectadas con virus, pero no a viriones purificados (Kørner *et al.*, 2013). Consistentemente, ha sido demostrado que SERK4, miembro de la familia SERK relacionado con BAK1, (también llamado BAK1-LIKE, BKK1) y la quinasa NIK1, relacionada con la familia SERK, están involucrados en la resistencia frente a virus (Yang *et al.*, 2010; Zorzatto *et al.*, 2015). A su vez, ha sido demostrado que el ARNdc derivado de virus y análogos sintéticos del ARNdc, funcionan como PAMP virales en *Arabidopsis* e inducen una respuesta de tipo PTI (Niehl *et al.*, 2016). De hecho, la aplicación de ARNdc a discos foliares de *Arabidopsis* resultó en la inducción de respuestas típicas de tipo PTI, incluida la activación de MAPK, la síntesis de etileno y la expresión de genes de defensa. Además, se demostró que el tratamiento con ARNdc, confiere protección contra virus ya que plantas inoculadas con un análogo sintético del ARNdc, e infectadas con el virus ORMV, mostraron una menor acumulación viral en las hojas tratadas. Curiosamente, la PTI mediada por el ARNdc parece ser independiente de la vía del silenciamiento génico e involucra al co-receptor BAK1/SERK1 (Niehl *et al.*, 2016).

En este trabajo de tesis se demostró que el pre-tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con la proteína AsESm, deriva en una disminución significativa de la carga viral, evidenciado por una menor acumulación de la proteína de la cápside (CP) del virus TMV-Cg. Asimismo, se observó que esta resistencia antiviral y por lo tanto el reconocimiento de AsES como inductor antiviral, no es especie-específico ya que el efecto también se evidenció en *N. benthamiana*, perteneciente a la familia de las solanáceas. Basado en el hecho de que la proteína AsES es BAK1 dependiente y que este co-receptor contribuye a la resistencia antiviral (Kørner *et al.*, 2013), consideramos que el efecto antiviral inducido por AsES, estaría vinculado a su dependencia de BAK1.

Como perspectivas de esta parte del trabajo, sería interesante determinar si aún en ausencia del co-receptor BAK1, la proteína AsES es capaz de activar las defensas antivirales en las plantas y poder atribuir las diferencias y especificidad de la respuesta en el mecanismo de acción frente a virus, a nivel del receptor de membrana.

5.3.1 *Inhibición del movimiento célula a célula y del movimiento sistémico*

Los plasmodesmos (PD), la unidad fundamental de la multicelularidad en las plantas, son nanocanales únicos que unen dos células vecinas a través de su membrana y continuidad citoplasmática. Los PD permiten el paso de pequeñas moléculas como iones, hormonas, fotoasimilados y otros nutrientes a través de la unión formada entre la membrana plasmática y la membrana del retículo endoplásmico (RE). Está bien documentado que el sistema de tráfico plasmodesmático es esencial para la comunicación intercelular mediada por macromoléculas endógenas como proteínas no autónomas de células (PNAC), señales de silenciamiento de ARN y ARN mensajeros (Lucas *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2002; Dunoyer *et al.*, 2005) de manera que las plantas desarrollaron mecanismos para el tráfico de señales por medio de PD.

Las interacciones íntimas entre los genomas virales/productos codificados por el genoma y los factores celulares del huésped, incluidas las maquinarias transcripcionales, traduccionales y de transporte macromolecular del huésped, determinan el éxito de la infección viral (Kumar *et al.*, 2015). Una parte importante de los virus de plantas se propaga bajo la forma de un complejo de ribonucleoproteínas (RNP) de célula a célula a través de los PD para crear una infección local, y se carga en la vasculatura del floema para el transporte de larga distancia (Benitez-Alfonso *et al.*, 2010). El potencial de propagación de un virus es un factor importante que determina su virulencia y patogenicidad. Para el transporte exitoso de virus de plantas de células infectadas a células vecinas, los mismos codifican una o más proteínas virales como las MP y CP, que se unen al ARN viral y aumentan el tamaño del límite de exclusión del PD para facilitar el paso del genoma viral (Fujiwara *et al.*, 1993; Oparka *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 2001; Lucas *et al.*, 2009). El PD puede cambiar su estado de manera transitoria de "cerrado" a "abierto" al estado "dilatado" (Levy *et al.*, 2007). Estos cambios regulan la permeabilidad simplasmática de la planta y juegan un papel importante en su desarrollo y defensa. El posible mecanismo para controlar la permeabilidad del PD es la deposición e hidrólisis de callosa (β -1,3-glucano) que existe en los alrededores del PD. Durante la infección de los virus que no son guiados por túbulos, la reducción del nivel de calosa alrededor de los PD se correlaciona con un mayor nivel de infección (Iglesias y Meins, 2000; Lee y Lu, 2011). Por el contrario, el silenciamiento de la β -1,3-glucanasa en *N. sylvestris* induce una acumulación

incrementada de calosa alrededor de las lesiones de TMV lo que produce una reducción del límite de exclusión del PD, resultando en una disminución de la susceptibilidad a TMV (Beffa *et al.*, 1996; Iglesias y Meins, 2000).

La disminución del movimiento célula a célula así como del movimiento sistémico del virus TMV evidenciado luego del tratamiento con la proteína AsES, podría estar asociado a la deposición de calosa cercana a las lesiones, dificultando así el movimiento viral. Si bien en este trabajo de tesis no se realizaron ensayos que permitan analizar el contenido de calosa, ha sido previamente reportado que el tratamiento con AsES induce la acumulación de este compuesto en *Fragaria ananassa* entre las 12 h y los 7 dpt (Chalfoun, 2009; Hael-Conrad *et al.*, 2018), hecho que apoya la hipótesis planteada.

Para concluir, ha sido demostrado en esta parte del trabajo, que la proteína AsES es capaz de activar la inmunidad antiviral en plantas mediante una respuesta de tipo PTI asociada al co-receptor BAK1, que parece ser independiente del silenciamiento génico. La resistencia antiviral mediada por la proteína AsES es de amplio espectro, siendo observada en diferentes familias de plantas y genera entre otro tipo de respuestas un retraso en el movimiento local y sistémico del virus que se correlacionan con el nivel de infección observado. La proteína AsES puede considerarse un inductor de amplio espectro, capaz de generar resistencia frente a hongos, bacterias y virus.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La proteína AsES (S8) pudo ser obtenida de forma de recombinante a partir de su expresión heteróloga en *E. coli*.
2. La proteína AsESc, expresada como un zimógeno con los dominios I9+S8, sufre un proceso de maduración post-traducciona, que demuestra la ocurrencia de dicho proceso predicho *in silico* para la proteína AsES-WT, obtenida del sobrenadante de *A. strictum*.
3. La proteína AsES recombinante, al igual que la proteína AsES-WT, tiene actividad inductora de las defensas en plantas de Arabidopsis.
4. La actividad inductora de la defensa de la proteína AsES es independiente de la actividad enzimática ya que diferentes versiones desprovistas de actividad proteolítica fueron capaces de gatillar la respuesta de defensa en plantas de Arabidopsis.
5. La actividad inductora de AsES es BAK1/SERK3 dependiente, lo que sugiere fuertemente que AsES es un inductor de las defensas primarias, reconocido por la planta como una Patrón Molecular Asociado a Patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés).
6. Péptidos obtenidos de la proteína AsES logran reproducir parcialmente la actividad inductora, evidenciada por una inhibición del crecimiento de plántulas de Arabidopsis. Sin embargo, no se logró la identificación de un epítopo inmunogénico.
7. La proteína AsES activa la inmunidad antiviral en plantas pertenecientes a las familias de las Brassicáceas y Solanáceas, reduciendo significativamente el nivel de infección.
8. El tratamiento de plantas con la proteína AsES reduce el movimiento célula a célula y el movimiento sistémico del virus TMV.

9. La proteína AsES puede emplearse como un inductor de las defensas en plantas de amplio espectro, que confiere resistencia frente a hongos, bacterias y virus.
10. El entendimiento del mecanismo de acción de la proteína AsES contribuirá al desarrollo de estrategias de mejoramiento para conferir resistencia durable en plantas

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados del presente trabajo permitieron obtener la proteína AsES en forma recombinante y ratificar su actividad inductora intrínseca. Por otra parte, se confirmó que la actividad enzimática no es necesaria para inducir una inducción de la respuesta de defensa en plantas de Arabidopsis. Se dilucidó además, parte de su mecanismo de acción, al determinar que la proteína AsES es percibida como un inductor de tipo PAMP. Finalmente, se determinó que AsES activa la inmunidad antiviral en plantas, independientemente de la especie.

PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis constituye un avance importante en cuanto al desarrollo de un método de obtención alternativo y más eficiente de la proteína AsES. Sin embargo, consideramos posible lograr una mejora en los rendimientos y estabilidad de la proteína realizando para ello ensayos exploratorios en otro sistema de expresión eucariota como *Pichia pastoris*.

Por otra parte, la identificación del receptor a nivel de membrana de AsES y la prueba de su interacción directa, contribuirán a la caracterización aún más profunda del mecanismo molecular de acción de la proteína inductora de las defensas AsES.

Finalmente, la proteína AsES podrá ser utilizada como un compuesto inductor de la inmunidad antiviral en plantas. La evaluación de su efecto en cultivos de interés agronómico que resultan gravemente afectados por la virosis como, papa, tomate y frutilla así como el análisis de su impacto en el rendimiento, será de gran utilidad en el diseño de estrategias racionales para lograr resistencia duradera y de amplio espectro a enfermedades en plantas.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Albert M.** 2013. Peptides as triggers of plant defence. *Journal of Experimental Botany* **64**, 5269–5279.
- Alexander PA, Ruan B, Bryan PN.** 2001. Cation-dependent stability of subtilisin. *Biochemistry* **40**, 10634–9.
- Angel CA, Hsieh Y-C, Schoelz JE.** 2011. Comparative Analysis of the Capacity of Tombusvirus P22 and P19 Proteins to Function as Avirulence Determinants in *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 91–99.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N.** 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et biophysica acta* **1473**, 4–8.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J.** 2002. Map kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- Ausubel FM.** 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* **6**, 973–979.
- Bailey BA, Dean JFD, Anderson JD.** 1990. An Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase Elicits Electrolyte Leakage and Necrosis in *Nicotiana tabacum* cv Xanthi Leaves. *Plant Physiology* **94**, 1849–1854.
- Bailey BA, Korcak RF, Anderson JD.** 1993. Sensitivity to an Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase in *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi Is Controlled by a Single Dominant Gene. *Plant Physiology* **101**, 1081–1088.
- Bajorath J, Saenger W, Pal GP.** 1988. Autolysis and inhibition of proteinase K , a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album* Limber Ji ~ rgen Bajorath , Wolfram Saenger and Gout Pada Pal *. *Biochim Biophys Acta* **954**, 176–182.
- Bar M, Sharfman M, Ron M, Avni A.** 2010. BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant Journal* **63**, 791–800.
- Basu A, Li X, Leong SSJ.** 2011. Refolding of proteins from inclusion bodies: Rational design and recipes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **92**, 241–251.
- Beffa RS, Hofer RM, Thomas M, Meins F.** 1996. Decreased Susceptibility to Viral Disease of [beta]-1,3-Glucanase-Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. *The Plant cell* **8**, 1001–1011.
- Benitez-Alfonso Y, Faulkner C, Ritzenthaler C, Maule AJ.** 2010. Plasmodesmata: Gateways to Local and Systemic Virus Infection. *Mol Plant Microbe Interact.* **23**, 1403–1412.

- Betzel C, Teplyakov A V, Harutyunyan EH, Saenger W, Wilson KS.** 1990. Thermitase and proteinase K: a comparison of the refined three-dimensional structures of the native enzymes. *Protein engineering* **3**, 161–72.
- Böhm H, Albert I, Fan L, Reinhard A, Nürnberger T.** 2014. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 47–54.
- Boller T, Felix G.** 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379–406.
- Bologna NG, Voinnet O.** 2014. The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 473–503.
- Boualem A, Dogimont C, Bendahmane A.** 2016. The battle for survival between viruses and their host plants. *Current Opinion in Virology* **17**, 32–38.
- Boutrot F, Zipfel C.** 2017. Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **55**, 257–286.
- Boyes DC.** 2001. Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* **13**, 1499–1510.
- Bradford MM.** 1976. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Budič M, Sabotič J, Meglič V, Kos J, Kidrič M.** 2013. Characterization of two novel subtilases from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their responses to drought. *Plant Physiology and Biochemistry* **62**, 79–87.
- Burgyán J, Havelda Z.** 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* **16**, 265–272.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al.** 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622.
- Calil IP, Fontes EPB.** 2017. Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany* **119**, 711–723.
- Callis J.** 1995. Regulation of Protein Degradation. *Plant cell* **7**, 845–857.
- Carbonell A, Carrington JC.** 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 111–117.
- Carr JP, Lewsey MG, Palukaitis P.** 2010. *Signaling in Induced Resistance*. Elsevier Inc.
- Chalfoun N.** 2009. Caracterización molecular de la respuesta defensiva de la frutilla mediada por moléculas inductoras de un patógeno avirulento. Tesis doctoral.
- Chalfoun NR, Castagnaro AP, Díaz Ricci JC.** 2011. Induced resistance activated by a culture

filtrate derived from an avirulent pathogen as a mechanism of biological control of anthracnose in strawberry. *Biological Control* **58**, 319–329.

Chalfoun NR, Durman SB, Budeguer F, et al. 2018a. Development of PSP1, a biostimulant based on the elicitor AsES for disease management in monocot and dicot crops. *Frontiers in Plant Science* **9**, 844.

Chalfoun NR, Durman SB, González-Montaner J, et al. 2018b. Elicitor-Based Biostimulant PSP1 Protects Soybean Against Late Season Diseases in Field Trials. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1–14.

Chalfoun NR, Grellet-Bournonville CF, Martínez-Zamora MG, Díaz-Perales A, Castagnaro AP, Díaz-Ricci JC. 2013. Purification and characterization of AsES protein: A subtilisin secreted by *Acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 14098–14113.

Che P, Bussell JD, Zhou W, Estavillo GM, Pogson BJ, Smith SM. 2010. Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in *Arabidopsis*. *Science signaling* **3**, ra69.

Chinchilla D. 2006. The *Arabidopsis* Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *Plant Cell* **18**, 465–476.

Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B. 2009. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science* **14**, 535–541.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500.

Coll NS, Epple P, Dangl JL. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* **18**, 1247–1256.

Conci VC, Luciani CE, Merino MC, et al. 2017. Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. *Acta Horticulturae* **1156**, 801–809.

Converse R. 1987. *Virus Diseases of Small Fruits*. Agriculture Handbook N° 631. Washington, DC, USA: U.S. Dep. Agric., 227.

Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. 2015. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annual Review of Phytopathology* **53**, 541–563.

Cornelis P. 2000. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 450–454.

Couto D, Zipfel C. 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* **16**, 537–552.

Cui H, Tsuda K, Parker JE. 2015. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to

- Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 487–511.
- Culver JN, Padmanabhan MS.** 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annual review of phytopathology* **45**, 221–43.
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ.** 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* **341**, 1–14.
- De-Marco A.** 2009. Microbial Cell Factories Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **8**, 1–18.
- Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P.** 2010. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *International journal of microbiology* **2010**, 148178.
- Demain AL, Vaishnav P.** 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* **27**, 297–306.
- Denoyes-Rothan B, Guérin G, Lerceteau-Köhler E, Risser G.** 2005. Inheritance of Resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria × ananassa*. *Phytopathology* **95**, 405–412.
- Ding S-W, Voinnet O.** 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413–426.
- Dodson G, Wlodawer A.** 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends in biochemical sciences* **23**, 347–52.
- Dolja V V, Peremyslov V V, Keller KE, Martin RR, Hong J.** 1998. Isolation and stability of histidine-tagged proteins produced in plants via potyvirus gene vectors. *Virology* **252**, 269–74.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O.** 2005. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* **37**, 1356–1360.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS.** 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal* **45**, 616–629.
- Elbaz M, Avni A, Weil M.** 2002. Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Cell Death & Differentiation* **9**, 726–733.
- Enkerli J, Felix G, Boller T.** 1999. The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiology* **121**, 391–7.
- Farnham G, Baulcombe DC.** 2006. Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 18828–18833.
- Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N.** 2016. Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. **8**, 16–22.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the

most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* **18**, 265–276.

Fernández Valiela M V. 1995. *Los virus patógenos de las plantas y su control.*

Figueiredo A, Monteiro F, Sebastiana M. 2014. Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Frontiers in Plant Science* **5**, 739.

Figueiredo J, Silva MS, Figueiredo A. 2018. Subtilisin-like proteases in plant defence : the past , the present and beyond. *Molecular Plant Pathology* **19**, 1017–1028.

Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopatol* **9**, 275–296.

Folimonova SY, Tilsner J. 2018. Hitchhikers, highway tolls and roadworks: the interactions of plant viruses with the phloem. *Current Opinion in Plant Biology* **43**, 82–88.

Freeman S, Katan T. 1997. Identification of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose and Root Necrosis of Strawberry in Israel. *Phytopathology* **87**, 516–521.

Frías M, González C, Brito N. 2011. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to Botrytis cinerea virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist* **192**, 483–495.

Fu ZQ, Dong X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 839–863.

Fu X, Inouye M, Shinde U. 2000. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 16871–16878.

Fuchs Y, Saxena A, Gamble HR, Anderson JD. 1989. Ethylene Biosynthesis-Inducing Protein from Cellulysin Is an Endoxylanase. *Plant Physiology* **89**, 138–143.

Fujiwara T, Giesman-Cookmeyer D, Ding B, Lommel SA, Lucas WJ. 1993. Cell-to-Cell Trafficking of Macromolecules through Plasmodesmata Potentiated by the Red Clover Necrotic Mosaic Virus Movement Protein. *The Plant cell* **5**, 1783–1794.

Furman-Matarasso N, Cohen E, Du Q, Chejanovsky N, Hanania U, Avni A. 1999. A point mutation in the ethylene-inducing xylanase elicitor inhibits the beta-1-4-endoxylanase activity but not the elicitation activity. *Plant Physiology* **121**, 345–51.

Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che F-S. 2014. Two Distinct EF-Tu Epitopes Induce Immune Responses in Rice and Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact.* **27**, 113–124.

Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. 2006. Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711–724.

Gecchele E, Merlin M, Brozzetti A, Falorni A, Pezzotti M, Avesani L. 2015. A Comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect Cells and Plant Systems. *Journal of Visualized Experiments* **97**, 52459.

- Gergerich RC, Dolja V V.** 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. DOI: 10.10.
- Giner A, Lakatos L, García-Chapa M, López-Moya JJ, Burgyán J.** 2010. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathogens* **6**, 1–13.
- Glazebrook J.** 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205–227.
- Gómez-Gómez L, Boller T.** 2000. FLS2 : An LRR Receptor – like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**, 1003–1011.
- Gottesman S.** 1996. Proteases and their targets in Escherichia coli. *Annual Review of Genetics* **30**, 465–506.
- Gottwald S, Samans B, Lück S, Friedt W.** 2012. Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: Two essential mechanisms of Fusarium head blight resistance in wheat? *BMC Genomics* **13**, 369.
- Goulding CW, Perry LJ.** 2003. Protein production in Escherichia coli for structural studies by X-ray crystallography. *Journal of structural biology* **142**, 133–43.
- Gouveia BC, Calil IP, Machado JPB, Santos AA, Fontes EPB.** 2017. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1–14.
- Granel A, Bellés JM, Conejero V.** 1987. Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**, 83–90.
- Grant MR, Jones JDG.** 2009. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**, 750–2.
- Grellet-Bournonville CF, Martinez-Zamora MG, Castagnaro AP, Díaz-Ricci JC.** 2012. Temporal accumulation of salicylic acid activates the defense response against Colletotrichum in strawberry. *Plant Physiology and Biochemistry* **54**, 10–16.
- Gross P, Kalk KH, Hol WGJ.** 1991. Calcium Binding to Thermitase Crystallographic studies of thermitase at 0,5 and 100 mM calcium. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 2953–2961.
- Gunkel FA, Gassen HG.** 1989. Proteinase K from Tritirachium album Limber. Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in Escherichia coli. *European journal of biochemistry* **179**, 185–94.
- Gust AA, Felix G.** 2014. Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 104–111.
- Hael-Conrad V, Abou-Mansour E, Díaz-Ricci JC, Métraux JP, Serrano M.** 2015. The novel elicitor AsES triggers a defense response against Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana. *Plant Science* **241**, 120–127.

- Hael-Conrad V, Perato SM, Arias ME, Martínez-Zamora MG, Di Peto P de los Á, Martos GG, Castagnaro AP, Díaz-Ricci JC, Chalfoun NR.** 2018. The Elicitor Protein AsES Induces a Systemic Acquired Resistance Response Accompanied by Systemic Microbursts and Micro-Hypersensitive Responses in *Fragaria ananassa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**, 46–60.
- Hancock JF.** 1999. *Strawberries*. CABI Pub., 1999.
- Harris CJ, Slootweg EJ, Goverse A, Baulcombe DC.** 2013. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 21189–21194.
- Hartley BS.** 1960. Proteolytic enzymes. *Annual review of biochemistry* **29**, 45–72.
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP.** 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12217–12222.
- Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F.** 2013. Viral and Cellular Factors Involved in Phloem Transport of Plant Viruses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1–24.
- Ho S, Hunt H, Horton R, Pullen J, Pease L.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.
- Hoffmann F, Rinas U.** 2004. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **89**, 73–92.
- Hoser R, Zurczak M, Lichocka M, et al.** 2013. Nucleocytoplasmic partitioning of tobacco N receptor is modulated by SGT1. *New Phytologist* **200**, 158–171.
- Howard CM, Maas JL, Chandler CK, Afbregts EE.** 1992. Anthracnose of Strawberry Caused by the Colletotrichum Complex in Florida. *Plant disease* **76**, 976–981.
- Hu G, Leger RJS.** 2004. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *Journal of evolutionary biology* **17**, 1204–14.
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q.** 2001. RESISTANCE GENE COMPLEXES: Evolution and Utilization. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 285–312.
- Hunke S, Betton J-M.** 2003. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **50**, 1579–89.
- Iglesias VA, Meins F.** 2000. Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **21**, 157–66.
- Ikemura H, Inouye M.** 1988. In vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **263**, 12959–63.
- Jana S, Deb JK.** 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 289–298.

- Jones JDG, Dangl JL.** 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jordá L, Coego A, Conejero V, Vera P.** 1999. A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *The Journal of biological chemistry* **274**, 2360–5.
- Jordá L, Conejero V, Vera P.** 2000. Characterization of P69E and P69F, Two Differentially Regulated Genes Encoding New Members of the Subtilisin-Like Proteinase Family from Tomato Plants. *Plant Physiology* **122**, 67–73.
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J.** 2003. Protein Disulfide Bond Formation in Prokaryotes. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 111–135.
- Kamoun S.** 2006. A Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 41–60.
- Khan AR, James MNG.** 2008. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science* **7**, 815–836.
- Khush GS.** 2001. Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* **2**, 815–822.
- Kim BH, Kim SY, Nam KH.** 2013. Assessing the diverse functions of BAK1 and its homologs in arabidopsis, beyond BR signaling and PTI responses. *Molecules and Cells* **35**, 7–16.
- Kirschbaum DS, Vicente CE, Cano-Torres MA, Gambardella M, Veizaga-Pinto FK, Antunes LEC.** 2017. Strawberry in South America: From the Caribbean to Patagonia. *Acta Horticulturae* **1156**, 947–956.
- Koornneef A, Pieterse CMJ.** 2008. Update on Cross Talk in Defense Signaling Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* **146**, 839–844.
- Kørner CJ, Klauser D, Niehl A, Domínguez-Ferreras A, Chinchilla D, Boller T, Heinlein M, Hann DR.** 2013. The Immunity Regulator *BAK1* Contributes to Resistance Against Diverse RNA Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 1271–1280.
- Kumar D, Kumar R, Hyun TK, Kim J-Y.** 2015. Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *Journal of Plant Research* **128**, 37–47.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G.** 2004. The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell* **16**, 3496–3507.
- Lee J, Eschen-Lippold L, Lassowskat I, Böttcher C, Scheel D.** 2015. Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Frontiers in Plant Science* **6**, 940.
- Lee J-Y, Lu H.** 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in plant science* **16**, 201–10.
- Leibman D, Kravchik M, Wolf D, et al.** 2018. Differential expression of cucumber RNA-dependent RNA polymerase 1 genes during antiviral defence and resistance. *Molecular Plant Pathology* **19**, 300–312.

- Levy A, Guenoune-Gelbart D, Epel BL.** 2007. beta-1,3-Glucanases: Plasmodesmal Gate Keepers for Intercellular Communication. *Plant signaling & behavior* **2**, 404–7.
- Li J, Brader G, Kariola T, Tapio Palva E.** 2006. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant Journal* **46**, 477–491.
- Li F, Huang C, Li Z, Zhou X.** 2014. Suppression of RNA Silencing by a Plant DNA Virus Satellite Requires a Host Calmodulin-Like Protein to Repress RDR6 Expression. *PLoS Pathogens* **10**, 11–14.
- Li B, Meng X, Shan L, He P.** 2016. Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants. *Cell Host Microbe* **19**, 641–650.
- Lindbo JA.** 2007. TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiology* **145**, 1232–1240.
- Liu J-X, Howell SH.** 2010. bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**, 782–96.
- Liu J-X, Srivastava R, Che P, Howell SH.** 2007. Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **51**, 897–909.
- Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M.** 2012. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories* **11**, 753.
- Loebenstein G.** 2008. Plant Virus Diseases: Economic Aspects. *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier Ltd, 197–201.
- Lozano-Durán R, Zipfel C.** 2015. Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* **20**, 12–19.
- Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, Nguyen L, Baker L, Ding B, Hake S.** 1995. Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980–1983.
- Lucas WJ, Ham B-K, Kim J-Y.** 2009. Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends in Cell Biology* **19**, 495–503.
- Luciani C, Celli MG, Torrico AK, Asinari F, Pozzi E, Peña Malavera A, Kirschbaum DS, Perotto MC, Conci VC.** 2018. Incidence and prevalence of aphid-borne viruses infecting strawberry in Argentina. *Annals of Applied Biology* **173**, 80–91.
- Maas J.** 1998. *Compendium of Strawberry Virus Diseases*. St Paul, MN: APS Press.
- Makrides SC.** 1996. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli. *Microbiol Rev.* **60**, 512–538.

- Malthus TR.** 1807. *An Essay on the Principle of Population* (LJ Johnson, Ed.).
- Mandadi KK, Scholthof K-BG.** 2013. Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *The Plant Cell* **25**, 1489–1505.
- Marone D, Russo MA, Laidò G, De Leonardis AM, Mastrangelo AM.** 2013. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 7302–7326.
- Martin RR, Tzanetakis IE.** 2006. Characterization and Recent Advances in Detection of Strawberry Viruses. *Plant Disease* **90**.
- Matthews BW, Weaver LH, Kester WR.** 1974. The conformation of thermolysin. *The Journal of biological chemistry* **249**, 8030–44.
- Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ.** 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 367–376.
- Mena A, De Garcia E, González M.** 1974. Presencia de la antracnosis de la frutilla en la República Argentina. *Revista Agronómica NOA* **11**, 307–312.
- Meng X, Xu J, He Y, Yang K-Y, Mordorski B, Liu Y, Zhang S.** 2013. Phosphorylation of an ERF Transcription Factor by Arabidopsis MPK3/MPK6 Regulates Plant Defense Gene Induction and Fungal Resistance C W. *Plant Cell* **25**, 1126–1142.
- Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA.** 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* **23**, 177–202.
- Messens J, Collet J-F.** 2006. Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 1050–1062.
- Mishina TE, Zeier J.** 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **50**, 500–513.
- Mitra N, Sinha S, Ramya TNC, Surolia A.** 2006. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in biochemical sciences* **31**, 156–63.
- Moallaei H, Zaini F, Larcher G, Beucher B, Bouchara JP.** 2006. Partial purification and characterization of a 37 kDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia* **161**, 369–375.
- Moffat CS, Ingle RA, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR.** 2012. ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **7**, 1–11.
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC.** 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* **328**, 872–5.

- Mónaco M, Salazar S, Aprea A, Díaz Ricci J, Castagnaro A.** 2000. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on strawberry in north-western Argentina. *Plant Dis.* **84**, 595.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E.** 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of experimental botany* **59**, 501–20.
- Murphy E, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA.** 1995. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses* (MD Summers, Ed.). Springer-Verlag Wien GmbH.
- Muthamilarasan M, Prasad M.** 2013. Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* **38**, 433–449.
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, et al.** 2007. Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 2095–2100.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones J.** 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* **135**, 1113–1128.
- Niehl A, Wyrsh I, Boller T, Heinlein M.** 2016. Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytologist* **211**, 1008–1019.
- Nühse TS, Peck SC, Hirt H, Boller T.** 2000. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK6. *The Journal of biological chemistry* **275**, 7521–7526.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L.** 2004. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**, 249–266.
- Ohta Y, Inouye M.** 1990. Pro-subtilisin E: purification and characterization of its autoprocessing to active subtilisin E in vitro. *Molecular microbiology* **4**, 295–304.
- Olivieri F, Eugenia Zanetti M, Oliva CR, Covarrubias AA, Casalongué CA.** 2002. Characterization of an Extracellular Serine Protease of *Fusarium eumartii* and its Action on Pathogenesis Related Proteins. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 63–72.
- Olivieri F, Godoy A V., Escande A, Casalongue CA.** 1998. Analysis of intercellular washing fluids of potato tubers and detection of increased proteolytic activity upon fungal infection. *Physiologia Plantarum* **104**, 232–238.
- Oparka KJ, Prior DA, Santa Cruz S, Padgett HS, Beachy RN.** 1997. Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant Journal* **12**, 781–789.
- Outchkourov NS, Rogelj B, Strukelj B, Jongsma MA.** 2003. Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant*

physiology **133**, 379–90.

Pallas V, García JA. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *The Journal of general virology* **92**, 2691–705.

Pearce G, Yamaguchi Y, Barona G, Ryan CA. 2010. A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14921–5.

Pekkarinen AI, Jones BL. 2003. Purification and identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins that inhibit the alkaline serine proteinases of *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1710–1717.

Perato SM, Martínez-Zamora MG, Salazar SM, Díaz-Ricci JC. 2018. The elicitor AsES stimulates ethylene synthesis, induce ripening and enhance protection against disease naturally produced in avocado fruit. *Scientia Horticulturae* **240**, 288–292.

Perona J, Craik CS. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science* **4**, 337–360.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.

Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**, 489–521.

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**, 308–316.

Polák J, Kumar J, Krška B, Ravelonandro M. 2012. Biotech/GM Crops in Horticulture: Plum cv. HoneySweet Resistant to Plum Pox Virus. *Plant Protect. Sci.* **48**, 43–48.

Pumplin N, Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 745–760.

Racedo J, Salazar SM, Castagnaro AP, Díaz Ricci JC. 2013. A strawberry disease caused by *Acremonium strictum*. *European Journal of Plant Pathology* **137**, 649–654.

Ramallo CJ, Ploper LD, Ontivero M, Filippone, M. P. Castagnaro A, Díaz Ricci J. 2000. First report of *Colletotrichum acutatum* on strawberry in northwestern Argentina. *Plant Disease* **84**, 706 ref.1.

Ramírez V, López A, Mauch-Mani B, Gil MJ, Vera P. 2013. An Extracellular Subtilase Switch for Immune Priming in Arabidopsis. *PLoS Pathogens* **9**, :e1003445.

Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. 2004. Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology* **12**, 509–517.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande V V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **62**, 597–

635.

Rawlings ND. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **34**, D270–D272.

Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. 2013. InfoStat.

Robatzek S, Bittel P, Chinchilla D, Köchner P, Felix G, Shiu SH, Boller T. 2007. Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Molecular Biology* **64**, 539–547.

Roberts IM, Boevink P, Roberts AG, Sauer N, Reichel C, Oparka KJ. 2001. Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* **218**, 31–44.

Rocha Peña M, Ocho-Corona F, Martinez-Soriano, JP Roistacher C, Lee R. 1998. Citrus Tristeza Virus: Events that occur before, during and after disease epidemics. *Subtropical Plant Science* **50**, 26–36.

Rodriguez MC. 2015. Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la modulación de la expresión génica y en la alteración de factores endógenos del hospedante *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral.

Ron M, Avni A. 2004. The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Plant Cell* **16**, 1604–1615.

Ron M, Kantety R, Martin GB, Avidan N, Eshed Y, Zamir D, Avni A. 2000. High-resolution linkage analysis and physical characterization of the EIX-responding locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 184–189.

Rosano GL, Ceccarelli EA, Neubauer P, Bruno-Barcena JM, Schweder T. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* **5**.

Rotblat B, Enshell-Seijffers D, Gershoni JM, Schuster S, Avni A. 2002. Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **32**, 1049–55.

Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tör M, de Vries S, Zipfel C. 2011. The *Arabidopsis* Leucine-Rich Repeat Receptor–Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. *The Plant Cell* **23**, 2440–2455.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* **37**, e45.

Russell D, Oldham NJ, Davis BG. 2009. Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydrate Research* **344**, 1508–1514.

- Salazar SM, Castagnaro AP, Arias ME, Chalfoun N, Tonello U, Díaz Ricci JC.** 2007. Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *European Journal of Plant Pathology* **117**, 109–122.
- Samal BB, Karan B, Boone TC, Chen KK, Rohde MF, Stabinsky Y.** 1989. Cloning and expression of the gene encoding a novel proteinase from *Tritirachium album* Limber. *Gene* **85**, 329–333.
- Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, Namba K.** 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**, 331–7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (CSHL Press, Ed.). Cold Spring Harbor, New York.
- Sastry KS, Zitter TA.** 2014. Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics. In: *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*. Springer, Dordrecht
- Sato M, Tsuda K, Wang L, Collier J, Watanabe Y, Glazebrook J, Katagiri F.** 2010. Network modeling reveals prevalent negative regulatory relationships between signaling sectors in arabidopsis immune signaling. *PLoS Pathogens* **6**, 1–15.
- Schaller A, Stintzi A, Rivas S, et al.** 2018. From structure to function – a family portrait of plant subtilases. *New Phytologist* **218**, 901–915.
- Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, et al.** 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **12**, 938–954.
- Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D.** 2010. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 9444–9451.
- Seybold H, Trempel F, Ranf S, Scheel D, Romeis T, Lee J.** 2014. Ca²⁺ signalling in plant immune response : from pattern recognition. *New Phytologist* **204**, 782–790.
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB, Sheen J.** 2008. Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity. *Cell Host and Microbe* **4**, 17–27.
- Shang J, Xi DH, Xu F, et al.** 2011. A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta* **233**, 299–308.
- Sharma N, Sahu PP, Puranik S, Prasad M.** 2013. Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs). *Molecular biotechnology* **55**, 63–77.
- Sharon A, Fuchs Y, Anderson JD.** 1993. The Elicitation of Ethylene Biosynthesis by a *Trichoderma* Xylanase Is Not Related to the Cell Wall Degradation Activity of the Enzyme. *Plant Physiol* **102**, 1325–1329.
- Sharp JM, Doran PM.** 2001. Characterization of monoclonal antibody fragments produced by

plant cells. *Biotechnology and bioengineering* **73**, 338–46.

Shinde U, Thomas G. 2011. Insights from bacterial subtilases into the mechanisms of intramolecular chaperone-mediated activation of furin. *Methods in molecular biology* **768**, 59–106.

Siezen RJ, Leunissen JAM. 1997. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* **6**, 501–523.

Siezen RJ, De Vos WM, Leunissen JAM, Dijkstra BW. 1991. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Engineering, Design and Selection* **4**, 719–737.

Singh P, Kuo Y-C, Mishra S, et al. 2012. The Lectin Receptor Kinase-VI.2 Is Required for Priming and Positively Regulates Arabidopsis Pattern-Triggered Immunity. *The Plant Cell* **24**, 1256–1270.

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Rassoulian Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology* **4**, 1247–1253.

Smith BJ, Black LL. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.* **74**, 69–76.

Smith ML, Keegan ME, Mason HS, Shuler ML. 2002. Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems. *Biotechnology progress* **18**, 538–50.

Song DH, Lee J-O. 2012. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological Reviews* **250**, 216–229.

Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X. 2009. Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* **137**, 860–872.

Srivastava R, Liu J-X, Guo H, Yin Y, Howell SH. 2009. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. *Plant Journal* **59**, 930–9.

Sroga GE, Dordick JS. 2002. A strategy for in vivo screening of subtilisin E reaction specificity in *E. coli* periplasm. *Biotechnology and Bioengineering* **78**, 761–769.

Stegmann M, Monaghan J, Smakowska-Luzan E, Rovenich H, Lehner A, Holton N, Belkhadir Y, Zipfel C. 2017. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* **355**, 287–289.

Stevens LH, Stoop GM, Elbers IJW, Molthoff JW, Bakker HAC, Lommen A, Bosch D, Jordi W. 2000. Effect of Climate Conditions and Plant Developmental Stage on the Stability of Antibodies Expressed in Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* **124**, 173–182.

- Terpe K.** 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* **72**, 211–22.
- Thomas EL, van der Hoorn RAL.** 2018. Ten Prominent Host Proteases in Plant-Pathogen Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, pii: E639. doi: 10.3390/ijms19020639.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ.** 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* **23**, 4–15.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL.** 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20260–20264.
- Tornero P, Conejero V, Vera P.** 1996a. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 6332–6337.
- Tornero P, Conejero V, Vera P.** 1997. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *The Journal of biological chemistry* **272**, 14412–9.
- Tornero P, Mayda E, Gómez MD, Cañas L, Vicente C, Vera P.** 1996b. Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *The Plant Journal* **10**, 315–330.
- Torrico AK, Salazar SM, Kirschbaum DS and, Conci VC.** 2017. Yield losses of asymptomatic strawberry plants infected with Strawberry mild yellow edge virus. *Eur J Plant Pathol.*
- Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F.** 2008. The interplay between MAMP and SA signaling. *Plant Signal Behav.* **3**, 359–361.
- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J.** 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant cell* **4**, 645–56.
- Vasina JA, Baneyx F.** 1997. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the Escherichia coli cspA and tac promoter systems. *Protein expression and purification* **9**, 211–8.
- Voinnet O.** 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* **13**, 317–328.
- Voinnet O.** 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669–87.
- Walter S, Nicholson P, Doohan FM.** 2010. Action and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. *New Phytologist* **185**, 54–66.
- Wang X-B, Jovel J, Udornporn P, Wang Y, Wu Q, Li W-X, Gascioli V, Vaucheret H, Ding S-W.**

2011. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* **23**, 1625–38.
- Wang X-B, Wu Q, Ito T, Cillo F, Li W-X, Chen X, Yu J-L, Ding S-W.** 2010. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 484–489.
- Wen R-H, Khatabi B, Ashfield T, Maroof MAS, Hajimorad MR.** 2013. The HC-Pro and P3 Cistrons of an avirulent soybean mosaic virus are recognized by different resistance genes at the complex *Rsv1* locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 203–215.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B.** 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101–1115.
- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, et al.** 2012. Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **77**, 235–247.
- Wu X, Weigel D, Wigge PA.** 2002. Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *Genes & Development* **16**, 151–158.
- Xia Y.** 2004. Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cellular Microbiology* **6**, 905–913.
- Xiang Y, Bernardy M, Bhagwat B, Wiersma PA, DeYoung R, Bouthillier M.** 2014. The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. *Archives of Virology* **160**, 553–556.
- Xin XF, Nomura K, Aung K, Velásquez AC, Yao J, Boutrot F, Chang JH, Zipfel C, He SY.** 2016. Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature* **539**, 524–529.
- Yamanaka T, Komatani H, Meshi T, Naito S, Ishikawa M, Ohno T.** 1998. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of tobacco mosaic virus strain Cg. *Virus Genes* **16**, 173–176.
- Yang H, Gou X, He K, Xi D, Du J, Lin H, Li J.** 2010. BAK1 and BKK1 in *Arabidopsis thaliana* confer reduced susceptibility to turnip crinkle virus. *European Journal of Plant Pathology* **127**, 149–156.
- Yang Y-R, Zhu H, Fang N, Liang X, Zhong C-Q, Tang X-F, Shen P, Tang B.** 2008. Cold-adapted maturation of thermophilic WF146 protease by mimicking the propeptide binding interactions of psychrophilic subtilisin S41. *FEBS letters* **582**, 2620–6.
- Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K.** 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**, 643–650.
- Yu G, Liu JL, Xie LQ, Wang XL, Zhang SH, Pan HY.** 2012. Characterization, cloning, and heterologous expression of a subtilisin-like serine protease gene *VIPr1* from *Verticillium lecanii*. *Journal of Microbiology* **50**, 939–946.

- Zavaliev R, Ueki S, Epel BL, Citovsky V.** 2011. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 117–130.
- Zavallo D, Debat HJ, Conti G, Manacorda CA, Rodriguez MC, Asurmendi S.** 2015. Differential mRNA accumulation upon early *Arabidopsis thaliana* infection with ORMV and TMV-Cg is associated with distinct endogenous small RNAs level. *PLoS ONE* **10**, 1–24.
- Zhang C, Wu Z, Li Y, Wu J.** 2015. Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–12.
- Zhu H, Xu BL, Liang X, Yang YR, Tang XF, Tang B.** 2013. Molecular basis for auto- and hetero-catalytic maturation of a thermostable subtilase from thermophilic *Bacillus* sp. WF146. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 34826–34838.
- Zipfel C.** 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* **35**, 345–351.
- Zipfel C, Felix G.** 2005. Plants and animals: A different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 353–360.
- Zipfel C, Robatzek S.** 2010. Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi...? *Plant Physiology* **154**, 551–554.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T.** 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**, 764–767.
- Zorzatto C, MacHado JPB, Lopes KVG, et al.** 2015. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* **520**, 679–682.
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Hajirezaei M-R.** 2010. ROS signaling in the hypersensitive response. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 393–396.
- Zvereva AS, Pooggin MM.** 2012. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* **4**, 2578–2597.