PARTICIPACIÓN FUNCIONAL DE OsCPK13 Y miRNAs EN LAS RESPUESTAS AL ENTORNO EN LAS PLANTAS DE ARROZ

MARCELO ALBORNO JOVER

TESIS DOCTORAL

Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona
Doctorado en Biología y Biotecnología Vegetal

2015

PARTICIPACIÓN FUNCIONAL DE OsCPK13 Y miRNAs EN LAS RESPUESTAS AL ENTORNO EN LAS PLANTAS DE ARROZ

MARCELO ALBORNO JOVER

TESIS DOCTORAL

Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona
Doctorado en Biología y Biotecnología Vegetal

2015

TESIS DOCTORAL

PARTICIPACIÓN FUNCIONAL DE OsCPK13 Y miRNAs EN LAS RESPUESTAS AL ENTORNO EN LAS PLANTAS DE ARROZ

Memoria presentada por:

MARCELO SEBASTIÁN ALBORNO JOVER

Para optar al grado de **Doctor en Biología y Biotecnología Vegetal**
por la **Universitat Autònoma de Barcelona**

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología
Facultad de Biociencias

Trabajo realizado bajo la dirección de la **Dra. María Coca López** en el
Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG).
Financiado por una beca de post-grado de **ITAIPÚ Binacional (Paraguay)** y por el
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Paraguay).

Dra. María Coca López	**Marcelo S. Alborno Jover**	**Dra. Mercè Llugany Ollé**
Directora de la Tesis	Autor	Tutora de la Tesis

Barcelona, 2015

A mi equipo

“En la agricultura moderna no hay tiempo para que un agricultor escriba un poema o componga una canción”

Masanobu Fukuoka

Agradecimientos

Haber podido realizar este doctorado fue únicamente posible gracias al financiamiento del Gobierno de la República del Paraguay a través de las becas de post-grado de la hidroeléctrica ITAIPÚ Binacional (Paraguay-Brasil) y de las becas complementarias del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Paraguay (CONACYT).

El trabajo de tesis contó con la dirección y el apoyo incondicional de la Dra. María Coca López, quien ha confiado en mí para integrarme a su grupo de investigación y formar parte de los proyectos que tenía a su cargo. Por su predisposición permanente para guiarme en el camino de esta tesis.

Gracias principalmente a mis compañeros por la inmensa ayuda brindada en cada experimento, técnica, concepto… ustedes fueron fundamentales. Por el soporte en los momentos buenos y malos, por el hombro acogedor, por las palabras de aliento, por saber mostrarme mis errores, por ayudarme a corregirlos y por haber hecho que el proceso para llegar a este punto fuera mucho más ameno: Mire, Aarón, Cris, Mauricio, Pep, Lidi, Pat, Marcel, Rachel, Rosany, Sonia, Belén y tantos que pasaron por ahí a darme una mano y su amistad: Xiqui, Crina, Fredy, Marina, Saúl, Ares, María, Bia, Agnese, Elena, Pablito, Luis, Arnau, Lucio, Arni, Jose, María Corujo, Mariana, Briardo, Izar, Liecke, Remco, entre muchos otros.

A la Dra. Blanca San Segundo por brindarme su apoyo y ayuda en los temas tratados en esta tesis, de los que tanto conoce.

A toda la gente del CRAG: administrativos (Ma. José, Pablo, Mario), técnicos (Clara, Jordi, Maite, Maripaz[1]), los servicios de informática (Iván), genómica (Sara), proteómica, radiactividad (Sami), imágenes (Montse, Ángel), secuenciación (Mercè) e invernaderos (Pilar, Mina, Eva, Albert, Alejandro) por la fundamental e invaluable ayuda prestada en la realización de los trabajos de esta tesis.

Gracias también a la Dra. Charlotte Poschenrieder, coordinadora del doctorado, por haberme brindado su ayuda en cada proceso durante estos años.

Existe un grupo de personas sin las cuales este proyecto de vida hubiese simplemente fracasado: mi familia paraguaya en Barcelona. Fueron el motor, el combustible y la vía de escape necesaria, para que hoy pueda finalizar con éxito esta etapa. Ellos fueron absolutamente indispensables: Fabi, Diego, Marce, Andre, Valentina, Pishi, Javier, Tami, Sol, Ferrán, María, Pila, Claudia, Karen, Marcelo, Noe.

Gracias a mi familia porque este es uno de los resultados de todo lo que ellos me enseñaron: Mamá Marta, Puchi, Luchi, los abuelos Ropi y Pi'ito, Papá Miguel, Jaz, tíos, tías, primos, primas y además también a mi nueva familia: Mami, Enrique, Maga, Samu, Enri y Marce.

A los amigos que me esperan en Paraguay, a ellos que siempre están: Robert, Migue, Ever, Osvaldo, Lelis, Oscar, Juan, Ale, Laurita, Piojo, Víctor, Ruth, Walter, Rorro, Pedrito, Luigi, Pesqui, Exte y tantos etcéteras.

A todos mis maestros, incluso aquellos de los que ni siquiera recuerdo su nombre, los que dejaron huellas indelebles en la mente, el alma y el corazón. La educación es la única vía para el desarrollo y ellos lo hacen posible.

Finalmente gracias a la piedra filosofal de mi vida: Fabi. Esta tesis en realidad es suya. Es suya por transmitir su fortaleza, por su constancia, por los ánimos, por las lágrimas, por levantarme, por los retos, por la decisiva voz que me decía que podía seguir, por cambiar mis paradigmas, por darme el último empujón, el imprescindible para que esto resulte, por Olivia, la combustión infinita del amor que fue la última pieza del rompecabezas que empezamos juntos casi a la par de esta tesis. Gracias por haberme regalado el título más importante incluso antes del examen.

PARTICIPACIÓN FUNCIONAL DE OsCPK13 Y miRNAs EN LAS RESPUESTAS AL ENTORNO EN LAS PLANTAS DE ARROZ

Resumen

El arroz es uno de los cultivos más importantes del mundo, siendo el segundo cereal más producido y el alimento fundamental de casi la mitad de la población humana. Año tras año, su producción es amenazada principalmente por enfermedades como la piriculariosis, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae*, escasez de agua dulce en las áreas agrícolas debido al cambio climático que golpea con periodos de sequía extrema y la pérdida de nutrientes del suelo, como el fósforo. En este contexto, es cada vez más necesario mejorar los cultivos para hacerlos más productivos y mejor adaptados a las condiciones ambientales desfavorables. Conocer los procesos y los componentes que median la respuesta natural de la planta, así como la alteración de estos componentes puede afectar a otros procesos de adaptación al entorno y a los procesos de desarrollo de la planta, es importante para el diseño de estrategias de mejora del cultivo del arroz. En este trabajo se ha caracterizado la participación funcional de *OsCPK13* en la respuesta de defensa y la fertilización fosfatada, y de los miRNAs osa-miR390, osa-miR397a, osa-miR397b y osa-miR1319a como componentes reguladores de la respuesta de defensa de la planta de arroz, y en la adaptación de la planta a condiciones de sequía. El trabajo se ha estructurado en dos capítulos.

El capítulo I se enfoca en la proteína OsCPK13, una proteína quinasa dependiente de calcio miembro de una familia multigénica cuyos componentes participan en la red de señalización que controla muchos aspectos de la biología de las plantas, desde procesos de desarrollo hasta las respuestas a estrés. Esta proteína se ha descrito previamente como un modulador positivo de la tolerancia a sequía y a estrés. Los estudios de esta tesis demuestran que OsCPK13 media la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando un incremento en la susceptibilidad a la infección por el hongo *M. oryzae*. Además demuestran que tiene un papel positivo en la translocación de fosfatos a la parte aérea de la planta, y que su sobreacumulación deriva en una acumulación tóxica de fosfatos y serios defectos en el desarrollo vegetativo y reproductivo. Estos estudios demuestran que aunque podría ser una diana de mejora de tolerancia a sequía y salinidad, y crecimiento en condiciones deficientes de fosfato en el suelo, su acumulación debe estar finamente regulada para evitar efectos pleiotrópicos negativos.

El capítulo II se ha enfocado en la identificación y caracterización de miRNAs como reguladores de la respuesta de defensa. Mediante análisis de expresión global se han seleccionado 10 miRNAs regulados negativamente en respuesta a infección por *M. oryzae*, de los cuales se han caracterizado funcionalmente *osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b* y *osa-MIR1319a* e identificado sus dianas. Los resultados obtenidos demuestran que osa-miR390, osa-miR397b y osa-miR1319a son reguladores negativos de la resistencia a *M. oryzae*. Además se demuestra que osa-miR397a, el otro miembro de la familia de los miR397 de arroz, no participa en la respuesta de defensa frente a *M. oryzae*, y regula positivamente la tolerancia a sequía mostrando una especificidad funcional. Consistentemente, el gen *OsLAC13*, diana de los osa-miR397, que codifica una proteína lacasa, es un modulador negativo de la tolerancia a sequía. De entre todos los miRNAs estudiados, la estrategia basada en la disminución de los niveles de acumulación de osa-miR1319a parece ser la más eficaz para mejorar tanto la resistencia a la piriculariosis del arroz como la tolerancia a sequía, sin efectos aparentes en el desarrollo de la planta.

FUNCTIONAL PARTICIPATION OF OsCPK13 AND miRNAs IN RESPONSE TO THE ENVIRONMENT IN RICE PLANTS

Abstract

Rice is an important crop, the second most produced cereal and the staple food for more than a half of the world population. Year by year, its production is threaten by diseases like the "blast disease", caused by the pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*, shortage of freshwater in farming areas due to climate change that strikes with extreme dry seasons, and soil nutrient losses, like phosphorus. In this context, the crop improvement is critical, in order to achieve optimal yields under adverse environmental conditions. Elucidating the mechanisms and identifying the components that mediate natural rice defenses, as well as the interactions with plant development and the adaptation to the environment processes, are important factors to consider in the design of novel and efficient strategies for rice crop improvement. In this work, the contribution of the protein OsCPK13 as a signaling component of the rice immunity and to phosphate altered condition responses, and the participation of the miRNAs, osa-miR390, osa-miR397a, osa-miR397b and osa-miR1319a, as regulators of the rice defense and water stress responses has been characterized. This thesis is organized into two chapters.

Chapter I focuses on the OsCPK13, a isoform of the calcium dependent protein kinase family that function as signaling components in many aspects of plant biology, from developmental processes to stress responses. This protein has been previously described as a positive modulator of drought and salt stress tolerance. This thesis shows that OsCPK13 mediates the accumulation of reactive oxygen species (ROS) causing increased susceptibility to *M. oryzae* infection. Moreover, we demonstrate that OsCPK13 plays a positive role in the translocation of phosphates to the aerial part of plant, its overaccumulation leading to toxic phosphate levels in leaves, and serious defects in vegetative and reproductive development. These studies demonstrate that although OsCPK13 could be a good target for improving drought and salt tolerance, and growth in phosphate-deficient conditions, its accumulation must be tightly regulated to avoid negative pleiotropic effects.

Chapter II focuses on the identification and characterization of miRNAs as regulators of the defense response. Using global expression analysis, 10 miRNAs negatively regulated in response to *M. oryzae* infection have been selected. From these ten, *osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b* and *osa-MIR1319a* were functionally characterized and their targets identified. This thesis shows that osa-miR390, osa-miR397b and osa-miR1319a are negative regulators of *M. oryzae* resistance. Interestingly, the osa-miR397a, the other member of family of miR397, is not involved *M. oryzae* defense response but regulates drought tolerance, implying a functional specificity among members of a same miRNAs family. Consistently, the *OsLAC13* gene, the target of osa-miR397, was identified as a negative modulator of drought tolerance. Among these miRNAs, the strategy based on reducing osa-miR1319a accumulation appears promising to improve both blast resistance and drought tolerance, without affecting plant performance.

Índice

Contenido *Página*

Índice de figuras XXI
Índice de tablas XXIII
Abreviaturas XXV
Introducción 1
1. El arroz: más que un cereal 3
2. Problemática en el cultivo del arroz 8
2.1 Estrés biótico 8
2.1.1 *Dickeya dadantii* y la podredumbre blanda 9
2.1.2 *Fusarium verticillioides* y el bakanae 9
2.1.3 *Magnaporthe oryzae* y la piriculariosis 10
2.1.3.1 Características generales de *M. oryzae* 10
2.1.3.2 Ciclo infectivo de *M. oryzae* 11
2.2 Estrés abiótico 13
2.2.1 Sequía 15
2.2.2 Deficiencia de fosfatos 16
3. Adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas 16
3.1 El sistema de defensa de las plantas 17
3.1.1 Reconocimiento del agente agresor 17
3.1.2 Mecanismos moleculares implicados en la respuesta de defensa 20
3.1.2.1 Flujo de calcio a través de la membrana plasmática 20
3.1.2.2 Producción de especies reactivas de oxígeno 22
3.1.2.3 Fosforilación reversible de proteínas 23
3.1.2.4 Regulación transcripcional 24
3.1.2.5 Regulación post-transcripcional 26
3.1.2.6 Acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis 27
3.1.3 Hormonas reguladoras de las respuestas de defensa 28
3.1.3.1 Ácido salicílico 28
3.1.3.2 Ácido jasmónico y jasmonatos 29
3.1.3.3 Etileno 30
3.1.3.4 Otras hormonas reguladoras 31
3.2 Respuestas de las plantas frente al estrés hídrico 31
3.2.1 La señalización de las respuestas frente al estrés hídrico 33
3.3 Respuestas de las plantas frente a la deficiencia de fósforo 35
3.3.1 La señalización en la homeostasis de fosfatos 36
4. Proteínas quinasas dependientes de calcio 37
4.1 Características de las proteínas CPKs de plantas 38
4.2 CPKs en las respuestas de las plantas frente a estrés 40
5. MicroRNAs 41
5.1 Biogénesis y modo de acción de los miRNAs 41
5.2 MiRNAs en las respuestas de las plantas frente a estrés 43
6. Interacción de las respuestas al entorno reguladas por CPKs y miRNAs en las plantas de arroz 44
Objetivos 47

Capítulo I: Caracterización funcional de OsCPK13 en la respuesta de defensa y la fertilización fosfatada en las plantas de arroz 51
Antecedentes 53
Resultados 57
1. Caracterización de la expresión del gen *OsCPK13* 57
2. Estudio de la localización subcelular de la proteína OsCPK13 61
2.1 Obtención de vectores para la expresión de *OsCPK13* fusionado a proteínas fluorescentes 61
2.2 Localización subcelular de OsCPK13 62
3. Caracterización de las líneas transgénicas con expresión alterada del gen *OsCPK13* 65
4. Caracterización de OsCPK13 en la respuesta de defensa de la planta de arroz 68
4.1 Respuesta de *OsCPK13* a infección por *M. oryzae* 68
4.2 Fenotipo de líneas de expresión alterada de *OsCPK13* frente a infección 70
4.3 Producción de especies reactivas de oxígeno en las líneas *OsCPK13*-ox 71
4.4 Análisis de expresión de genes relacionados con defensa en las líneas *OsCPK13*-ox 76
5. Caracterización de OsCPK13 en respuesta a fertilización fosfatada 78
5.1 Respuesta de *OsCPK13* a diferentes condiciones de fertilización fosfatada 79
5.2 Fenotipo radicular de las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* 80
5.3 Caracterización fenotípica de líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* en diferentes condiciones de fertilización fosfatada 82
5.4 Acumulación de fósforo en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* 86
5.5 Expresión de genes relacionados con la homeostasis de fosfatos en las líneas *OsCPK13*-ox 87
5.6 Expresión de *OsCPK13* en líneas alteradas en la ruta de la homeostasis de fosfatos 90
Discusión 93
Capítulo II: Identificación y caracterización de miRNAs de arroz implicados en la respuesta inmune y en la respuesta a estrés hídrico 111
Antecedentes 113
Resultados 117
1. Selección de miRNAs con acumulación alterada durante la respuesta inmune de plantas de arroz 117
2. Características de los miRNAs seleccionados 120
3. Identificación de los tránscritos dianas de los miRNAs seleccionados 124
3.1 Predicción bioinformática de dianas 124
3.2 Dianas validadas y descritas en la literatura 127
3.3 Validación de dianas por análisis de degradoma 128
4. Análisis *in silico* de los promotores de los pre-miRNAs 131
5. Acumulación de los miRNAs seleccionados en respuesta a infección por *M. oryzae* 135
6. Generación de líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de los pre-miRNAs seleccionados 137
6.1 Construcción de vectores de expresión en plantas 137
6.2 Análisis del procesamiento *in vivo* de los precursores en *Nicotiana benthamiana* 139
6.3 Transformación de callos de arroz y caracterización genotípica de las líneas transgénicas obtenidas 140
6.4 Acumulación de los miRNAs en las líneas transgénicas de arroz generadas 144
7. Caracterización funcional de los miRNAs seleccionados 148
7.1 Caracterización de *osa-MIR535* 148
7.1.1 Validación de dianas de *osa-MIR535* 148
7.2 Caracterización de *osa-MIR390* en las respuestas de defensa y sequía 149

7.2.1 Validación de dianas de *osa-MIR390* ... 150
7.2.2 Respuesta de *osa-MIR390* y *OsSIK1* frente a infección por *M. oryzae* ... 150
7.2.3 Caracterización de líneas de *Arabidopsis thaliana* con acumulación diferencial de miR390 frente a infección ... 153
7.2.4 Caracterización de las líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* frente a infección ... 155
7.2.5 Caracterización de las líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* en respuesta a sequía ... 155
7.3 Caracterización de *osa-MIR397* en las respuestas de defensa y sequía ... 158
7.3.1 Validación de dianas de *osa-MIR397* ... 159
7.3.2 Respuesta de *osa-MIR397* y sus dianas frente a infección por *M. oryzae* ... 161
7.3.3 Caracterización de líneas de *Arabidopsis thaliana* con acumulación diferencial de miR397 frente a infección ... 165
7.3.4 Caracterización genotípica de líneas mutantes insercionales para *osa-MIR397a* y *OsLAC13* . 167
7.3.5 Caracterización de las líneas de acumulación diferencial de osa-miR397 y su tránscrito diana *OsLAC13* frente a infección ... 169
7.3.6 Respuesta de los *osa-MIR397* y sus dianas frente a estrés hídrico ... 171
7.3.7 Caracterización de las líneas de acumulación diferencial de osa-miR397 y su tránscrito diana *OsLAC13* frente a sequía ... 172
7.3.8 Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno en las líneas de acumulación diferencial de osa-miR397 y *OsLAC13* en respuesta a estrés hídrico ... 176
7.4 Caracterización de *osa-MIR1319a* en las respuestas de defensa y sequía ... 177
7.4.1 Validación de dianas de *osa-MIR1319a* ... 178
7.4.2 Respuesta de *osa-MIR1319a* y *OsLTPL6* frente a infección por *M. oryzae* ... 178
7.4.3 Caracterización genotípica de líneas mutantes insercionales para *osa-MIR1319a* ... 179
7.4.4 Caracterización de la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a frente a infección . 182
7.4.5 Análisis de la expresión de genes relacionados con defensa en la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a ... 184
7.4.6 Respuesta de los *osa-MIR1319a* y *OsLTPL6* frente a estrés hídrico ... 184
7.4.7 Caracterización de la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a frente a sequía ... 185
7.4.8 Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno en la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a en respuesta a estrés hídrico ... 187
Discusión ... 191
Conclusiones ... 209
Materiales y métodos ... 215
Materiales ... 217
1. Bacterias ... 217
2. Hongos ... 217
3. Material vegetal ... 217
4. Oligonucleótidos ... 219
5. Plásmidos, vectores y construcciones ... 219
6. Anticuerpos ... 219
7. Medios de cultivo ... 222
8. Soluciones y tampones ... 228
Métodos ... 232
1. Métodos generales ... 232
2. Obtención y análisis de ácidos nucleicos ... 232
2.1 Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos y análisis de recombinantes ... 232
2.1.1 Obtención de DNA plasmídico de bacterias ... 232
2.1.2 Modificación de DNA: digestión por enzimas de restricción y ligación ... 232

2.1.3 Clonación de fragmentos por recombinación homóloga mediante el sistema Gateway® 232
2.1.4 Purificación de DNA 233
2.1.5 Clonación de fragmentos de DNA por sistema T/A 233
2.1.6 Preparación de células competentes de *E. coli* 233
2.1.7 Preparación de células competentes de *A. tumefaciens* 234
2.1.8 Transformación de células competentes bacterianas 234
2.2 Extracción de DNA genómico vegetal 235
2.3 Extracción, manipulación y análisis de RNA de plantas 235
2.3.1 Extracción de RNA total de tejidos vegetales 235
2.3.2 Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida 236
2.3.3 Transferencia de RNA a un soporte inerte – *Northern blot* 237
2.3.4 Marcaje radiactivo y purificación de sondas 237
2.3.5 Hibridación de membranas de RNA 238
2.3.6 Síntesis de cDNA 238
2.4 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR 239
2.5 PCR en tiempo real cuantitativa 240
2.6 Secuenciación y análisis de DNA 242
3. Obtención y análisis de proteínas 243
3.1 Extracción de proteínas de tejidos vegetales 243
3.2 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida 243
3.3 Transferencia de proteínas a un soporte inerte – *Western blot* 244
3.4 Inmunodetección de proteínas 244
4. Crecimiento y manipulación de hongos patógenos 245
4.1 Crecimiento de *M. oryzae* 245
4.2 Crecimiento de *F. verticillioides* y *P. cucumerina* 245
4.3 Obtención de suspensiones de esporas de hongos 245
5. Crecimiento, manipulación, análisis y tratamiento de plantas 245
5.1 Esterilización superficial y germinación de semillas de arroz 245
5.2 Esterilización superficial y germinación de semillas de Arabidopsis 246
5.3 Inoculación de plantas de arroz con agentes patogénicos 246
5.3.1 Infección con *M. oryzae* 246
5.3.2 Infección con *F. verticillioides* 247
5.3.3 Inoculación con elicitores de *M. oryzae* 247
5.4 Infección de Arabidopsis con *P. cucumerina* 248
5.5 Agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* 248
5.6 Tratamiento de estrés hídrico en plantas de arroz 249
5.7 Tratamientos de fertilización fosfatada en plantas de arroz 249
5.7.1 Tratamiento en tierra 249
5.7.2 Tratamiento en hidroponía 250
5.8 Análisis histoquímico de la actividad GUS 250
5.9 Detección y análisis de la producción de ROS 250
5.9.1 Análisis histoquímico para la detección de superóxido por tinción con NBT 250
5.9.2 Detección de ROS por fluorescencia de CM-H2DCFDA 251
5.9.3 Cuantificación del contenido de H_2O_2 251
5.10 Análisis del contenido de fósforo en tejidos de plantas de arroz 252
6. Obtención de líneas transgénicas de arroz 253
6.1 Inducción de callos embriogénicos 253
6.2 Transformación de callos embriogénicos mediada por *A. tumefaciens* 255
6.3 Selección de callos transformados y regeneración de plantas transgénicas 255

7. Métodos informáticos 256
7.1 Bases de datos consultadas 256
7.2 Análisis de promotores 256
7.3 Tratamiento de secuencias y construcción de árboles filogenéticos 257
Bibliografía 259

Índice de figuras

Contenido *Página*

Figura 1. Los cereales que dominaron el mundo. *3*
Figura 2. Producción mundial de arroz y su importancia económica..... *4*
Figura 3. Población pobre en las áreas de influencia de diferentes cultivos. *5*
Figura 4. La enfermedad de la piricularíosis: síntomas y ciclo infectivo. *12*
Figura 5. Respuestas del sistema inmune de las plantas. *19*
Figura 6. Procesos implicados en la respuesta de defensa..... *21*
Figura 7. Señalización mediada por ABA en la respuesta frente a estrés hídrico. *34*
Figura 8. Señalización de la homeostasis de fosfatos en arroz. *37*
Figura 9. Proteínas quinasas dependientes de calcio de plantas. *39*
Figura 10. Biogénesis de miRNAs. *42*
Figura 11. Representación esquemática de las construcciones utilizadas en los estudios relacionados con OsCPK13..... *55*
Figura 12. Expresión del gen *OsCPK13* en diferentes estadíos y tejidos de las plantas arroz. *58*
Figura 13. Actividad del promotor de *OsCPK13* en tejidos de arroz. *60*
Figura 14. Esquema de la preparación de los vectores para la expresión en plantas de las proteínas de fusión fluorescentes OsCPK13-YFP y OsCPK13-CFP..... *63*
Figura 15. Localización subcelular de OsCPK13. ..... *64*
Figura 16. Caracterización molecular de las líneas transgénicas *OsCPK13*-Ox y *OsCPK13*-Kd..... *67*
Figura 17. Fenotipo de las plantas *OsCPK13*-Ox..... *68*
Figura 18. Acumulación de la proteína OsCPK13 en respuesta a infección por *M. oryzae*. *69*
Figura 19. Fenotipo frente a infección por *M. oryzae* de las plantas transgénicas de arroz con expresión alterada de *OsCPK13*. *72*
Figura 20. Fenotipo de las plantas transgénicas de arroz *OsCPK13*-Kd frente a infección por *F. verticillioides* y *D. dadantii*..... *73*
Figura 21. Producción de ROS en las hojas *OsCPK13*-Ox durante la respuesta de defensa a *M. oryzae* *75*
Figura 22. Expresión del gen de la peroxidasa *OsPOX22.3* en las líneas *OsCPK13*-Ox. *76*
Figura 23. Análisis de la expresión de genes relacionados con defensa en respuesta a infección por *M. oryzae* en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*..... *78*
Figura 24. Expresión de *OsCPK13* en diferentes condiciones de fertilización fosfatada..... *80*
Figura 25. Fenotipo radicular de líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*..... *82*
Figura 26. Fenotipo de líneas *OsCPK13*-Ox crecidas en diferentes condiciones de fertilización fosfatada. *84*
Figura 27. Efectos fisiológicos causados por diferentes condiciones de fertilización fosfatada en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*..... *85*
Figura 28. Acumulación de P en las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*..... *87*
Figura 29. Expresión de genes relacionados con la homeostasis de fosfato en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*..... *89*
Figura 30. Expresión de *OsCPK13* en líneas alteradas en la ruta de homeostasis de fosfatos. *91*
Figura 31. Modelo propuesto para la regulación de la homeostasis de fosfatos mediada por OsCPK13 en condiciones de suficiencia de fosfatos. *109*
Figura 32. Esquema del proceso de obtención de genotecas para la secuenciación masiva de pequeños RNAs en la plataforma Illumina Solexa®. *114*
Figura 33. Esquema de la construcción de genotecas PARE. *115*
Figura 34. Esquema experimental de la obtención de genotecas para la secuenciación masiva de pequeños RNAs y de tránscritos degradados por miRNAs en la plataforma Illumina Solexa®. *116*

Figura 35. Precursores de los miRNAs seleccionados por su respuesta frente a elicitores de *M. oryzae* *119*
Figura 36. Perfiles de expresión de los miRNAs seleccionados en respuesta a tratamiento con elicitores de *M. oryzae* en hojas de arroz. *119*
Figura 37. Localización genómica de los precursores *osa-MIR1319a, osa-MIR1847* y *osa-MIR5808*..... *122*
Figura 38. Sitio de corte de las dianas de los miRNAs seleccionados. *130*
Figura 39. Análisis de los promotores de los miRNAs seleccionados. *134*
Figura 40. Acumulación de los miRNAs en respuesta a infección por *M. oryzae* en parte aérea de plantas de arroz. *136*
Figura 41. Esquema de la preparación de los vectores para la sobreexpresión de precursores de miRNAs. *138*
Figura 42 Procesamiento *in vivo* de los precursores de los miRNAs seleccionados. *142*
Figura 43. Análisis de la inserción del T-DNA en las líneas de arroz regeneradas a partir de la transformación con los vectores de sobreexpresión de los precursores de los miRNAs seleccionados. *143*
Figura 44. Análisis de la acumulación de los miRNAs en las líneas de arroz transgénicas. *145*
Figura 45. Análisis de acumulación de los tránscritos predichos como dianas para osa-miR535-5p en las líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR535*. *149*
Figura 46. Análisis de acumulación de los tránscritos predichos como dianas para osa-miR390-5p en las líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR390*. *151*
Figura 47. Acumulación de osa-miR390-5p y de tránscritos de su diana *OsSIK1* en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. *152*
Figura 48. Caracterización de las líneas MIM-miR390 de *A. thaliana* en respuesta a infección por *P. cucumerina*. *154*
Figura 49. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* en respuesta a infección por *M. oryzae*. *156*
Figura 50. Acumulación de osa-miR390-5p en plantas de arroz en respuesta a estrés hídrico. *157*
Figura 51. Fenotipo de las líneas *osa-MIR390*-Ox en respuesta a sequía. *158*
Figura 52. Análisis de las lacasas de arroz. *160*
Figura 53. Análisis de acumulación de los tránscritos *OsLAC26* y *OsLAC12/13* en las líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR397a* y *osa-MIR397b*. *162*
Figura 54. Acumulación de osa-miR397b en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. *162*
Figura 55. Acumulación de los osa-miR397 y sus tránscritos dianas en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. *164*
Figura 56. Caracterización de las líneas MIM-miR397 de *A. thaliana* en respuesta a infección por *P. cucumerina*. *166*
Figura 57. Análisis genotípico de las líneas de arroz mutantes insercionales del TRIM para *osa-MIR397a* y *OsLAC13*. *168*
Figura 58. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *osa-MIR397b* en respuesta a infección por *M. oryzae*. *170*
Figura 59. Fenotipo de líneas mutantes en *OsLAC13* y de activación de *osa-MIR397a* en respuesta a infección por *M. oryzae*. *172*
Figura 60. Acumulación de osa-miR397 y los tránscritos de sus dianas *OsLAC26* y *OsLAC12/13* en respuesta a estrés hídrico. *173*
Figura 61. Fenotipo de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd en respuesta a sequía. *174*
Figura 62. Tolerancia a sequía de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd. *174*
Figura 63. Producción de peróxido de hidrógeno en las líneas *osa-miR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd en condiciones de estrés hídrico. *177*

Figura 64. Acumulación del tránscrito *OsLTPL6* en las líneas transgénicas de sobreexpresión de *osa-MIR1319a*.....178
Figura 65. Acumulación de osa-miR1319a y de tránscritos de su diana *OsLTPL6* en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. 180
Figura 66. Análisis genotípico de las líneas de arroz mutantes insercionales del TRIM para *osa-MIR1319a*.....181
Figura 67. Fenotipo de líneas mutantes *osa-MIR1319a*-Kd en respuesta a infección por *M. oryzae*.....183
Figura 68. Expresión de genes de defensa en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd. 185
Figura 69. Acumulación de osa-miR1319a y del tránscrito *OsLTPL6* en respuesta a estrés hídrico..... 186
Figura 70. Fenotipo de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd en respuesta a sequía.....187
Figura 71. Tolerancia a sequía de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd. 188
Figura 72. Producción de peróxido de hidrógeno en la línea *osa-MIR1319a*-Kd en condiciones de estrés hídrico..... 189
Figura 73. Protocolo de la reacción de *stemloop* RT. 240
Figura 74. Condiciones generales para amplificación de fragmentos de DNA por PCR.....241
Figura 75. Protocolo de amplificación de fragmentos de cDNA por qPCR utilizando SybrGreen® de Roche™.....241
Figura 76. Validación de la técnica *stemloop* qRT-PCR mediante análisis *Northern blot*. 242
Figura 77. Esquema del proceso de transformación de arroz a partir de callos embriogénicos via *A. tumefaciens*. 254

Índice de tablas

Contenido *Página*

Tabla 1. Efectos de las condiciones ambientales en la producción de cereales.....14
Tabla 2. Clasificación de las proteínas PR. 28
Tabla 3. Expresión diferencial de genes *OsCPK* en respuesta a elicitores de *M. oryzae*.....53
Tabla 4. Selección de miRNAs reprimidos en respuesta al tratamiento con elicitores de *M. oryzae*.118
Tabla 5. Características generales de los miRNAs seleccionados. 121
Tabla 6. Conservación en diferentes especies de los miRNAs seleccionados.....123
Tabla 7. Predicción bioinformática de dianas de los miRNAs seleccionados. 124
Tabla 8. Revisión de dianas descritas para los miRNAs seleccionados. 128
Tabla 9. Tránscritos degradados por los miRNAs seleccionados en hojas de arroz en respuesta a elicitores de *M. oryzae*. 129
Tabla 10. Resumen de las dianas de los miRNAs seleccionados identificados *in silico*, descritas en la literatura y en el análisis de la secuenciación del degradoma.....130
Tabla 11. Elementos reguladores en los promotores de los miRNAs seleccionados.....133
Tabla 12. Resumen del análisis genotípico y de fertilidad de los eventos de transformación de arroz. 143
Tabla 13. Resumen de los niveles de acumulación de los miRNAs y la producción de semillas de las líneas transgénicas de arroz. 147
Tabla 14. Cebadores relacionados con clonaciones y genotipados.....219
Tabla 15. Sondas y cebadores de *stemloop*-RT..... 220
Tabla 16. Cebadores para qRT-PCR. 220
Tabla 17. Plásmidos, vectores y construcciones.....221

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento de respuesta a ABA
Ac	Activación
amiRNA	miRNA artificial
APX	Ascorbato peroxidasa
BAK	Quinasa asociada a BRI
bHLH	hélice-bucle-hélice básica
BR	Brasinosteroides
BRI	Insensible a brasinosteroides
bZIP	Cremallera de leucina básica
CAD	Dominio de activación de CPK
CAT	Catalasa
CaM	Calmodulina
CaMK	Quinasa dependiente de calmodulina
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CBL	Calcineurin B
CCaMK	Quinasa dependiente de calcio y calmodulina
cDNA	DNA copia o complementario
CFP	Proteína fluorescente cian
CFU	Unidades formadoras de colonia
CIPK	Proteína quinasa interactora con CBL
CML	Similar a calmodulinas
CPK/CDPK	Proteína quinasa dependiente de calcio
CRK	Proteína quinasa relacionada con CPKs
Ctrl	Control
cv	cultivar
DCL	Proteínas del tipo tijera
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DREB	Elemento de unión en respuesta a deshidratación
EREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a etileno
ERF	Factor de respuesta a etileno
esp	esporas
ET	Etileno
ETI	Inmunidad activada por efectores
ETS	Susceptibilidad activada por efectores
Ev	*Empty vector*-Vector vacío
FT	Factor de transcripción
GA	Ácido giberélico
GFP	Proteína fluorescente verde
GPX	Glutatión peroxidasa
GST	Glutatión-S-transferasa
GUS	β-glucuronidasa
IPS/PSI	Inducible por deficiencia de fosfatos
hpi	horas post infección
HR	Respuesta hipersensible
IRRI	Instituto Internacional de Investigación del Arroz
JA	Ácido jasmónico y jasmonatos
JIN	Insensible a jasmonatos
Kd	*Knock-down*
LB	Borde izquierdo
LRR	Repetición rica en leucinas
LTP	Proteína de transferencia de lípidos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
Mb	Megabases

miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NH1	Homólogo de NPR1
Nos	Nopalina sintasa
NO	Óxido nítrico
NPR1	No expresor de proteínas PR
O_2^-	Ion superóxido
O_2^{-2}	Ion peróxido
OH^-	Radical hidroxilo
Ox	*Over-expressor* (sobreexpresor)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PAL	Fenil-alanin liasa
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAP	Fosfatasa ácida púrpura
Pi	Fósforo inorgánico
POX	Peroxidasa
PR	Proteína relacionada con patogénesis
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	miRNA primario
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PP2C	Fosfatasa 2C
PT	Transportador de fosfatos
PTI	Inmunidad activada por PAMPs
qRT-PCR	PCR en tiempo real cuantitativa
R	Resistente
RB	Borde derecho
RBOH	Homólogos de oxidasas de la respiración
RdR6	RNA polimerasa dependiente de RNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RLK/RPK	Quinasas similares a receptores
RLP	Proteínas similares a receptores
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	PCR de retrotranscripción
S	Sensible
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
SIK	Quinasa inducida por estrés
SOD	Superóxido dismutasa
SQD	Sulfoquinovosil transferasa
sRNA	pequeño RNA
siRNA	sRNA de interferencia
T-DNA	DNA de transferencia
TRIM	Mutantes insercionales de arroz de Taiwán
Ubi	Ubiquitina
UTR	Región no traducida
var	variedad
WAK	Quinasa asociada a la pared celular
Wt	*Wild type*-Especie silvestre
YFP	Proteína fluorescente amarilla

Introducción

1. El arroz: más que un cereal

Hace unos 7.000 años, grupos de personas alrededor de la tierra empezaron a abandonar el estilo de vida nómada que había sido exitoso y universal durante milenios para empezar a acumular y luego a cultivar e instalarse alrededor de parcelas de cereales y pasturas para animales domesticados. Estos fueron los primeros eventos que alteraron para siempre la historia de la alimentación humana. La agricultura lo cambió todo y es el hábito humano que hizo posible el crecimiento linear de la población que perdura hasta estos tiempos. De no haberse domesticado la producción de alimentos, actualmente hubiésemos sido tan sólo unas pocas decenas de millones de personas en todo el mundo. El nacimiento y el desarrollo inicial de la agricultura se constituyeron en la primera revolución y evolución de la ciencia y la tecnología en la búsqueda de mejores condiciones de vida y alimento.

En un momento de la historia de la humanidad, hace unos 5 milenios, el trigo (*Triticum aestivum*) era el cereal que conquistaba el oriente próximo, mientras que en el extremo oriente, otra de las cunas de la civilización, se cultivaba el arroz (*Oryza sativa*), y en América el maíz (*Zea mays*). De este modo se establecía un eje de producción de cereales que dominaba el mundo (Figura 1).

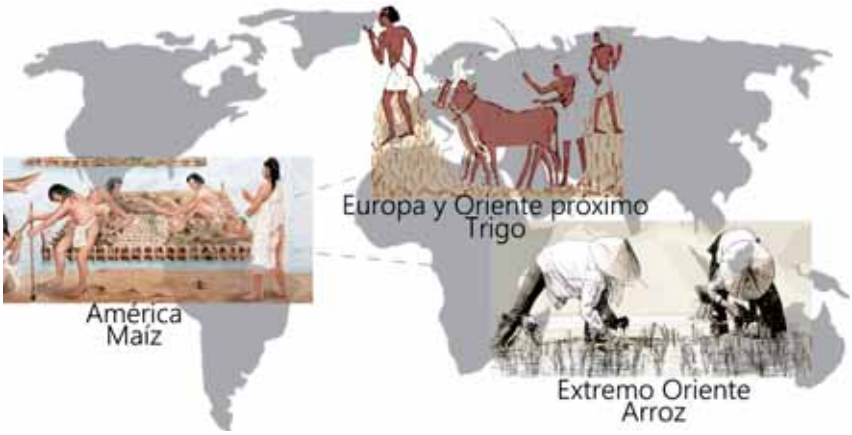

Figura 1. Los cereales que dominaron el mundo. Establecimiento de un eje productivo de cereales que alimentaba a la población mundial hace 5000 años, con tres cultivos cereales básicos en el planeta: maíz, trigo y arroz.

A partir de ese punto inflexivo de la historia de la agricultura y hasta nuestros días, los cereales son la fuente de alimentación humana más importante, proveyendo aproximadamente la mitad de las calorías que toda la humanidad necesita para su mantenimiento. Entre los cereales, el maíz es actualmente el de mayor producción a nivel mundial con más de 1000 Mt, seguido por el arroz, del cual se han producido aproximadamente 750 Mt en el año 2013 (Figura 2A).

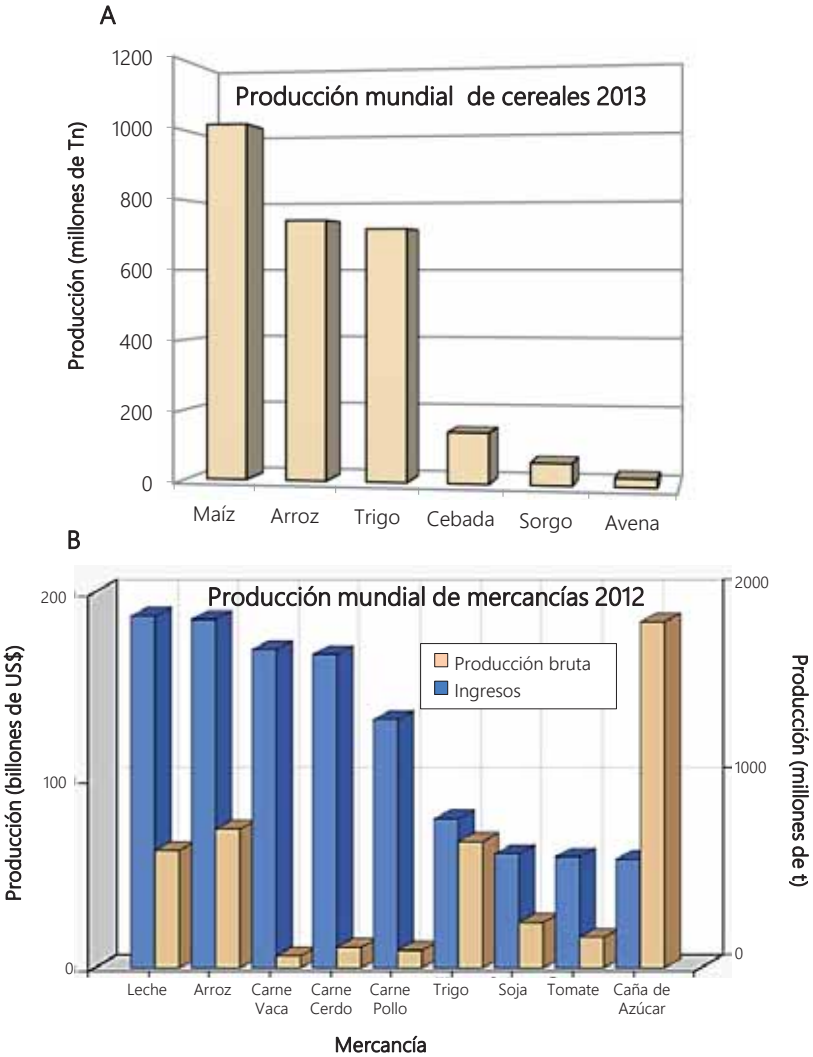

Figura 2. Producción mundial de arroz y su importancia económica. A. Posicionamiento de la producción del cultivo de arroz frente a otros cereales en el año 2013. **B.** Posicionamiento de la producción de arroz y su valor económico frente a otras mercancías de comercio agropecuario. Fuente: FAOSTAT (FAO, 2014/2015).

El arroz se cultiva en más de 100 países del mundo y abarca desde los 40ºS hasta los 53ºN de latitud, con un incremento de aproximadamente el 2,3% anual en la producción mundial, siendo los asiáticos China (203 Mt), India (159 Mt), Indonesia (71 Mt), Bangladesh (51 Mt) y Vietnam (44 Mt) los mayores productores y abarcando el 90% del total al año 2013 (FAOSTAT, 2015). Fuera del continente asiático, Brasil es el de mayor producción con apenas unos 11 Mt, lo que demuestra el contraste entre Asia y el resto del mundo. En toda Europa se producen actualmente unos 3 Mt, siendo los mediterráneos Italia y España los principales productores con más de la mitad del total continental, cultivándose también en Francia, Grecia y Portugal. El arroz ocupa además el segundo lugar tanto en producción bruta como en ingresos, entre todas las mercancías de comercio agropecuario a nivel mundial (Figura 2B), constituyéndose en una importante fuente de ingresos para los países productores. Estos ingresos, sin embargo, no parecen tener influencia en las más de 500 millones de personas que viven en la zona de influencia del cultivo del arroz en gran parte de Asia, una cantidad abrumadora de pobres de los cuales el arroz es el alimento fundamental de su dieta (Figura 3).

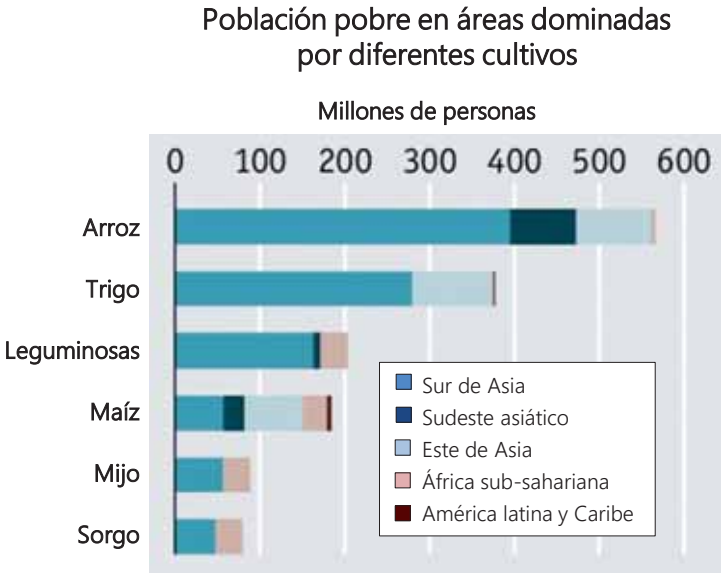

Figura 3. Población pobre en las áreas de influencia de diferentes cultivos. Se indica la cantidad de personas que vivían en condición de pobreza, correspondiente a un ingreso de menos de 1,25 US$/día, en el año 2005. Fuente: IRRI en «*A bigger rice bowl*», de *The Economist*.

El arroz (*O. sativa* spp.) es una angiosperma monocotiledónea, forma parte de la familia de las gramíneas (Poaceae) y ha evolucionado a partir de una hierba que se ha diferenciado y adaptado para sobrevivir en las regiones húmedas de un continente ancestral llamado Gondwana, hace más 130 millones de años. La separación tectónica de ese continente dio forma a los continentes que hoy se conocen como Asia y África, viéndose así también separada la evolución del arroz africano (*O. glaberrima*) y del arroz común o asiático (*O. sativa*) (Smith & Dilday, 2003). *Oryza sativa* es una especie con 12 pares de cromosomas, diploide (2n=2x=24), posee un genoma pequeño, de aproximadamente 390 Mb, unos 40.000 genes codificantes para proteínas, más del 50% de secuencias repetitivas y 35% de transposones. Según lo que se conoce hasta hoy, tiene uno de los genomas más pequeños entre los cultivos para alimentos, en comparación, por ejemplo, con los genomas de otros cereales como *T aestivum* (15.000 Mb), *Z. mays* (2.300 Mb) y *S. bicolor* (730 Mb) (Ambrose & Purugganan, 2013; Zhang & Wing, 2013). Existe un alto grado de colinearidad y sintenia entre el genoma del arroz y los genomas de otros cereales.

El crecimiento de la planta de arroz está dividido en varias etapas de desarrollo basado en caracteres morfológicos y fisiológicos que determinan principalmente los estados de: germinación, macollado, elongación del tallo, formación de hoja bandera, emergencia de panículas, floración y maduración (Moldenhauer & Gibbons, 2003). Su morfología es similar a la de otras gramíneas, como los cereales y pasturas, cuyo tallo está formado por unidades de brotes que constan de nodos e internodos. Sus hojas son láminas unidas al tallo por una vaina basal enrollada en un cilindro que envuelve las hojas de nueva formación. Posee raíces son fibrosas y cubiertas de pelos radiculares, con una raíz principal y varias raíces secundarias que ayudan al soporte de la planta y al aumento del área de búsqueda de nutrientes (Smith & Dilday, 2003). La planta del arroz puede crecer bajo diferentes condiciones ambientales y prueba de ello es la enorme dispersión de su cultivo a lo largo y ancho del planeta. Sin embargo, está mejor

adaptada a los climas cálidos y húmedos, cultivadas preferentemente en parcelas con suplemento permanente de agua o levemente inundadas, condiciones que mejoran la producción, a pesar de que también se cultiva en climas extremos como zonas secas o con inundaciones severas, características que hacen del arroz un cultivo muy adaptable.

El arroz asiático es el más cultivado a nivel mundial, y es una especie que se divide en tres subespecies: *O. sativa japonica*, *O. sativa javanica* y *O. sativa indica*. La subespecie *indica* posee granos largos y finos, es propia de regiones tropicales y subtropicales de India y Tailandia y sensible a bajas temperaturas, mientras que la subespecie *javanica* también tiene granos largos, pero gruesos y aristados, cultivándose principalmente en las islas tropicales de Indonesia. La subespecie *japonica* se caracteriza por tener granos redondos, siendo cultivada principalmente en regiones templadas y subtropicales, especialmente en Japón y China, y tiene bastante tolerancia a bajas temperaturas. Esta es además la subespecie más cultivada de Europa y en España, donde actualmente es mayoritaria la variedad Gleba. La variedad japonesa Nipponbare fue la primera en contar con el genoma secuenciado y con esta se ha realizado una parte de los trabajos de esta tesis, además de la variedad taiwanesa Tainung67, ambas de la subespecie *japonica*.

Además de su tremenda importancia económica y agrícola a nivel mundial, el arroz es considerado como una planta modelo para investigación de genómica funcional en monocotiledóneas, siendo la segunda especie vegetal que fue secuenciada. El manejo y la manipulación de las plantas de arroz son relativamente sencillos y actualmente se cuenta con una vasta información disponible. A esto se puede agregar además un enorme banco de germoplasma disponible en el IRRI (*International Rice Research Institute*); colecciones de mutantes como los del TRIM (*Taiwan Rice Insertional Mutants*), los del *Transposon Insertion Mutant Database*, también del RMD (*Rice Mutant Database*), del *Rice Tos17 Insertion Mutant Database*, entre otros; recursos de cDNA como los clones de las bases del KOME (*Knowledge-based Oryza Molecular Biological*

Enciclopedia); varias bases de datos de *microarrays* y otras herramientas bioinformáticas disponibles para análisis de expresión de genes; y protocolos de transformación altamente eficientes (Hiei *et al.*, 1994).

Dada su importancia económica y social, y la facilidad de manejo como sistema de estudio, esta tesis utiliza la planta de arroz para investigar los mecanismos moleculares y componentes que regulan su adaptación al ambiente.

2. Problemática en el cultivo del arroz

A pesar de ser una planta particularmente adaptable a las condiciones del ambiente, las plantas de arroz sufren de una diversidad de problemas en su cultivo, que abarcan estreses abióticos como la salinidad de los suelos, temperaturas extremas, problemas nutricionales e hídricos; además de estreses bióticos causados por insectos plagas y enfermedades principalmente fúngicas y bacterianas. En términos biológicos, el estrés implica una desviación de las condiciones normales de la fisiología y desarrollo que pueden causar daños severos a la planta y en la producción de semillas (Pareek *et al.*, 2010). Las situaciones adversas que más afectan al cultivo de arroz y que conllevan importantes pérdidas en las cosechas se detallan a continuación.

2.1 Estrés biótico

Este tipo de estrés es aquel que ocurre como consecuencia del daño causado en la planta por otros organismos vivos como virus, bacterias, hongos, parásitos, insectos y plantas. Entre estos organismos, las enfermedades causadas por hongos y bacterias son las más importantes en el arroz, ya que se estima que las pérdidas en la producción de arroz ocasionadas por enfermedades son entre un 20 y un 40%. El agente patógeno principal del arroz es *Magnaporthe oryzae*, causante de la enfermedad de la piriculariosis. Son también importantes y de gran incidencia las enfermedades causadas por los hongos *Rhizoctonia solani*, que causa el añublo de la vaina del arroz o "*sheath*

blight"; *Fusarium verticillioides*, conocida como "bakanae" o "*foolish seedling*" y *Helminthosporium oryzae*, causante de la helmintosporiosis o "*brown spot*". Las enfermedades causadas por bacterias son muy importantes en las zonas de arroz irrigado, como la bacteriosis vascular del arroz (*rice bacterial blight*), causada por *Xanthomonas oryzae*, la podredumbre blanda o marchitamiento (*soft rot*, *wilt disease*), que tiene como agente causal a *Dickeya dadantii* y el añublo bacterial de la panícula, causado por *Burkholderia glumae* (De Datta, 1981; Goto, 1979; Ham *et al.*, 2011; Mansfield *et al.*, 2012).

2.1.1 *Dickeya dadantii* y la podredumbre blanda

La enfermedad de la podredumbre blanda en arroz, causada por *D. dadantii* (anteriormente *Erwinia chrysantemi*), fue notada inicialmente en Japón causando amarillamiento de las hojas y un color negruzco y decaimiento de los macollos. Esta bacteria se encuentra en los suelos y comienza la infección a través de la base del tallo, provocando la podredumbre del pie de la planta, invadiendo después toda la planta, provocando su muerte y causando pérdidas importantes (Goto, 1979; Mansfield *et al.*, 2012).

2.1.2 *Fusarium verticillioides* y el bakanae

F. verticillioides es un hongo ascomiceto filamentoso cuyo ataque en plantas de arroz causa la enfermedad del "bakanae", pero que también puede ser causada por otras especies como *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* (Wulff *et al.*, 2010). Este hongo está presente en los suelos y normalmente comienza la infección sistemática de la planta a través de las raíces. Las semillas también son comúnmente atacadas, muchas veces impidiendo su germinación o afectando la plántula recién emergida provocando una elongación anormal, causada por las giberelinas (hormonas vegetales de crecimiento) producidas por el hongo, coloración verde pálida y tallos delgados. En los casos en los que la planta logra sobrepasar el estadio de plántula, las plantas llegan prematuramente

al estadio de macollado (De Datta, 1981). La importancia del bakanae radica en que la mayoría de las plantas afectadas mueren antes de producir panículas, causando grandes pérdidas en el cultivo.

2.1.3 *Magnaporthe oryzae* y la piriculariosis

El principal problema biótico con el que se enfrenta el arroz a nivel mundial es la piriculariosis, una de las enfermedades más devastadoras en su cultivo. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1637 en China y se la llamó "enfermedad de la fiebre del arroz". En los últimos años se ha verificado una serie de epidemias de piriculariosis, causante de multimillonarias pérdidas en los grandes productores de arroz como China, Corea, Japón y Vietnam, haciendo de *M. oryzae* un enemigo de la seguridad alimentaria mundial (Wilson & Talbot, 2009).

2.1.3.1 Características generales de *M. oryzae*

Magnaporthe oryzae (Couch) es un hongo ascomiceto filamentoso en su forma telomorfa, especie previamente conocida como *Magnaporthe grisea* (Hebert) pero que fue diferenciada como una nueva especie, separándola de esta última por análisis filogenéticos y rango de huéspedes. Mientras la rama filogenética *M. oryzae* puede infectar arroz, mijo (*Eleusine* spp.) y especies herbáceas de los géneros *Setaria*, *Lolium* y *Eragostis*, la rama *M. grisea* sólo es capaz de infectar únicamente especies del género *Digitaria* (Couch & Kohn, 2002). El estado anamorfo de *M. oryzae* es la especie *Pyricularia oryzae* (Cooke), cuyo género dio nombre a la enfermedad derivada en arroz.

En las últimas décadas, *M. oryzae* se ha convertido además en un organismo modelo para el estudio y la investigación de enfermedades en plantas causadas por hongos, principalmente por su importancia económica pero también por la facilidad en su manipulación experimental y que comparte características asociadas a otros patógenos de cereales, como la formación de apresorios y la invasión intercelular

(Wilson & Talbot, 2009). Hace 10 años que se dispone de su genoma completo (Dean *et al.*, 2005), contándose además con bases de datos de mutantes y protocolos de transformación y mutagénesis eficientes.

El patógeno *M. oryzae* ataca todos los estados de desarrollo de la planta de arroz, infectando principalmente las hojas de la planta de arroz, aunque también se ha visto que puede infectar tallos, nudos, panículas e incluso raíces (Campos-Soriano & San Segundo, 2009; Dufresne & Osbourn, 2001; Sesma & Osbourn, 2004; Wilson & Talbot, 2009). La infección en panículas no es la más frecuente pero es, sin embargo, la más devastadora, afectando directamente los órganos reproductivos de la planta, causando la pérdida total de la producción de granos (Wilson & Talbot, 2009). Los síntomas característicos de esta enfermedad se muestran en las Figura 4A-B.

2.1.3.2 Ciclo infectivo de *M. oryzae*

El ciclo infectivo de *M. oryzae* en arroz fue estudiado principalmente en hojas, por ser el más frecuente, y se presenta en el esquema de la Figura 4C. La infección por *M. oryzae* se inicia cuando un conidio tricelular, se adhiere a la superficie cuticular hidrofóbica del tejido foliar mediante un adhesivo mucilaginoso secretado por el compartimento apical de la espora durante la hidratación (Wilson & Talbot, 2009). Desde el mismo extremo apical se desarrolla un tubo germinativo que crece sobre la superficie hasta diferenciarse en una estructura especializada y determinante para la penetración del tejido: el apresorio, que se forma en respuesta a la superficie hidrofóbica de la hoja (Ebbole, 2007; Khang *et al.*, 2010; Rebollar & López-García, 2013; Wilson & Talbot, 2009). El apresorio posee una pared celular rica en quitina, con una capa de melanina entre la pared y la membrana celular, esencial para la turgencia de la estructura y que actúa también como barrera del flujo de solutos. Esa turgencia genera una fuerza mecánica que empuja a la punta de penetración, recién formada en la base del apresorio, hacia dentro de la hoja. Luego de la penetración, las hifas se ramifican a

través del tejido foliar, resultando en la invasión y posteriormente en la enfermedad (Wilson & Talbot, 2009).

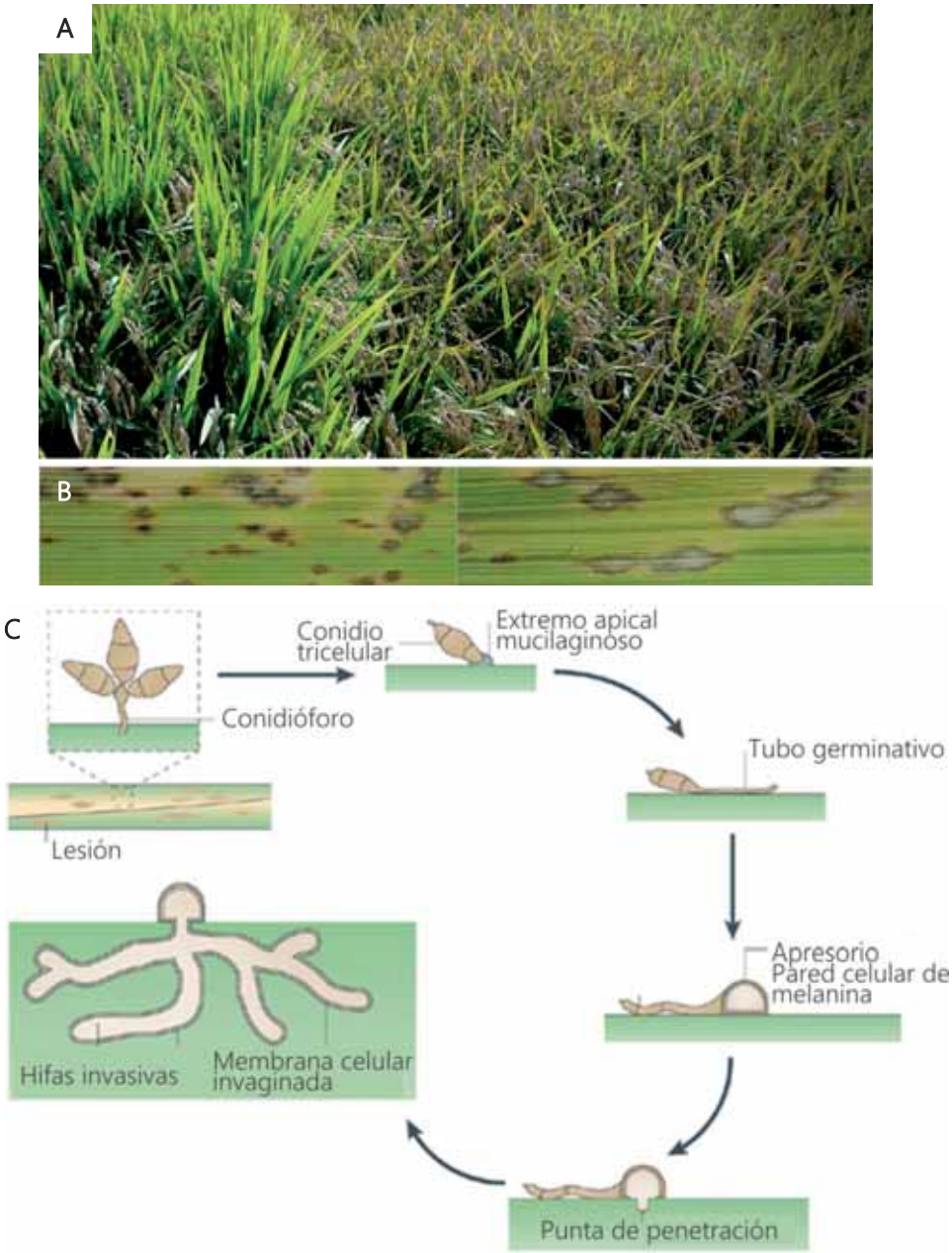

Figura 4. La enfermedad de la piriculariosis: síntomas y ciclo infectivo. A. Aspecto del campo de cultivo de arroz atacado por el hongo *Magnaporthe oryzae*, causante de la enfermedad de la piriculariosis. (Imagen tomada de: *International rice blast conference* - http://irbc2013.riceblast.snu.ac.kr/) **B.** Observación microscópica de las lesiones típicas causadas por *M. oryzae* en las hojas de arroz infectadas. **C.** Ciclo infectivo de *M. oryzae* en tejidos foliares de arroz. Adaptado de Wilson & Talbot (2009).

Este hongo es considerado como un hemibiótrofo muy efectivo. Presenta un crecimiento inicial biotrófico, en el cual las hifas colonizan los tejidos vivos de la planta y crecen dentro de las células rodeadas de la membrana plasmática invaginada. En este estado el hongo desvía los nutrientes de las células vivas del huésped mediante las hifas bulbosas invasivas, estructuras especializadas para ese propósito, y que son análogas a los haustorios presentes en los hongos biótrofos. La invasión se da por medio de los plasmodesmos, a través de los cuales las hifas del hongo se hacen camino para la colonización de las células adyacentes (Kankanala *et al.*, 2007; Wilson & Talbot, 2009). Una vez invadida la nueva célula, la célula inicial pierde viabilidad y esto define a la estrategia de *M. oryzae* como hemibiótrofa y secuencial, ya que en cada nueva célula invadida se repite el proceso biotrófico (Kankanala *et al.*, 2007). En las células inviables el hongo pasa a un estado necrotrófico, causando muerte celular en los tejidos infectados del huésped. El estado necrótrofo es cuando comienzan a notarse los síntomas típicos, en forma de pequeñas lesiones necróticas romboidales. En estas lesiones ocurre la esporulación en condiciones de alta humedad, que se traduce en un crecimiento grisáceo del hongo, y las esporas son dispersadas generalmente por el agua de lluvia o el viento en el campo de cultivo (Wilson & Talbot, 2009).

Al igual que todos los seres vivos, las plantas se encuentran expuestas al ataque de organismos patógenos, como *M. oryzae* lo es para el arroz, ante los cuales deben defenderse y adaptarse, para lo cual han desarrollado un complejo sistema para su defensa.

2.2 Estrés abiótico

Se entiende como estrés abiótico a aquella alteración en el entorno que tiene un efecto negativo sobre las plantas, que está causado por factores no vivos y que ocurren naturalmente en un campo de cultivo (Pareek *et al.*, 2010). Entre estos factores se pueden considerar: intensidad de la luz solar, radiaciones, vientos fuertes, temperaturas extremas, sequías, inundaciones, textura y cambios en el pH del suelo, baja

disponibilidad o exceso de nutrientes y otros compuestos en el suelo. Estos factores muchas veces son inevitables en un ambiente natural y tienen una incidencia muy fuerte en el crecimiento de las plantas, las cuales por su naturaleza sésil son incapaces de evitar los efectos de las fluctuaciones ambientales. Por consiguiente, las plantas dependen principalmente de mecanismos internos para adaptarse y tolerar estos cambios (Slater *et al.*, 2008).

A menudo, muchos factores abióticos influyen simultáneamente sobre un cultivo y pueden llegar a causar grandes pérdidas en las cosechas. El impacto del estrés abiótico en la producción agrícola se puede cuantificar según el potencial productivo que tiene un cultivo y la producción media a nivel mundial. Se estima que alrededor del 70% de las pérdidas en la producción agrícola en el mundo son causadas por estreses abióticos (Bray *et al.*, 2000). En la Tabla 1 se muestran las pérdidas ocasionadas debido a las condiciones ambientales inadecuadas para los cereales más importantes en el mundo, observándose que en el arroz existen pérdidas de más del 50%, lo que implica que millones de personas en el mundo dejan de acceder a este alimento debido al estrés abiótico en el campo. Entre los factores abióticos que más influyen en la producción se encuentran la sequía y el estrés nutricional, que incluye la baja disponibilidad de fosfatos en los suelos a nivel mundial, que son los que se estudiaron en esta tesis.

Tabla 1. Efectos de las condiciones ambientales en la producción de cereales. Se indican los cereales más importantes (a) y el promedio de rendimiento a nivel mundial en el año 2013 (b) en comparación con el país que ha obtenido el mejor promedio de rendimiento en el mismo año (c) y el cálculo del porcentaje del promedio potencial perdido debido, principalmente, a su cultivo en condiciones ambientales inadecuadas (d). Fuente: FAOSTAT, 2015.

Cultivo [a]	Rendimiento mundial [b]	Mejor rendimiento [c]	Potencial perdido [d]
Maíz	5.499,701	24.857,143 (San Vicente)	77,9%
Arroz	4.485,875	10.217,665 (Australia)	56,1%
Trigo	3.268,295	9.105,327 (Nueva Zelanda)	64,1%
Cebada	2.929,079	8.325,180 (Bélgica)	64,8%
Sorgo	1.475,243	84.375,000 (Emitatos Árabes)	98,3%
Avena	2.441,844	7.228,464 (Irlanda)	66,2%

2.2.1 Sequía

En el sentido estricto, el estado de estrés abiótico en una planta es relativo a su fisiología, por lo que una condición de estrés para una especie podría ser óptima para otra. Un ejemplo claro es el arroz, que es una planta semiacuática, cuyo cultivo se da mejor en parcelas inundadas, condiciones que no son propicias para el crecimiento de otras especies, sin embargo, esto también significa un problema para el arroz debido a que exige grandes cantidades de agua para su cultivo. Un suministro adecuado de agua es uno de los factores más importantes en la producción del arroz. Existen zonas de Asia tropical en las que el arroz sufre tanto de deficiencia como de exceso de agua, debido a las lluvias irregulares y las diferencias en la geografía del terreno (De Datta, 1981).

La diferencia entre la entrada y la salida del agua en la planta se conoce como el balance hídrico. Cuando este balance es negativo debido a que la pérdida de agua por transpiración supera a la absorción por las raíces, la planta ingresa en un estado de déficit hídrico ocasionando marchitez de la planta, que puede ser temporal o permanente. Para que el déficit hídrico no ocasione la muerte de la planta, la humedad de los suelos no debe disminuir del punto de marchitez permanente (PMP). Cuando los suelos se encuentran en capacidad hídrica de campo, las plantas crecen con turgencia y mantienen un balance hídrico por encima del déficit, pero en el PMP las plantas ya no extraen agua del suelo y no pueden recuperarse de la pérdida hídrica, provocando la situación extrema de la muerte de la planta. Sin embargo, pequeños cambios en el balance hídrico de la planta también pueden tener efectos severos como: deficiencias en el desarrollo, cambios en la arquitectura radicular y serios defectos en la fertilidad, influyendo directamente en la producción (De Datta, 1981; Pareek *et al.*, 2010). Particularmente, el arroz es especialmente susceptible a la falta de agua durante la etapa reproductiva, retrasando la floración, reduciendo la fertilidad del polen y afectando al llenado del grano, lo que conlleva consecuencias graves en la productividad del cultivo (De Datta, 1981).

2.2.2 Deficiencia de fosfatos

La deficiencia de este elemento es de las más limitantes en la producción de los cultivos. Este mineral es asimilable por las plantas en forma de fosfato como radical libre (PO_4^{-3}). Sin embargo, el problema de la acidificación de los suelos provoca que se encuentre retenido en forma de sales insolubles de aluminio, hierro y calcio, no asimilables por las plantas e incluso pudiendo ser tóxicas, por lo que la disponibilidad de fósforo asimilable en los suelos es limitada (Pareek *et al.*, 2010). Actualmente, existe una gran preocupación por la pérdida de fertilidad de los suelos del mundo y la creciente necesidad de fertilización para obtener una buena producción, implicando un mayor costo para la agricultura. Además, la fuente de fósforo es finita y no renovable, siendo cada vez más costosa su extracción (Cordell *et al.*, 2009), por lo que la búsqueda de variedades más productivas en suelos deficientes en fosfato o estrategias alternativas que favorezcan la asimilación de fosfato por la planta, son cada vez más necesarias.

3. Adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas

Considerando la demanda actual y el incremento previsto de la población mundial, será necesario aumentar la producción del cultivo del arroz para garantizar la seguridad alimentaria. Tomando en cuenta la limitación de agua y de tierra cultivable, la escasez de fertilizantes y la necesidad de evitar el uso de pesticidas y fungicidas tóxicos, se hace necesario el desarrollo de estrategias de producción de mejor rendimiento en condiciones adversas y menos agresivas con el medio ambiente. El estudio de los procesos de adaptación de las plantas a su entorno, los mecanismos moleculares que rigen estos procesos adaptativos y los componentes implicados, puede proporcionar un conocimiento muy relevante en el diseño de nuevas estrategias para la mejora. En los últimos años se han realizado avances significativos en el entendimiento de cómo las plantas se defienden del ataque de patógenos y cómo se adaptan a condiciones de

deficiencia de agua y de nutrientes. A continuación se hará un breve resumen del conocimiento que se tiene al respecto.

3.1 El sistema de defensa de las plantas

Las plantas han desarrollado un sistema defensivo complejo y eficiente, a pesar de enfrentarse a múltiples organismos potencialmente dañinos, son pocos los que llegan a causar enfermedad en la naturaleza. Además de una defensa pasiva basada en la existencia de barreras físicas (como la presencia de la cutícula) y químicas (como la acumulación de compuestos tóxicos para los microorganismos), las plantas muestran una defensa activa desencadenada ante la detección del patógeno. A diferencia de los animales, las plantas no poseen un sistema inmunitario circulatorio si no que todas las células tienen capacidad defensiva. La evolución de los mecanismos de defensa de la planta es muy dinámico, ya que también los patógenos desarrollan nuevas estrategias para sobrepasar las barreras y respuestas, estableciendo así una relación planta/patógeno que está en constante adaptación. En la Figura 5 se muestra un modelo adaptado de los modelos de Jones & Dangl (2006) y de Pritchard & Birch (2014) de la interacción entre las estrategias de ataque del patógeno y los mecanismos moleculares de la defensa activa desarrollados por la planta.

3.1.1 Reconocimiento del agente agresor

Esta defensa activa se diferencia en dos estrategias, según el reconocimiento y la interacción de la planta con el patógeno: la defensa basal y la defensa específica. La defensa basal está definida por Jones & Dangl (2006) como aquella respuesta molecular que es activada por un patógeno virulento en huéspedes susceptibles y es también conocida como resistencia general inducida o de no-huésped (*non-host resistance*). Esta respuesta rápida y débil se activa y ocurre inicialmente a nivel de una única célula cuando entra en contacto con el organismo y ciertas moléculas comunes presentes en los organismos patógenos, denominadas PAMPs (*Pathogen-associated molecular*

patterns) y también conocidos como elicitores, son reconocidas por los receptores PRRs (*Pattern recognition receptors*), desencadenando la inmunidad denominada PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Nürnberger & Brunner, 2002). Los PRRs presentes en la pared celular son proteínas muy sensibles y específicas, las cuales reconocen epítopos conservados en los PAMPs a concentraciones subnanomolares, como es el caso de los 22 aminoácidos N-terminales de la flagelina (*flg22*), componentes estructurales de los flagelos de las bacterias, que son reconocidos por la proteína FLS2 de Arabidopsis (Boller & He, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; Gómez-Gómez & Boller, 2000). En hongos, el PAMP más común es la quitina de la pared celular, que es reconocida por la proteína CERK1 (Petutschnig *et al.*, 2010). Los patrones reconocidos por los PRRs son dominios muy conservados en los PAMPs y generalmente tienen funciones estructurales o enzimáticas importantes para los microorganismos, por lo que los PRRs están especializados en el reconocimiento de patrones que difícilmente presenten mutaciones (Boller & He, 2009; Jones & Dangl, 2006). La detección de PAMPs comunes a una gran cantidad de microorganismos brinda a la planta una respuesta general e inespecífica frente a un amplio rango de patógenos. Además de los PAMPs, las plantas también son capaces de reconocer compuestos derivados de la acción de los microorganismos sobre la propia planta, o elicitores endógenos conocidos como DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) o MIMPs (*Microbe induced molecular patterns*).

Mediante la respuesta de defensa basal o PTI, la planta es capaz de evitar la progresión de los patógenos incompatibles con el huésped. Sin embargo, existen patógenos capaces de sobrepasar la defensa basal de las plantas mediante la producción y secreción de una colección de proteínas efectoras, estableciéndose una relación compatible entre el patógeno y la planta (Chisholm *et al.*, 2006). Esos efectores producidos únicamente por patógenos específicos del huésped son los responsables de la susceptibilidad de la planta denominada ETS (*Effector-triggered susceptibility*). Los efectores secretados a la célula vegetal por el patógeno tienen como funciones:

interferir con las respuestas de defensa mimetizando proteínas de la planta y promover la pérdida de nutrientes en su favor, entre otras (Jones & Dangl, 2006).

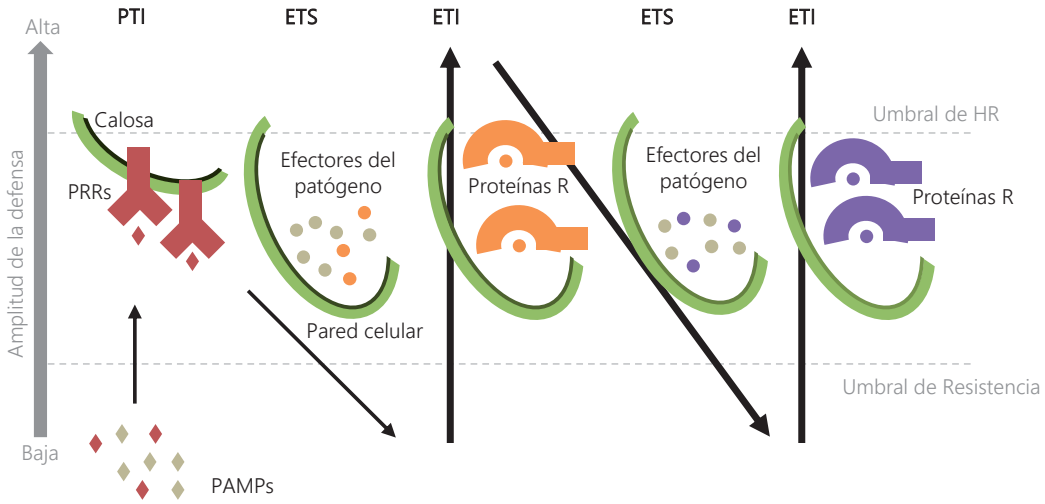

Figura 5. Respuestas del sistema inmune de las plantas. Representación gráfica del funcionamiento del sistema inmune de las plantas adaptado según el modelo de zig-zag descrito por Jones y Dangl (2006) y el modelo dinámico descrito por Pritchard y Birch (2014).

Por su parte, y para protegerse de la acción de los efectores microbianos, las plantas producen otro tipo de receptores, las proteínas de resistencia o proteínas R que reconocen esos efectores y desencadenan una respuesta más fuerte, sostenida y específica, denominada ETI (*Effector-triggered immunity*) conocida también como resistencia específica o de huésped (*host-resistance*) (Boller & He, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; Dangl & Jones, 2001). Los patógenos específicos son capaces de seguir produciendo diferentes efectores que ayudan a sobrepasar los mecanismos del huésped, ocasionando ETS y pudiendo activar nuevas respuestas ETI en la planta, siguiendo así un modelo dinámico (Jones & Dangl, 2006; Pritchard & Birch, 2014). Las proteínas R poseen dominios conservados del tipo LRR (repeticiones de leucinas), que reconocen directa o indirectamente los efectores del patógeno y los inactivan (Boller & He, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; Dangl & Jones, 2001). El reconocimiento del patógeno durante la ETI va acompañado habitualmente de la respuesta hipersensible (HR) que se caracteriza por la muerte celular programada en el sitio de infección, con el objetivo de

evitar su progreso a otras partes de la planta y limitar el crecimiento del patógeno (Jones & Dangl, 2006).

3.1.2 Procesos asociados a la respuesta de defensa

El reconocimiento del ataque del patógeno inicia una serie de reacciones que desencadenan la respuesta de defensa en la planta. Entre las primeras reacciones defensivas se incluyen el flujo de iones, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). Estas primeras reacciones van seguidas de la señalización y amplificación de la respuestas mediada por la producción de hormonas y procesos de fosforilación de proteínas, que llevan a la respuestas más tardías que incluyen la fortificación de la pared celular con la producción de calosa, la reprogramación transcripcional para la expresión de los genes de defensa, la producción de compuestos antimicrobianos (como fitoalexinas) y las producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs). Estos procesos forman parte de una compleja red de respuestas de la planta frente a la infección que se detalla en la Figura 6 y se explican en los siguientes apartados.

3.1.2.1 Flujo de calcio a través de la membrana plasmática

Pequeños aumentos en la concentración de calcio citosólico ocurren en respuesta a diferentes estímulos, como frente al reconocimiento de PAMPs, debido a la entrada de calcio tanto desde las paredes celulares como desde los organelos, activando la señalización mediada por calcio (Reddy *et al.*, 2011; Steinhorst & Kudla, 2013). Los iones de calcio (Ca^{+2}) son segundos mensajeros universales y los más versátiles en la transducción de señales percibidas en las células eucariotas, especialmente en respuesta a factores bióticos (Batistič & Kudla, 2012; Reddy *et al.*, 2011; Schulz *et al.*, 2013). Los cambios en la concentración de Ca^{+2} son muy dinámicos y dependiendo del estímulo pueden ser más o menos intensas, duraderas y fluctuantes (McAinsh & Pittman, 2009). Las concentraciones normales de Ca^{+2} citosólico se

encuentran en el orden de los nanomoles, siendo tóxicos niveles excesivamente altos, mientras que en la pared celular y en los organelos se encuentra en el orden de los milimoles. Este equilibrio en su homeostasis se mantiene a través de ciertos canales transportadores de Ca^{+2}, que en las plantas son inespecíficos, ya que también permite el flujo de otros cationes (Batistič & Kudla, 2012; McAinsh & Pittman, 2009; Reddy *et al.*, 2011; Steinhorst & Kudla, 2013).

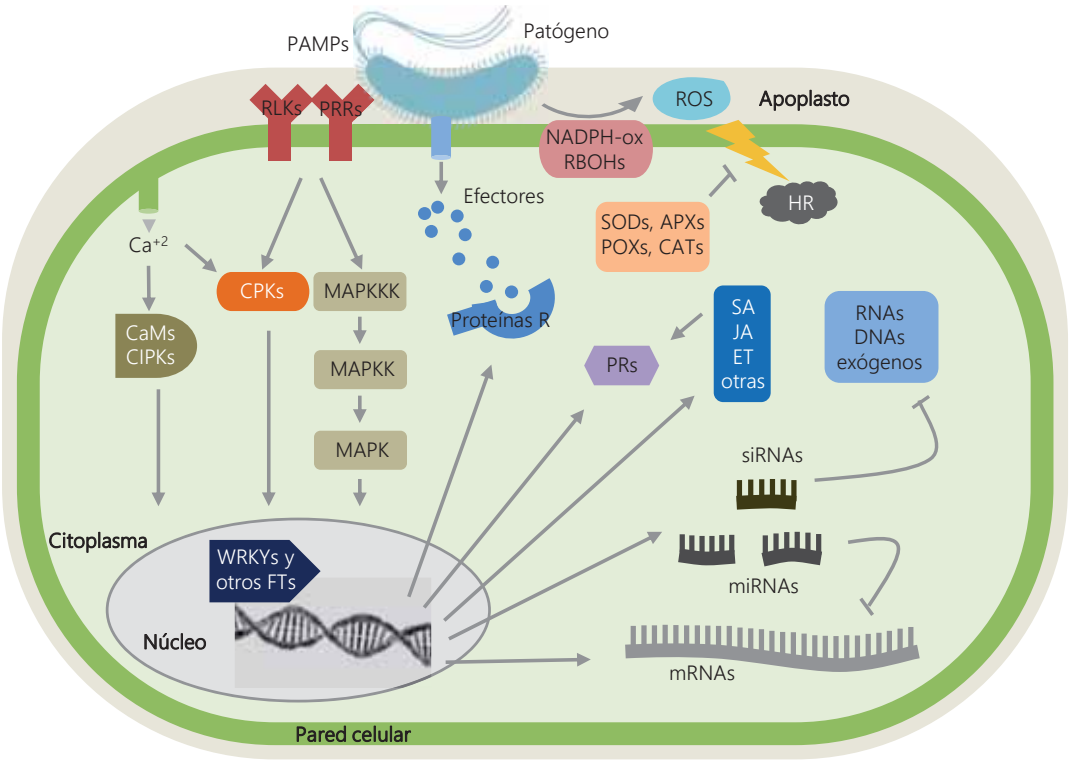

Figura 6. Procesos implicados en la respuesta de defensa. Representación gráfica de los componentes moleculares implicados en las respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos.

La respuesta a cambios en la concentración de Ca^{+2} citosólico está mediada y decodificada por diferentes tipos de proteínas sensoras y transductoras de la señal, entre las que se encuentran las proteínas con dominios de unión a Ca^{+2} (*EF hand proteins*), como: la familia de proteínas calmodulinas (CaM y CML), el complejo de proteínas calcineurinas-B/interactoras de CBL (CBL/CIPK) y las proteínas quinasas

dependientes de calcio (CPK) (Batistič & Kudla, 2012; Reddy *et al.*, 2011; Steinhorst & Kudla, 2013). El grupo de proteínas CPKs se describe con más detalle en un apartado específico, por su relevancia en este trabajo de tesis.

3.1.2.2 Producción de especies reactivas de oxígeno

El reconocimiento del patógeno inicia la rápida producción de especies reactivas de oxígeno o ROS (*Reactive oxygen species*) en forma bifásica: la primera inespecífica y transitoria, que ocurre a los pocos minutos de la interacción en la respuesta PTI; la segunda fase corresponde a una producción sostenida de ROS que desencadena la respuesta ETI en la interacción con patógenos compatibles, generalmente finalizando con una muerte celular programada por HR (Torres, 2010). Estas moléculas se producen principalmente en el apoplasto, pero también en varios compartimentos subcelulares, poco después del reconocimiento del patógeno siendo una de las respuestas más tempranas en el intento de prevenir la penetración y restringir el crecimiento (Mellersh *et al.*, 2002; Torres, 2010; Vargas *et al.*, 2012; Wojtaszek, 1997; Zurbriggen *et al.*, 2010).

Las ROS son moléculas inestables y tóxicas entre las que se encuentran: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los iones superóxido (O_2^-), los iones peróxido (O_2^{-2}) y los radicales hidroxilo (OH^-) (Perez & Brown, 2014; Torres, 2010). La producción de ROS se da principalmente por el sistema de las NADPH-oxidasas y los RBOHs (*Respiratory burst oxidase homologues*) ubicados en la membrana plasmática, que catalizan la producción de superóxido, utilizado para la formación de otras ROS (Apel & Hirt, 2004; Perez & Brown, 2014; Torres, 2010).

Existe un conflicto entre la necesidad de producción de ROS tanto para hacer frente al patógeno como para la señalización de las respuestas, y la toxicidad que tienen estas moléculas para la propia planta. Estas moléculas causan daño celular por su acción en la oxidación de lípidos y proteínas, y en la degradación de ácidos nucleicos (Apel & Hirt, 2004; Perez & Brown, 2014). El mantenimiento del equilibrio en la homeostasis de

ROS en las células está muy controlado a través de la regulación de su producción y de mecanismos detoxificadores enzimáticos y no enzimáticos. La producción de compuestos antioxidantes como: antocianinas, ascorbatos, carotenoides, tocoferoles, flavonoides y glutatión, forman parte de las estrategias no enzimáticas basadas en el secuestro de las ROS para evitar el daño en las células vegetales. Los mecanismos detoxificadores enzimáticos se basan en la inducción de genes codificantes para enzimas catalíticas de ROS como las superóxido dismutasas (SOD), peroxidasas (APX, POX, GPX), catalasas (CAT) y glutatión-S-transferasas (GST) (Apel & Hirt, 2004; Perez & Brown, 2014). Las reacciones de detoxificación de O_2^- por las SODs generan una gran cantidad de H_2O_2 en la célula, que es capaz de reaccionar con metales, generando altas cantidades de radicales OH^-. Las catalasas y peroxidasas son capaces de detoxificar esas cantidades excesivas de peróxido de hidrógeno, estableciéndose así reacciones en cadena para completar la detoxificación efectiva de las ROS en las células (Apel & Hirt, 2004; Perez & Brown, 2014).

Además de cumplir funciones directas frente al patógeno, a concentraciones bajas dentro de la célula, las ROS actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de defensa pudiendo: modificar algunas proteínas sensibles al equilibrio redox como las fosfatasas, participar en la transducción de señales mediante la detección de cambios en la concentración de ROS por proteínas MAPK, activar factores de transcripción y, por lo tanto, también regular la expresión de genes de defensa (Apel & Hirt, 2004; Baxter *et al.*, 2014; Steinhorst & Kudla, 2013). Así, las moléculas ROS suponen un componente con un papel dual de protección directa y señalización en las respuestas de defensa.

3.1.2.3 Fosforilación reversible de proteínas

La cascada de señalización de la respuesta de defensa mediada por fosforilación reversible de proteínas mediada por proteínas quinasas se inicia generalmente con el reconocimiento de los PAMPs por los PRR en la membrana plasmática en la respuesta PTI. Este proceso molecular es una de las respuestas más rápidas en la señalización de la

defensa de la planta y es uno de los más utilizados en la señalización celular. El estado de fosforilación de una proteína puede alterar su actividad, su localización subcelular, su interacción con sus sustratos y su estabilidad.

La mayoría de los PRR son proteínas con dominios extracelulares LRR que pueden bien tener además un dominio intracelular quinasa, y son llamadas proteínas quinasas receptoras (RPK o RLK), o bien estar asociadas a proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Boller & He, 2009; Tena *et al.*, 2011). Esta respuesta puede ser seguida por una serie de fosforilaciones de proteínas MAPK que forman una cascada muy importante en la transducción de las señales en la defensa de la planta (Boller & He, 2009; Gao *et al.*, 2008). Así también otras vías en la transducción de señales de defensa por fosforilación incluyen a las quinasas del tipo SNF1 (SnRK), las relacionadas con brasinosteroides (BIK, BRI, BAK) y las particularmente interesantes proteínas dependientes de Ca^{+2} (CPKs, CIPKs, CaMs), las cuales forman una red de transducción de señales híbrida entre la detección del calcio intracelular y la fosforilación de proteínas (Boller & He, 2009; Chinchilla *et al.*, 2007; Tena *et al.*, 2011; Xue-Fei *et al.*, 2012). Estas vías de señalización por fosforilación de proteínas lleva finalmente a la expresión diferencial de genes, por lo que son especialmente importantes en la respuesta de defensa (Boller & He, 2009; Gao *et al.*, 2008; Romeis *et al.*, 2001; Tena *et al.*, 2011).

3.1.2.4 Regulación transcripcional

La activación de la respuesta de defensa resulta en la acumulación diferencial de ciertos factores de transcripción (FT) cuya función es la reprogramación transcripcional para favorecer la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa. Los FT son las proteínas encargadas de la regulación de la expresión de genes, ya sea activando o reprimiendo la transcripción, mediante mecanismos de reconocimiento de secuencias promotoras específicas, en este caso relacionadas con la defensa de la planta frente a patógenos. Los más estudiados e importantes en las respuestas de defensa son

principalmente los del tipo WRKY, pero también lo son algunos del tipo AP2/ERF, bZIP MYB, y bHLH.

La familia de FT del tipo WRKY es una de las más grandes en plantas y forman parte de una red importante de señalización que modulan diversos procesos, entre los que se encuentran las respuestas de defensa (Rushton *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2002). Estos FT son del tipo dedo de zinc (*zinc-finger*) y reconocen los sitios del tipo cajas W (C/TTGACC/T, W-box) en las secuencias promotoras de numerosos genes relacionados con defensa, teniendo un papel pivotante en la regulación de la defensa (Eulgem & Somssich, 2007; Singh *et al.*, 2002). La expresión de varios genes *WRKY* está regulada durante la respuesta de defensa (Lai *et al.*, 2008; Shimono *et al.*, 2007). Muchos FT del tipo WRKY forman parte de la cascada de señalización de la defensa mediada por las MAPK (Singh *et al.*, 2002).

Los FT del tipo AP2/ERF, entre los que se encuentra OsEREBP, que son de respuesta a etileno, también fueron ampliamente estudiados por su implicancia en la defensa (Girardi *et al.*, 2013; Oñate-Sánchez *et al.*, 2007; Pré *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2002). Los del tipo bZIP que incluyen los TGA/OBF, responsables de la expresión de ciertos genes relacionados con defensa como los PR-1 y GST (Chen & Singh, 1999; Lebel *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2002). Los FT a menudo interactúan con algunos cofactores, como es el caso del cofactor OsNH1, homólogo del NPR1 (*Non-expressor of PR1*) de Arabidopsis, que actúa en conjunto con FTs del tipo TGA, siendo mediadores de la expresión de los genes de defensa relacionados con la señalización por ácido salicílico (Dong, 2004). Algunos FT del tipo MYB fueron asociados a la regulación de la expresión de genes implicados en la defensa (Wang & Irving, 2011; Zhang *et al.*, 2012), y para los bHLH se sabe que algunos participan en la respuesta de la planta en interacciones con micorrizas y que el microRNA miR393, que se induce en respuesta a flagelina, tiene como diana a un miembro bHLH (Campos-Soriano *et al.*, 2012; Mendoza-Soto *et al.*, 2012; Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). La regulación de genes de defensa mediada por FT

es clave en la respuesta de defensa de las plantas, luego de la cual ocurre otro nivel en la regulación de genes que se da post-transcripcionalmente.

3.1.2.5 Regulación post-transcripcional

La regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional por silenciamiento de RNAs está mediada por pequeños RNAs (sRNAs) y proporciona un control fino de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune de la planta. Este es un mecanismo presente en eucariotas, capaz de interferir en la acumulación de proteínas implicadas en los diversos procesos fisiológicos de la planta como el desarrollo, metabolismo y respuestas de defensa. Los componentes implicados en este sistema de regulación génica son los sRNAs, que incluyen dos clases: los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) y los microRNAs (miRNAs). Estos pequeños RNAs tienen 19-25 nt de longitud y son complementarios a secuencias de sus tránscritos dianas. Los sRNAs son dirigidos a sus dianas complementarias mediante una compleja maquinaria de enzimas que en plantas guían principalmente el corte del tránscrito y en algunos casos su inhibición traduccional (Voinnet, 2009).

El silenciamiento génico de virus mediado por siRNAs fue inicialmente el paradigma de las interacciones entre patógenos y la regulación post-transcripcional. Sin embargo, siguen aumentando las evidencias de que los sRNAs tienen un papel importante en la regulación post-transcripcional no sólo de RNAs externos sino también de la misma planta. En este contexto, los miRNAs son los reguladores post-transcripcionales principales de los genes implicados en defensa frente a patógenos, y se tratan con detalle en un apartado especial, por su importancia en esta tesis. Sin embargo, también existen evidencias del papel de los siRNAs en la respuesta de defensa no sólo frente a virus sino también en interacciones con bacterias y hongos (Baldrich *et al.*, 2014; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Voinnet, 2008). Los siRNAs también actúan en el silenciamiento de T-DNAs transferidos a la planta en infecciones con *Agrobacterium*

tumefasciens (Dunoyer *et al.*, 2006). La regulación post-transcripcional es una vía fundamental para la acumulación diferencial de proteínas relacionadas con la defensa de la planta en condiciones de infección.

3.1.2.6 Acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis

Las proteínas relacionadas con patogénesis o PRs (*Pathogenesis-related proteins*) son aquellas cuya acumulación se ve incrementada en respuesta a la infección por patógenos y que han sido implicadas en la defensa activa de la planta pudiendo tener funciones en la restricción del desarrollo del patógeno y de su crecimiento en los tejidos de la planta (Datta & Muthukrishnan, 1999; van Loon *et al.*, 2006). Se han descrito 17 grupos de proteínas PR en plantas, diferenciadas según su actividad biológica, las cuales se listan en la Tabla 2.

En arroz se han identificado los grupos de proteínas PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-6, PR-8, PR-10, PR-15 y PR16, y algunos de los genes de estos grupos son utilizados como marcadores de la respuesta de defensa de la planta, como: OsPR1a y OsPR1b (PR-1); OsPR5 (PR-5); OsPBZ1 y JIOsPR10 (PR-10) (Campos-Soriano *et al.*, 2012; Datta *et al.*, 1999; Gómez-Ariza *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2012; Jwa *et al.*, 2001; Mitsuhara *et al.*, 2008; Quilis *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2006). También se pueden citar a las peroxidasas como OsPOX22.3 (PR-9) y las proteínas de transferencia de lípidos o LTPs (PR-14). Varias de las PRs están reguladas por las vías de señalización mediada por hormonas, como por ácido salicílico (SA), como el caso de los grupos PR-1, PR-2 y PR-5, y por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) como los grupos PR-3, PR-4, PR-12 y PR-13, aunque la regulación de la expresión de estos genes puede ser mucho más compleja (van Loon *et al.*, 2006).

Tabla 2. Clasificación de las proteínas PR. Familias de proteínas PR (a) según la clasificación de Van Loon *et al.* (2006) mostrando el ejemplo de una proteína típica de la familia y la especie vegetal en la que se encuentra (b) y sus funciones descritas (c).

Familia [a]	Miembro típico [b]	Propiedades y funciones [c]
PR-1	PR1a – *N. tabacum*	Desconocidas
PR-2	PR2 – *N. tabacum*	β-1,3-glucanasas
PR-3	P,Q – *N. tabacum*	Quitinasas del tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	R – *N. tabacum*	Quitinasas del tipo I, II
PR-5	S – *N. tabacum*	Tipo taumatinas
PR-6	Inhibidor I - *Solanum lycopersicum*	Inhibidor de proteasas
PR-7	P69 – *S. lycopersicum*	Endoproteasas
PR-8	Quitinasa - *Cucumis sativus*	Quitinasas tipo III
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina – *N. tabacum*	Peroxidasas
PR-10	PR1 - *Petroselinum crispum*	Tipo ribonucleasas
PR-11	Quitinasa clase V – *N. tabacum*	Quitinasas tipo I
PR-12	Rs-AFP3 - *Raphanus sativus*	Defensinas
PR-13	THI2.1 – *A. thaliana*	Tioninas
PR-14	LTP4 – *H. vulgare*	Proteínas de transferencia de lípidos
PR-15	OxOa – *H. vulgare*	Oxalato-oxidasas
PR-16	OxOLP – *H. vulgare*	Tipo oxalato-oxidasas
PR-17	PRp27 – *N. tabacum*	Desconocidas

3.1.3 Hormonas reguladoras de las respuestas de defensa

Las fitohormonas tienen un papel fundamental en la señalización de la respuesta de defensa, siendo las más importantes y sobre las que se han realizado más estudios: el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico y jasmonatos (JA), y etileno (ET). Otras hormonas como el ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA), brasinosteroides (BR) y auxinas también han sido relacionadas con ciertas respuestas de defensa (Bari & Jones, 2009).

3.1.3.1 Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) es una hormona de naturaleza fenólica que es crítica para la señalización de la respuesta inmune de la planta generalmente frente a patógenos biótrofos y hemibiótrofos, así como en el establecimiento y la señalización de la resistencia sistémica adquirida (SAR), una condición de la planta que otorga resistencia sistémica frente a la infección después de haberse producido la activación del sistema de defensa por el ataque de patógenos en algún tejido de la planta (De Vleesschauwer

et al., 2013; Wang & Irving, 2011). En los tejidos de arroz, el SA se encuentra principalmente en forma de ácido libre y en condiciones normales tiene un contenido alto llegando a concentraciones de 8-37 µg/g de peso fresco, cuando otras especies vegetales tienen unos 50 ng/g. La alta concentración basal de SA en arroz podría actuar como antioxidante, previniendo que las células sufran daño oxidativo en un eventual ataque de patógenos (De Vleesschauwer *et al.*, 2013).

El SA está implicado en la señalización de la producción de ROS y por lo tanto en la homeostasis redox, además de inducir la producción de catalasas, peroxidasas e hidrolasas (De Vleesschauwer *et al.*, 2013; Wang & Irving, 2011). La señalización mediada por SA lleva a la muerte celular programada por HR, evitando que la infección por biótrofos pueda progresar (Yang *et al.*, 2013). Esta señalización además se ha visto implicada en la acumulación de la proteína OsNH1 (AtNPR1), el cofactor de FTs del tipo TGA que median la expresión de varios genes de defensa, específicamente PRs que pueden otorgar resistencia a patógenos biótrofos bacterianos y fúngicos. Otra vía de señalización mediada por SA es la del FT WRKY45, que también regula la expresión de varios genes relacionados con defensa, incluidas varias PRs (Bari & Jones, 2009; De Vleesschauwer *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

3.1.3.2 Ácido jasmónico y jasmonatos

El ácido jasmónico y los jasmonatos (JA), principalmente metil-jasmonato, son moléculas derivadas de lípidos, sintetizados a partir del ácido linolénico, que actúan como reguladores cruciales en la defensa de las plantas, siendo predominantemente efectivos contra insectos y patógenos necrótrofos (De Vleesschauwer *et al.*, 2013; Wang & Irving, 2011; Yang *et al.*, 2013). Muchos estudios muestran que los niveles de JA aumentan localmente en el sitio de la infección, y que aplicaciones exógenas de JA inducen la expresión de genes de defensa (Bari & Jones, 2009). A pesar de que se ha reportado que existe un posible antagonismo entre las vías de señalización mediada por SA y por JA, en arroz se ha visto que el JA es también un activador de la resistencia a

patógenos biótrofos y hemibiótrofos como *M. oryzae* y *X. oryzae* (De Vleesschauwer *et al.*, 2013).

La vía de señalización mediada por JA está integrada por tres proteínas componentes principales, que contienen los dominios del tipo JA-ZIM de unión a JA, que son: COI1, una ubiquitina-ligasa requerida para la degradación de proteínas; JAR1, una aminoácido-sintetasa responsable de la conjugación del JA con isoleucina, la cual actúa como molécula señalizadora de la respuesta; y JIN1/MYC2, un FT implicado en la regulación de la expresión de varios genes de defensa (Bari & Jones, 2009; De Vleesschauwer *et al.*, 2013; Wang & Irving, 2011; Yang *et al.*, 2013).

3.1.3.3 Etileno

El etileno (ET) es una fitohormona gaseosa conocida hace muchos años por su participación en la maduración frutal, pero que también se ha visto su implicancia en las vías de señalización de las respuestas de defensa, principalmente actuando como sinérgico en la vía del JA contra patógenos necrótrofos (De Vleesschauwer *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

En arroz se ha documentado que el ET exógeno puede proveer protección frente a *M. oryzae* y *R. solani* y que esta hormona se produce en las etapas tempranas de la infección por estos hongos, coincidiendo con una muerte celular programada por HR y una inducción de genes de defensa (Yang *et al.*, 2013). Se ha visto también que el ET es un regulador negativo de la resistencia frente a *X. oryzae*. Los datos y estudios realizados sobre el papel que juega el ET en la respuesta de defensa de arroz, lo ubican como un regulador de esas respuestas, aunque sus funciones en cada interacción dependen del estilo de vida del patógeno y la biología de la infección (De Vleesschauwer *et al.*, 2013).

3.1.3.4 Otras hormonas reguladoras

Comparados con el SA, JA y ET, el papel que juegan otras hormonas en la inmunidad innata de las plantas de arroz está mucho menos estudiado. En el caso del ABA, se han reportado casos de que puede actuar tanto como regulador positivo como negativo de la resistencia a enfermedades, aunque predominan los casos en los que el ABA regula negativamente la respuesta de defensa, incluso suprimiendo la defensa basal frente a *X oryzae* y *M. oryzae*. El ABA probablemente cumple roles que dependen según la interacción, tal como se ha observado para el ET (De Vleesschauwer *et al.*, 2013). El GA se ha relacionado como un regulador de la degradación de proteínas DELLA, las cuales se ha visto que incrementan la resistencia a patógenos necrótrofos y susceptibilidad a biótrofos, aparentemente modulando el balance SA:JA en favor del JA, por lo que el GA es un antagonista de la señalización del JA (De Vleesschauwer *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Así también se han relacionado a las auxinas con la regulación negativa de la respuesta de defensa. Muchos patógenos producen auxinas durante la infección, estimulando la susceptibilidad de la planta (Yang *et al.*, 2013). Además, el SA se ha implicado en la represión de la señalización por auxinas. Los BRs son hormonas que se han visto implicadas en la respuesta de defensa, ya que los receptores de BRs ubicados en la membrana plasmática de la célula median la respuesta de defensa e interaccionan con algunos PRRs, como el FLS2, para activar el PTI. El receptor de BRs, OsBAK1, es también un receptor de PAMPs y media la respuesta de defensa frente a *M. oryzae* (Yang *et al.*, 2013). La regulación de la respuesta de defensa mediada por hormonas juega un papel importante y la intercomunicación entre ellas es una compleja red de vías de señalización que debe ser controlada por la planta en condiciones de infección.

3.2 Respuestas de las plantas frente al estrés hídrico

Cuando la humedad de los suelos se mantiene baja durante cierto tiempo, la extracción de agua por las raíces y el transporte de agua a través de la planta se

reducen, produciéndose una situación de déficit hídrico. El parámetro utilizado para determinar el estado hídrico de las células y tejidos de la planta es el contenido relativo de agua o potencial hídrico (Ψ). El potencial hídrico tiene un concepto similar al de las corrientes eléctricas, en la cual la corriente fluye desde los compartimientos con potencial alto hacia los de bajo potencial. Así, el agua fluye a través de la planta desde el suelo, que tiene alto potencial hídrico, hacia la atmósfera, con bajo potencial hídrico. Así, cuando el potencial hídrico del suelo va disminuyendo debido a la sequía, se crea un déficit en el flujo de agua desde las raíces hacia las hojas. Los factores determinantes en la pérdida de potencial hídrico son: la concentración de solutos (potencial osmótico) y la presión física entre los límites de las células (turgencia). La pérdida de potencial hídrico puede generar además una concentración de iones tóxicos como el Na^+ y el Cl^- en la célula (Pareek *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2008).

Esta condición requiere una respuesta de la planta, que incrementa la eficiencia en la extracción de agua por las raíces y simultáneamente reduce la transpiración para disminuir el potencial hídrico de las hojas y mantener el gradiente que posibilite el flujo de agua. La transpiración en las plantas ocurre a través de los estomas y es necesaria para disipar la energía recibida en forma de radiación solar y temperatura del ambiente. En condiciones de disminución de potencial hídrico en las hojas, se pierde la turgencia entre las células (marchitez), produciéndose el cierre estomático para reducir la transpiración. El cierre estomático provoca una reducción en la conductancia de los estomas, causando un aumento de la temperatura de la planta y una reducción de la asimilación fotosintética y del crecimiento. Las plantas pueden mantener la turgencia de las células reduciendo el potencial osmótico en un proceso llamado ajuste osmótico, mediante la producción de solutos compatibles llamados "osmolitos" u "osmoprotectores" como manitol, prolina, glicin-betaina, entre otros (Slater *et al.*, 2008). Además frente al estrés hídrico se producen proteínas del tipo LEA (*Late embryogenesis*

abundant), las cuales actúan protegiendo a las células del daño por estrés abiótico (Wang *et al.*, 2014).

3.2.1 La señalización de las respuestas frente al estrés hídrico

En las plantas, la ruta de señalización en la adaptación frente a la sequía (Figura 7) comienza generalmente con cambios en la concentración de Ca^{+2} intracelular debido al estrés, y con la detección del estrés osmótico causado por la pérdida de potencial hídrico en la célula. La vía de señalización mediada por cambios de Ca^{+2} se inicia mediante la activación de proteínas del tipo CaMs, CIPKs y CPKs, las cuales detectan esos cambios y transducen esas señales fosforilando y activando proteínas MAPKs, siendo específicamente en arroz la vía del OsMPK1 y OsMEK2 (Shanker *et al.*, 2014).

Por otra parte, frente al estrés osmótico es activada la vía de señalización mediada por hormonas, en la cual el ABA es considerada la hormona más importante, teniendo un papel determinante en el cierre de estomas para evitar la deshidratación. El ABA se comienza a acumular en respuesta al bajo potencial hídrico de las células. La señalización mediada por ABA se inicia con la detección de los cambios de concentración de esta hormona mediante receptores del tipo PYR, PYL y RCAR, que se unen formando un complejo de inactivación de fosfatasas PP2C. Estas fosfatasas son reguladores negativos de la respuesta a estrés hídrico y están encargadas de inactivar proteínas de regulación de apertura de estomas como el canal de aniones SLAC1 y la quinasa OST1, además de inactivar también a proteínas quinasas del tipo SnRK2 (Pizzio *et al.*, 2013; Shanker *et al.*, 2014). Estas quinasas, junto con las MAPKs componentes de la vía de señalización mediada por Ca^{+2}, son responsables de la acumulación de proteínas protectoras del tipo LEA y osmolitos, además de la expresión de genes relacionados con sequía ABRE (*ABA-responsive elements*), como los factores de transcripción del tipo NAC bZIP AP2/ERF, que son reguladores de la expresión de genes del tipo DREBs (*Dehydration-responsive binding element*) (Shanker *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014a).

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas ROS forman parte importante en la señalización por estrés biótico, pero también son producidas durante el estrés hídrico a través de la vía del NADPH-oxidasa y las RBOHs. Una producción excesiva de ROS en condiciones de sequía causa la peroxidación de lípidos de la membrana provocando su disrupción por daño oxidativo, aunque se ha visto que en respuesta a estrés hídrico, pequeños cambios en el contenido de ROS podrían cumplir funciones señalizadoras del estrés, desencadenando las respuestas adaptativas. Durante la respuesta frente al estrés hídrico las plantas también producen detoxificadores de ROS como SODs, CATs, POXs, APXs y GSTs para protegerse del daño oxidativo en la membrana celular (Cruz de Carvalho, 2008; Shanker *et al.*, 2014).

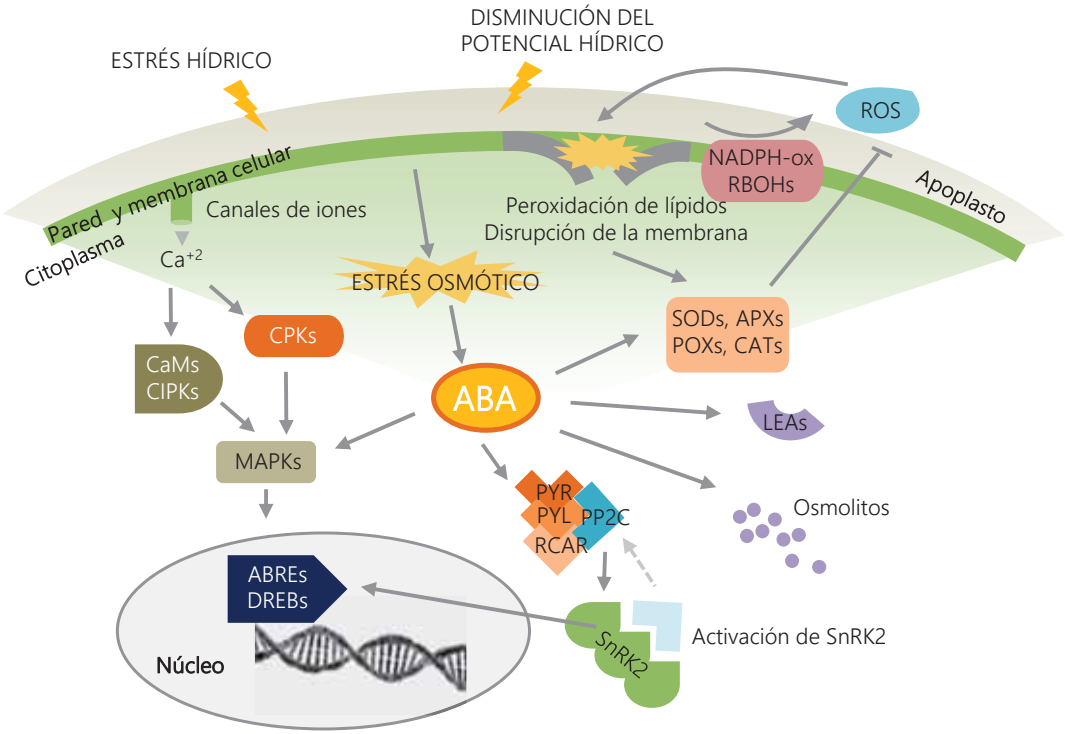

Figura 7. Señalización mediada por ABA en la respuesta frente a estrés hídrico. Representación gráfica de las respuestas en la señalización mediada por ABA frente a déficit hídrico, adaptado según el modelo de Shanker *et al.* (2014).

3.3 Respuestas de las plantas frente a la deficiencia de fósforo

El fósforo está implicado en el suministro y transferencia de energía para todos los procesos bioquímicos de la planta; es parte integral de ácidos nucleicos y fosfolípidos; y puede unirse a proteínas modificando su función y activación (De Datta, 1981; Pareek *et al.*, 2010). Su deficiencia en las plantas genera síntomas visiblemente graves como: cambios morfológicos en la arquitectura radicular, floración y madurez retardada, limitado número de macollos, bajo crecimiento, hojas estrechas y cortas, necrosis y muerte de las hojas viejas, coloración rojiza o violácea en las hojas por producción de antocianinas, entre los principales (De Datta, 1981).

Las plantas responden ante el bajo contenido de fosfatos en el medio y para hacer frente al déficit nutricional ocurren, principalmente en las raíces, alteraciones moleculares, fisiológicas y en el desarrollo. El crecimiento y la división celular se detienen, los procesos metabólicos disminuyen y se inducen los mecanismos de detoxificación de ROS, debido a la disminución de fuentes de energía para la fijación de CO_2 y la alta producción de electrones libres que pueden interaccionar con el oxígeno y formar moléculas ROS (Hernandez & Munne-Bosch, 2015; Pareek *et al.*, 2010). Se producen cambios en la expresión de ciertos genes codificantes para proteínas que cumplen funciones en la detección, absorción, movilización y translocación del nutriente. Para facilitar la movilización y reutilización del fosfato retenido en fuentes orgánicas y para mantener la homeostasis se induce la producción de fosfatasas y transportadores de fosfatos de alta afinidad (Pareek *et al.*, 2010). Mantener un control fino de la homeostasis de fosfatos es indispensable para que la planta pueda sobrellevar los efectos de la deficiencia, aunque también es posible que la planta sufra de los excesos de este nutriente en sus tejidos, situación que tuvo una gran importancia en este trabajo de tesis, aunque a nivel de campo es menos frecuente (De Datta, 1981; Jones, 1998).

3.3.1 La señalización en la homeostasis de fosfatos

La señalización de las respuestas de las plantas de arroz frente a la deficiencia de fosfatos y la regulación de su homeostasis se detalla en la Figura 8. Los reguladores principales de estas respuestas son los factores de transcripción tipo MYB: OsPHR1 y especialmente OsPHR2, ambos homólogos de AtPHR1 de Arabidopsis, los cuales controlan y regulan la expresión de los genes PSI (*Pi-starvation inducible*) que contienen motivos PBS1 en su secuencia promotora (*PHR-binding sequence*).

Son varios los genes regulados ya sea directa o indirectamente por OsPHR2, incluyendo: *OsIPS1/2* (*Inducible in phosphate starvation*); los miRNAs *osa-MIR399* y *osa-MIR827*; varios genes *OsSPX*s; transportadores de fosfatos *OsPT*s; fosfatasas *OsPAP*s y otros recicladores de fosfatos como *OsSQD2* (Wu *et al.*, 2013). El factor de transcripción OsPHR2 regula negativamente la expresión de la ubiquitina-ligasa *OsPHO2* a través de la activación de *osa-MIR399*, que tiene como diana al tránscrito *OsPHO2*. Esta ubiquitina-ligasa regula la acumulación del transportador de fosfatos de baja afinidad OsPT2 y el transportador inespecífico OsPHO1, los cuales se han visto implicados en la translocación de fosfatos a la parte aérea. El transportador OsPT6 de alta afinidad se ha relacionado principalmente con la absorción de fosfatos. Además de esta vía indirecta en la activación del transportador OsPT2, su expresión también está regulada directamente por los motivos PBS1 presentes en su promotor. Los OsSPXs son reguladores negativos de la expresión de genes PSI a través de la supresión de OsPHR2, y junto a su regulador negativo *osa-MIR827*, son claves en la autorregulación de la cascada de señalización (Hu & Chu, 2011; López-Arredondo *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013).

Se desconocen aún los mecanismos de detección que regulan las respuestas de las plantas frente a la deficiencia de fosfatos. Tampoco se han descrito los elementos de señalización implicados en la transducción de señales, como el papel del Ca^{+2} y las

proteínas quinasas que pudieran estar implicadas frente a la deficiencia de este nutriente.

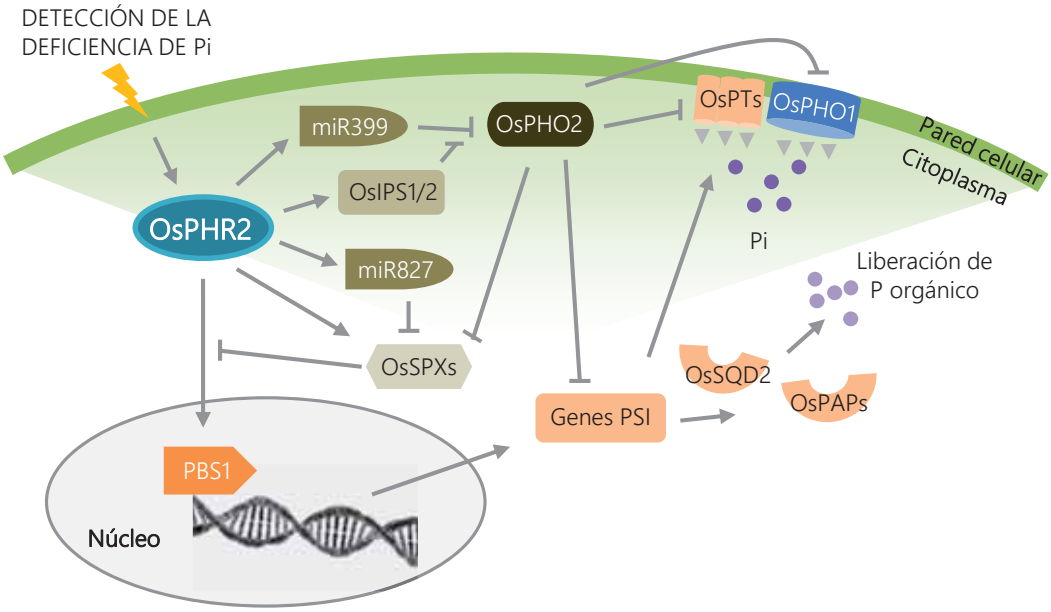

Figura 8. Señalización de la homeostasis de fosfatos en arroz. Representación gráfica de las respuestas de la planta de arroz frente a la deficiencia de fósforo para mantener la homeostasis de fosfatos, adaptado según el modelo de Wu *et al.* (2013).

4. Proteínas quinasas dependientes de calcio

Las CPKs constituyen componentes esenciales en múltiples procesos de señalización en plantas, no solo como mediadores de la respuesta a condiciones ambientales adversas, sino también en los procesos del desarrollo y reproducción. Esto es porque estas proteínas tiene la particularidad de combinar en una única cadena polipeptídica un dominio de detección de Ca^{+2} y un dominio quinasa, lo que les confiere la capacidad de detectar cambios en los niveles de Ca^{+2} y transducir rápidamente esas señales en forma de fosforilación de proteínas. Teniendo en cuenta que tanto el Ca^{+2} como la fosforilación de proteínas son mensajeros secundarios en múltiples procesos de transducción de señales en eucariotas, se entiende la versatilidad de este grupo de proteínas. La familia de proteínas CPKs forma parte de la superfamilia de serin-treonin quinasas CDPK-SnRK, conformada además por las quinasas relacionadas con CPKs

(CRKs), quinasas fosfo-enol-piruvato carboxilasa (PPCKs), quinasas relacionadas con PPCKs (PEPRKs), quinasas dependientes de calmodulina (CaMKs), quinasas dependientes de Ca^{+2} y calmodulina (CCaMKs) y las quinasas SnRKs (Hrabak *et al.*, 2003). Se ha propuesto que las CPKs han evolucionado a partir de la fusión de las CaMKs y las calmodulinas (Liese & Romeis, 2013), lo que hace de las CPKs unas moléculas proteicas híbridas, incrementando la eficiencia de las respuestas en organismos sésiles como las plantas.

4.1 Características de las proteínas CPKs de plantas

Las CPKs de plantas forman una familia multigénica, de estructura y secuencias muy conservadas, consistente en 3 dominios claramente diferenciados (Figura 9A): un dominio N-terminal variable, un dominio serin-treonin quinasa y un último dominio referido comúnmente como el dominio de activación de CPK (CAD). El dominio CAD consta de dos sub-dominios: el dominio de autoinhibición, y el dominio de unión a Ca^{+2} homólogo a la calmodulina (Hrabak *et al.*, 2003; Klimecka *et al.*, 2007; Liese & Romeis, 2013; Schulz *et al.*, 2013). El dominio N-terminal es altamente variable y puede contener sitios de miristoilación o palmotilación. La adición de los grupos miristoilos o palmitoilos a las proteínas CPKs determina su anclaje a membranas celulares. Las CPKs poseen un bucle de activación en el dominio quinasa conservado que contiene residuos acídicos, no siendo necesaria la fosforilación de la quinasa para estar activa (Ye *et al.*, 2009). El dominio calmodulina tiene generalmente cuatro motivos de unión a Ca^{+2} del tipo "*EF-hand*" que actúan en pares y se unen al dominio autoinhibidor (pseudosustrato), inhibiendo la actividad quinasa cuando no existen concentraciones adecuadas de Ca^{+2} para su activación (Liese & Romeis, 2013; Ye *et al.*, 2009).

Esta familia multigénica posee 31 miembros en arroz y 34 en Arabidopsis, divididos en 4 subgrupos en cada especie (Figura 9B), no existiendo mayores diferencias entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo que indica que esta familia tiene funciones

esenciales en el desarrollo de las plantas (Ray *et al.*, 2007). Las CPKs se expresan en la mayoría de los tejidos vegetales y algunas de ellas muestran expresión diferencial frente a condiciones específicas de crecimiento (Ye *et al.*, 2009). Estas características han puesto en consideración que pueda existir una diferenciación en las funciones para cada CPK (Harmon *et al.*, 2000). Existen CPKs que cumplen funciones en la germinación, en respuesta a fotoperiodo, elongación del tubo polínico, desarrollo de pelos radiculares, división celular, muerte celular programada, desarrollo de semillas y diversos estreses (Klimecka *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2007).

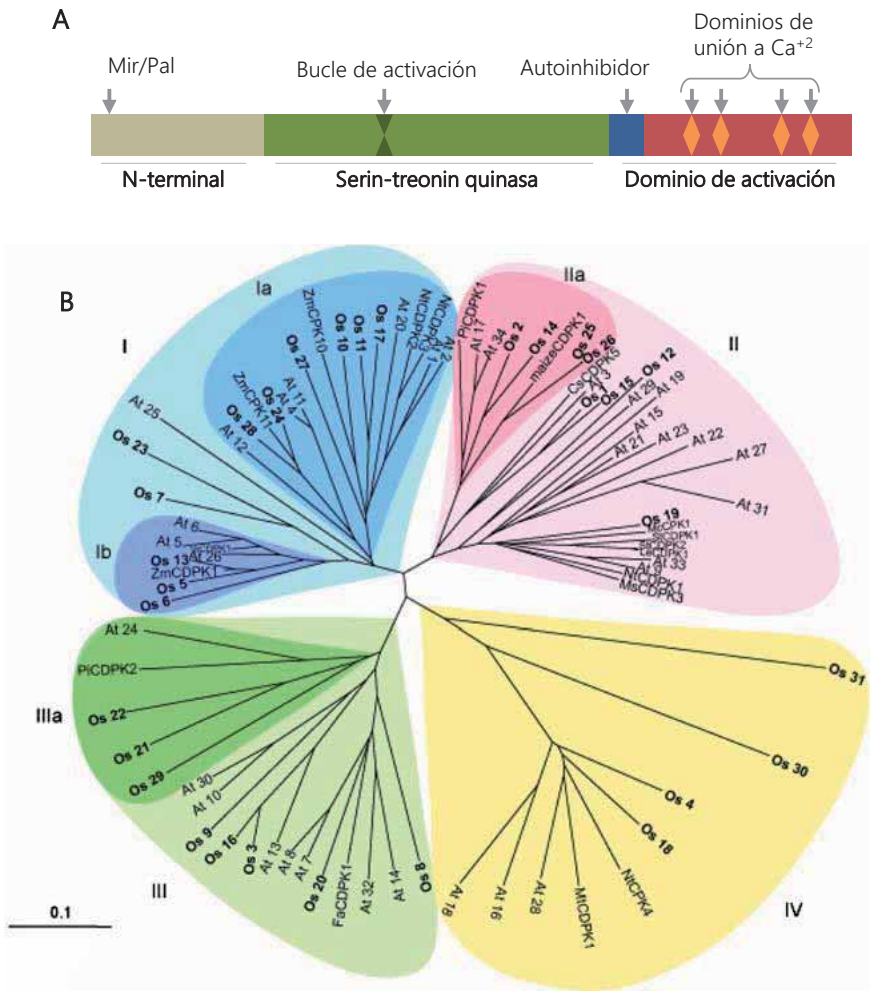

Figura 9. Proteínas quinasas dependientes de calcio de plantas. A. Representación gráfica de la estructura general de las proteínas CPKs. **B.** Árbol filogenético de proteínas CPKs de *A. thaliana* (At) y *O. sativa* (Os, negrita), mostrando los 4 grupos filogenéticos (I a IV) y los sub-grupos (Ia, Ib, IIa y IIIa) correspondientes a su similaridad en los patrones de expresión, según Ray *et al.* (2007).

4.2 CPKs en las respuestas de las plantas frente al estrés

Se ha visto que las CPKs responden a los cambios en el Ca^{+2} intracelular en condiciones de estrés abiótico, desencadenando la señalización de las respuestas. Las CPKs tienen funciones en la señalización por ABA, flujo de iones, cambios metabólicos, alteraciones en la expresión de genes, y han sido relacionadas generalmente como reguladores positivos de las respuestas de las plantas a estrés abiótico. Así, en Arabidopsis se han visto CPKs que median la expresión de genes relacionados con ABA en la respuesta frente a factores abióticos, como AtCPK4, AtCPK7, AtCPK10 AtCPK11 y AtCPK30. Otras, como AtCPK3, AtCPK6, AtCPK21 y AtCPK23, inducen la expresión de canales de flujo de iones (Schulz *et al.*, 2013). En arroz se han encontrado CPKs como OsCPK4, OsCPK7 y OsCPK13, directamente relacionadas con la tolerancia a estrés abiótico como sequía, salinidad y frío. Otras CPKs de arroz también se han relacionado con estrés abiótico por su inducción (OsCPK10, OsCPK12, OsCPK15 y OsCPK21) o represión (OsCPK1) en las respuestas frente a factores abióticos (Abbasi *et al.*, 2004; Campo *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2007; Saijo *et al.*, 2000).

Como ya se ha mencionado, la interacción de las plantas con microorganismos ocasiona cambios en la concentración del Ca^{+2} citosólico, situación que activa las CPKs implicadas en este proceso. La proteína OsCPK18 se ha visto implicada en el proceso simbiótico del arroz con micorrizas (Campos-Soriano *et al.*, 2011) y en cuanto a la respuesta de defensa frente a patógenos, se han encontrado varias proteínas CPKs relacionadas con la señalización de este proceso. En Arabidopsis la proteína AtCPK1 cumple un papel importante durante la respuesta de defensa frente a la infección fúngica (Coca & San Segundo, 2010). En arroz se descrito que la proteína OsCPK10 (Fu *et al.*, 2013) y la OsCPK4 (Bundó & Coca, 2015) median la resistencia a *M. oryzae*, mientras que la proteína OsCPK12 (Asano *et al.*, 2012) confiere susceptibilidad a este patógeno del arroz. Por otra parte, se ha visto que las RBOHs, responsables de la producción de ROS, son posibles interactoras de proteínas CPKs, por lo que las CPKs podrían además tener

implicancia en la red de señalización por ROS en las respuestas de defensa (Gao *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2012; Perez & Brown, 2014; Steinhorst & Kudla, 2013).

5. MicroRNAs

Los miRNAs podrían representar otro elemento fundamental en la regulación de la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas. Los miRNAs son pequeños RNAs endógenos, no codificantes para proteínas, que tienen un papel crucial en la expresión de genes a nivel de regulación post-transcripcional. El modo de acción de estas moléculas en esta regulación se da a través de interacciones específicas y complementarias con secuencias del mRNA diana, guiando la degradación del tránscrito por corte o mediante represión traduccional. Los miRNAs de plantas son de 20-24 nt de longitud y tienen una alta complementariedad con sus dianas. Estos miRNAs de plantas regulan la expresión de genes codificantes para: factores de transcripción, proteínas de respuesta a estrés, proteínas relacionadas con el crecimiento, desarrollo y fisiología, entre otras (Eldem *et al.*, 2013; Rogers & Chen, 2013; Voinnet, 2009). Hasta ahora han sido descritos 713 miRNAs maduros en arroz, distribuidos en 592 pre-miRNAs (www.mirbase.org - Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). En general, el origen de estos miRNAs es un gen *MIR* traducido para formar un tránscrito primario (pri-miRNA) y después procesado a un precursor de miRNA (pre-miRNA) que tiene la particularidad de formar una estructura en forma de horquilla, a partir del cual se genera el miRNA maduro. Este complejo proceso de biogénesis se detalla en el siguiente apartado.

5.1 Biogénesis y modo de acción de los miRNAs

El proceso canónico de biogénesis de los miRNAs maduros en plantas (Figura 10) se inicia, generalmente a partir de genes *MIR*, los cuales poseen su propia unidad transcripcional y están localizados en regiones “intergénicas” por todo el genoma, esto es, en regiones no codificantes para proteínas. Estos genes *MIR* codifican un tránscrito primario (pri-miRNA) por medio de la RNA polimerasa II (PolII), estabilizados por una

metilguanosina (met) en el extremo 5' y una cola poliadenilada (polyA) en el extremo 3' (Rogers & Chen, 2013). La mayoría de los genes *MIR* poseen su propio promotor y en Arabidopsis y arroz se ha visto que en esa región promotora se encuentran cajas de inicio de la transcripción del tipo TATA y elementos de regulación de la expresión de unión a diversos tipos de factores de transcripción como del tipo MYB, cajas W, MYC, entre otros (Zhao & Li, 2013).

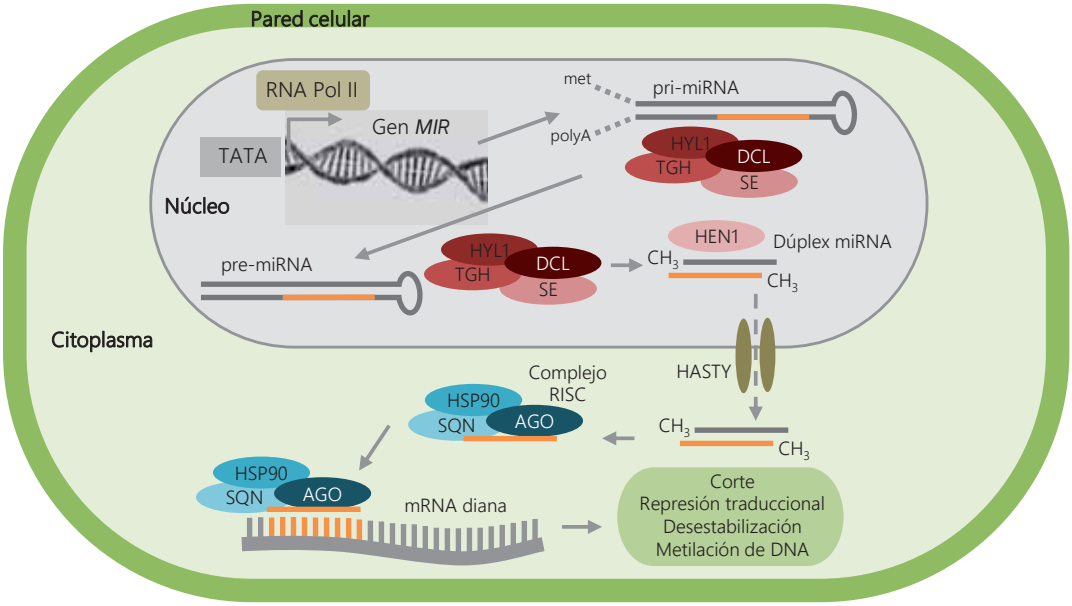

Figura 10. Biogénesis de miRNAs. Representación gráfica de la biogénesis y el procesamiento de miRNAs en plantas. Adaptado de Voinnet (2009) y Rogers & Chen (2013).

Todavía en el núcleo, estos pri-miRNA son procesados a un precursor de miRNA (pre-miRNA) cuando son cortados cerca de la base de la estructura de horquilla (*stemloop*) que forma el pre-miRNA, por el complejo formado por las proteínas: de tipo *Dicer* (DCL), de unión a RNAs de doble cadena HYL (HYL/DRB), del tipo TOUGH (TGH) y del tipo dedo de zinc SERRATE (SE). Después de la escisión del pre-miRNA en forma de stemloop, estos son procesados nuevamente por el complejo de proteínas DCL-HYL-TGH-SE para formar un dúplex entre el miRNA maduro y su secuencia parcialmente complementaria (Rogers & Chen, 2013). Estos dúplex primeramente son estabilizados

por metilación mediante la proteína HEN1, para después ser exportados al citoplasma con la ayuda de proteínas HASTY (Voinnet, 2009). Una vez en el citoplasma, el miRNA maduro es separado de la secuencia parcialmente complementaria, cargándose en el complejo enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*), del cual forman parte central las proteínas AGO, así como también las proteínas de choque térmico 90 (HSP90) y del tipo SQUINT (SQN). Este complejo RISC guía al miRNA hacia su diana complementaria que es generalmente degradada por corte del tránscrito, aunque también pueden ocurrir otros tipos de silenciamiento como la inhibición traduccional, desestabilización del tránscrito diana, o unión a DNA complementario en el núcleo para guiar la metilación (Rogers & Chen, 2013).

Los miRNAs en plantas pueden originarse además de regiones intrónicas, regiones no traducidas (UTRs) o exones. Específicamente en arroz se ha descrito que sólo el 35% de los miRNAs proceden de regiones intergénicas mientras que el 65% están ubicados en regiones intragénicas, esto es, dentro de genes codificantes para proteínas (Zhao & Li, 2013). La regulación de estos miRNAs ubicados en regiones intragénicas sigue siendo un problema abierto, aunque se sabe que muchos de ellos pueden tener su propia regulación y que otros podrían depender de la regulación de los genes que los contienen (Marsico *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012).

5.2 MiRNAs en las respuestas de las plantas frente a estrés

Los miRNAs de plantas tienen un papel importante en un amplio rango de procesos fisiológicos y en los últimos años se han incrementado las evidencias sobre su rol crucial en las respuestas de las plantas frente a diversos estreses. Así, estos reguladores de la expresión génica se han visto implicados en estreses abióticos como: sequía, frío, salinidad, deficiencias nutricionales; en estreses bióticos como en respuesta a: nemátodos, hongos y bacterias; e implicados en las rutas de señalización por hormonas (Baldrich *et al.*, 2014; Curaba *et al.*, 2014; Eldem *et al.*, 2013; Khraiwesh *et al.*, 2012; Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). En muchas especies vegetales se han estudiado

miRNAs implicados en las respuestas frente a estrés, especialmente en Arabidopsis pero también en otras con gran importancia en la agricultura como el maíz, arroz, caña de azúcar, trigo, cebada, algodón, soja y otros (Ferreira *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014; Hackenberg *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2012b; Sunkar *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2012b; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2013).

Específicamente en arroz, se han encontrado miRNAs asociados a la respuesta frente a sequía (Zhou *et al.*, 2010), estrés oxidativo (Li *et al.*, 2011b), respuesta de defensa frente a *M. oryzae* (Baldrich *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013a) y recientemente se ha descrito un nuevo miRNA (osa-miR7965) implicado directamente en la resistencia de las plantas de arroz a la piriculariosis, mediante la regulación de su diana, un tránscrito específico del gen *OsNramp6* (Campo *et al.*, 2013). Este avance en la investigación sobre el papel que juegan los miRNAs en las respuestas de las plantas, principalmente arroz, frente a estrés indica la importancia que podrían tener estos reguladores en la mejora de los cultivos.

6. Interacción de las respuestas al entorno reguladas por CPKs y miRNAs en las plantas de arroz

Como hemos resumido, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de respuesta a la gran variedad de estímulos ambientales a los que están expuestas, tanto bióticos como abióticos, ante los cuales tienen que adaptarse y sobrevivir. Sin embargo, estos procesos no ocurren aisladamente, las plantas se ven sometidas simultáneamente a diferentes estreses. Además el estrés afecta también a los procesos de desarrollo de las plantas. Entender cómo interaccionan los distintos procesos de señalización celular tiene gran interés y relevancia por su aplicación práctica en la biotecnología de plantas. El interés de este trabajo se centra en estudiar cómo la modificación de componentes mediadores de la respuesta de defensa de la planta de arroz frente a patógenos puede afectar la adaptación a otros estreses ambientales, como la sequía, y el desarrollo y la productividad de la planta. Con este propósito y en

base a resultados previos en el grupo de investigación, se ha seleccionado una proteína CPK y miRNAs como reguladores de los procesos de señalización celular para estudiar las respuestas de las plantas de arroz a su entorno.

Objetivos

Objetivos

El **objetivo general** de esta tesis es la caracterización funcional de la proteína OsCPK13 y algunos miRNAs en la respuesta de defensa de las plantas de arroz frente al hongo *M. oryzae* y frente a otras condiciones adversas del entorno. Específicamente, en el transcurso de la realización de los trabajos relacionados a OsCPK13 y su papel en la respuesta de defensa, se han encontrado evidencias de que esta proteína podría ser responsable de la acumulación de fósforo en la parte aérea de la planta de arroz, por lo se propuso caracterizarla frente a diferentes condiciones de fertilización fosfatada. Además, luego de la selección de los miRNAs con los cuales se decidió trabajar por su posible implicancia en la respuesta inmune del arroz, se caracterizó su participación frente a estrés hídrico. La tesis se ha estructurado en dos capítulos, uno enfocado en OsCPK13 y el otro en los miRNAs, cuyos **objetivos específicos** han sido los siguientes:

Capítulo I:

1. Caracterización funcional de OsCPK13 en la respuesta de defensa de arroz.
2. Caracterización funcional de OsCPK13 frente a fertilización fosfatada en plantas de arroz.

Capítulo II:

1. Identificación y selección de miRNAs con acumulación alterada durante la respuesta inmune de arroz.
2. Identificación de las dianas de los miRNAs seleccionados.
3. Caracterización de los perfiles de acumulación de los miRNAs seleccionados durante la respuesta de defensa y frente a estrés hídrico.
4. Caracterización funcional de los miRNAs osa-miR390, osa-miR397 y osa-miR1319a en la respuesta inmune y frente a estrés hídrico en plantas de arroz.

Capítulo I

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN OsCPK13 EN LA RESPUESTA DE DEFENSA Y LA FERTILIZACIÓN FOSFATADA EN LAS PLANTAS DE ARROZ

Antecedentes

Con el objetivo de identificar genes que potencialmente participen en la respuesta de defensa de la planta de arroz, previamente se realizó en el grupo de investigación un análisis transcriptómico global mediante micromatrices (o *microarrays*) de hojas de arroz, que habían sido tratadas con elicitores del hongo fitopatógeno *M. oryzae* (Campo *et al.*, 2013). Entre los genes diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento con elicitores se identificaron varios genes *CPKs*. En la Tabla 3 se muestran los genes *OsCPKs* que presentaron cambios de expresión significativos a los 30 minutos y a las 2 horas del tratamiento. Entre los genes identificados se encuentra el gen *OsCPK13* (LOC_Os04g49510) que muestra un incremento de 1,55 veces a las 2 horas de tratamiento con elicitores. Teniendo en cuenta que la respuesta a elicitores fúngicos en plantas es normalmente muy rápida (en el orden de minutos luego del tratamiento) (Coca & San Segundo, 2010; Denoux *et al.*, 2008), se podría inferir que la inducción de *OsCPK13* es más bien una respuesta tardía.

Tabla 3. Expresión diferencial de genes *OsCPK* en respuesta a elicitores de *M. oryzae*. Análisis *microarrays* (GeneChip® *rice genome array* de Affymetrix™) de hojas de arroz cultivar Nipponbare sometidas al tratamiento con elicitores de *M. oryzae* durante 30 minutos o 2 horas (Campo *et al.*, 2013). **(a)** Cambio de expresión génica (tratamiento con elicitores vs tratamiento con solución control). **(b)** Valor estadístico de la probabilidad de falsos positivos. Sólo se indican en la tabla los genes *OsCPK* con que muestran cambios de expresión significativos (criterio: FC ≥ 1.2; p ≤ 0.05).

Expresión diferencial de genes *OsCPK* en respuesta a elicitores de *M. oryzae*				
	Gen	Locus	FC: Cambio en la expresión [a]	p-valor [b]
30 min	*OsCPK3*	LOC_Os01g61590	+1,28	0,047
	OsCPK4	LOC_Os02g03410	+1,23	0,027
	OsCPK5	LOC_Os02g46090	+1,56	0,000
	OsCPK10	LOC_Os03g57540	+1,32	0,031
	OsCPK18	LOC_Os07g22710	+1,16	0,043
	OsCPK24	LOC_Os11g07040	+1,20	0,022
2 hs	*OsCPK4*	LOC_Os02g03410	+,194	0,000
	OsCPK13	LOC_Os04g49510	+1,55	0,010
	OsCPK22	LOC_Os09g33910	+1,16	0,043
	OsCPK27	LOC_Os12g30150	+1,27	0,004

Estos cambios en la expresión del gen *OsCPK13* sugieren que podría estar implicado en la defensa ante el ataque por patógenos, además de su ya descrita participación en la adaptación de las plantas de arroz a sequía, salinidad y frío (Saijo *et al.*, 2000). Por este motivo se decidió caracterizar funcionalmente el gen *OsCPK13* mediante aproximaciones de ganancia y pérdida de función. Para ello se utilizaron líneas transgénicas de arroz transformadas con vectores de expresión en plantas diseñados para la sobreexpresión de *OsCPK13* (ganancia de función) y silenciamiento de *OsCPK13* mediante la sobreexpresión de un microRNA (miRNA) artificial (pérdida de función).

Estas líneas estaban disponibles al comienzo de este trabajo de tesis doctoral. Se habían generado en el fondo genético de la variedad Nipponbare de arroz (*O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare) vía Agrobacterium. Las líneas generadas habían sido transformadas con las construcciones que se presentan en la Figura 11. Se habían obtenidos líneas para la expresión del cDNA *OsCPK13* bajo el control del promotor fuerte y constitutivo del gen *Ubiquitin* (*Ubi*) del maíz (Figura 11A). También líneas portadoras de una construcción para la expresión de un miRNA artificial (amiRNA) cuya diana es el tránscrito de *OsCPK13* (región 3´ no traducida, 3' UTR). El amiRNA está basado en el precusor *osa-MIR528* y se diseñó usando la herramienta informática *Web MicroRNA Designer* (WMD3- http://wmd3.weigelworld.org). La expresión del amiRNA está también bajo el control del promotor *Ubi* y terminador *Nos* (Figura 11B). Como controles se disponían de líneas transgénicas transformadas con un vector que contenía el promotor *Ubi* y terminador *Nos*, pero sin ningún gen bajo su control (Figura 11C); o con el vector vacío (pCAMBIA1300) simplemente con el gen de selección (Figura 11D). El gen de selección contenido en la región del T-DNA de todas las construcciones confiere resistencia al antibiótico higromicina.

También se disponía de líneas transgénicas portadoras de una construcción diseñada para estudiar la expresión del promotor *OsCPK13*. Estas líneas habían sido generadas en la variedad de arroz Ariete (*O. sativa* ssp *japonica* cv. Ariete), y contenían la

construcción mostrada en la Figura 11E. La construcción contiene la región promotora del gen *OsCPK13* (2 kb antes del inicio de la transcripción) fusionada transcripcionalmente al cDNA del gen reportero de la β-glucuronidasa (*GUS*) y el terminador *Nos*.

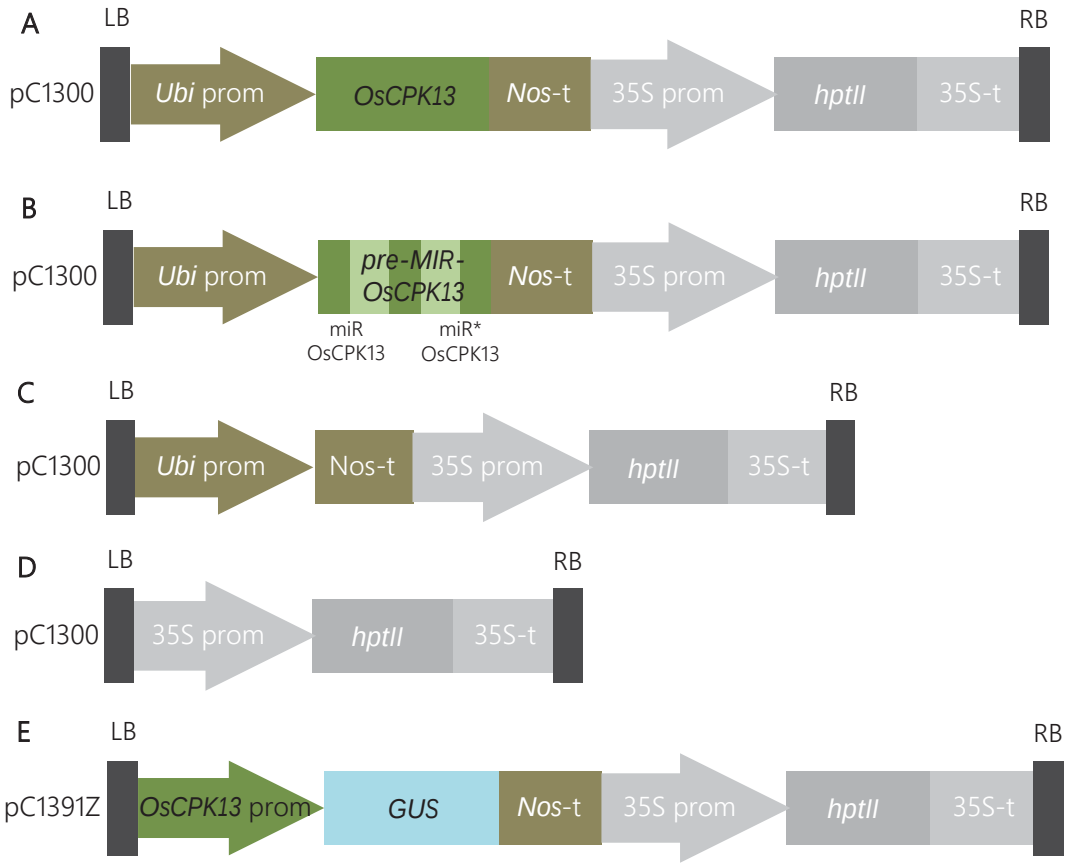

Figura 11. Representación esquemática de las construcciones utilizadas en los estudios relacionados con *OsCPK13*. A. Vector de sobreexpresión de *OsCPK13*. Construcción que contiene el cDNA completo del gen *OsCPK13* (AK061881) bajo el control del promotor del gen *Ubiquitin1* de maíz (*Ubi* prom) y el terminador del gen de la Nopalina Sintasa (*Nos*-t). **B.** Vector de expresión de un miRNA artificial cuya diana es el mRNA *OsCPK13*. La construcción contiene un precursor artifical de miRNA basado en *osa-MIR528* y diseñado con el programa bioinformático *Web MicroRNA Designer* (WMD3- http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi). El precursor está bajo el control del promotor *Ubi* y el terminador *Nos*. **C.** Vector vacío con el promotor de *Ubi* y el terminador *Nos*. **D.** Vector vacío solo con el gen de selección. **E.** Vector diseñado para el análisis de expresión del promotor *OsCPK13* que dirige la expresión del gen reportero de la β-glucuronidasa (*GUS*). Todos los vectores contienen además dentro del T-DNA el gen de resistencia a higromicina (*hptII*) bajo el control del promotor y el terminador 35S del CaMV. Las construcciones A-D se encuentran insertas dentro del plásmido pCAMBIA1300 y la construcción E dentro del plásmido pCAMBIA1391Z.

Estas plantas transgénicas disponibles en el grupo se utilizaron como herramientas para abordar los estudios desarrollados en este trabajo de tesis doctoral con relación a la caracterización del gen *OsCPK13* y su rol en las respuestas de defensa de las plantas de arroz y ante la fertilización fosfatada.

Resultados

1. Caracterización de la expresión del gen *OsCPK13*

Para caracterizar la función del gen *OsCPK13*, es importante conocer su patrón de expresión. Con este fin se realizó un análisis de expresión génica consultando los datos disponibles en las bases de datos, un análisis mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en tejidos foliares y radiculares y un estudio de la actividad del promotor.

Se ha realizado una búsqueda en la plataforma bioinformática de base de datos Genevestigator (http://www.genevestigator.com) sobre la expresión génica de *OsCPK13* en diferentes tejidos y estadíos de la planta de arroz. Los datos obtenidos a partir de los análisis de *microarrays* publicados muestran que *OsCPK13* se expresa en todos los estadíos de desarrollo de la planta, aunque los niveles de expresión son inferiores durante la floración (Figura 12A); y que también mantiene un nivel de expresión similar en los distintos órganos de la planta, como en las raíces, hojas e inflorescencias (Figura 12B).

El análisis de expresión del gen *OsCPK13* realizado en este trabajo mediante qRT-PCR muestra una acumulación de tránscritos similar en la parte aérea y en las raíces de plantas arroz jóvenes de 14 días (Figura 12C). Los niveles de acumulación son ligeramente más altos en raíces en comparación con la parte aérea de la planta, aunque las diferencias no son significativas. Estos resultados indican que el gen se expresa tanto en la parte aérea como en la raíz de plantas jóvenes de arroz, estadío del desarrollo de mayor susceptibilidad a la infección por el hongo patógeno *M. oryzae*.

El análisis *in silico* del promotor del gen *OsCPK13* en las plataformas bioinformáticas PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) y PLACE (Higo *et al.*, 1999) muestra la presencia de elementos regulatorios en cis (Figura 13A). Se han encontrado varios

elementos de respuesta a patógenos (ACAGT, GCCGCC), a elicitores (CTGACC, ACCTCC) y a las hormonas de defensa SA (TAGTCTTCTC) y JA (AACGTG). También se encontraron varias cajas de respuesta a deshidratación y ABA (CAGTTG, CTTACGTGC, GCCGAC, entre otros), y a frío (CCGAAA), situaciones ambientales en las que ya se había probado la implicancia de gen *OsCPK13* (Saijo *et al.*, 2000). No se han encontrado elementos regulatorios relacionados con la respuesta a fosfatos.

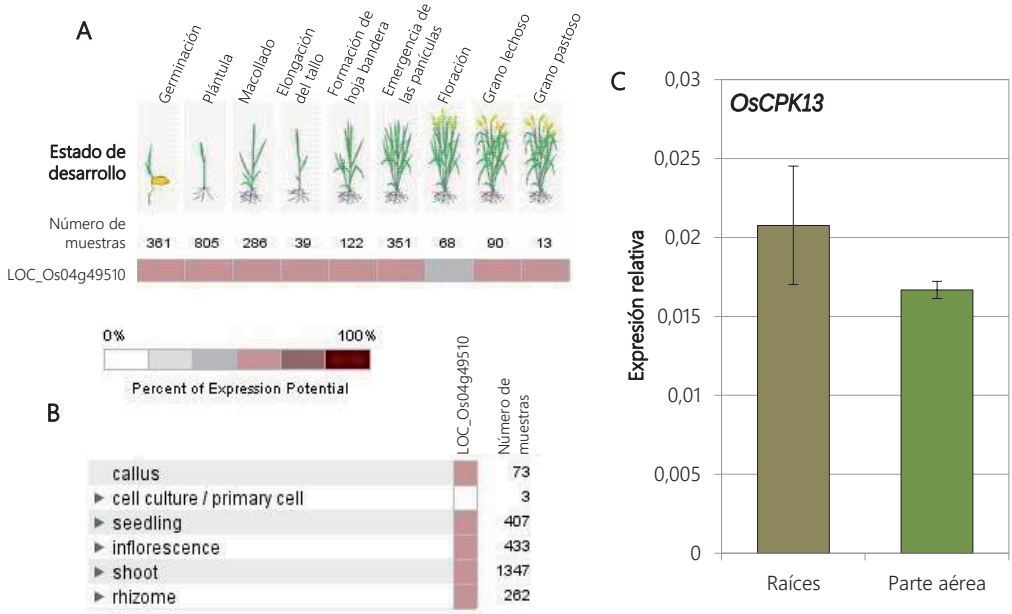

Figura 12. Expresión del gen *OsCPK13* en diferentes estadíos y tejidos de las plantas arroz. Datos de la expresión del gen *OsCPK13* (LOC_Os04g49510) en diferentes estados del desarrollo **(A)** y en diferentes tejidos **(B)** de la planta de arroz. Datos e imágenes tomadas de la base de datos Genevestigator (www.genevestigator.com). Los niveles de expresión representan la intensidad de señal obtenidos para la sonda específica de *OsCPK13* (Os.282.2.S1_a_at) en los análisis de micromatrices publicados (*rice genome array* de Affymetrix™). **C.** Análisis mediante qRT-PCR de tejidos radiculares y aéreos (hojas + tallos) de al menos 3 plantas de arroz (cv. Nipponbare) crecidas durante 14 días en medio hidropónico nutritivo Yoshida en condiciones controladas de luz y temperatura. Se muestran los valores de expresión media del gen *OsCPK13* (LOC_Os04g49510) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 3 réplicas experimentales.

El estudio de la actividad del promotor del gen *OsCPK13* se realizó utilizando las líneas transgénicas portadoras de la construcción prom*OsCPK13:GUS*, que expresan el gen marcador *GUS* bajo el control del promotor de *OsCPK13*. La expresión del gen *GUS* puede ser visualizada mediante un ensayo histoquímico. El mismo consiste en la

degradación del sustrato X-Gluc a un compuesto de color azul, mediante la acción de la enzima β-glucuronidasa, codificada por el gen *GUS*. La tinción azul permite determinar la localización espacial de la actividad del promotor en la planta. El ensayo se realizó utilizando plantas T3 homocigotas de 14 días crecidas en cultivo hidropónico. Los resultados se muestran en la Figura 13B-D, donde se observa la tinción azul marcadora de la presencia de la enzima β- glucuronidasa tanto en la parte aérea como en las raíces de las plantas. En la parte aérea se pudo ver que existen diferencias notorias de tinción entre tejidos de nueva formación y tejidos viejos. Como se muestra en la Figura 13B, las hojas antiguas no muestran tinción azul, indicador de la ausencia de la enzima (izquierda), a diferencia de las hojas jóvenes (derecha). Este patrón de tinción se ha visto en la mayoría de las muestras analizadas. Las hojas jóvenes son las más vulnerables al ataque por patógenos y es en ellas donde el promotor *OsCPK13* se expresa preferencialmente. Aparentemente, en tejidos radiculares, la expresión del gen *GUS* por parte del promotor de *OsCPK13* es mayor en las puntas de las raíces (Figura 13C). Esta distribución de la tinción azul en raíces guarda similitud con los resultados observados en tejidos foliares, ya que las puntas radiculares son los tejidos más jóvenes. Se resalta que en cortes transversales de raíces se observa actividad β-glucuronidasa específicamente en los haces vasculares (Figura 13D).

Los resultados obtenidos muestran que el promotor *OsCPK13* es funcionalmente activo tanto en raíces como en hojas de plántulas de arroz a niveles similares. Estos resultados se corresponden con la expresión transcripcional de *OsCPK13* previamente observada (Figura 12C). La actividad promotora se observa con más intensidad, principalmente en tejidos de nueva formación y en tejidos vasculares.

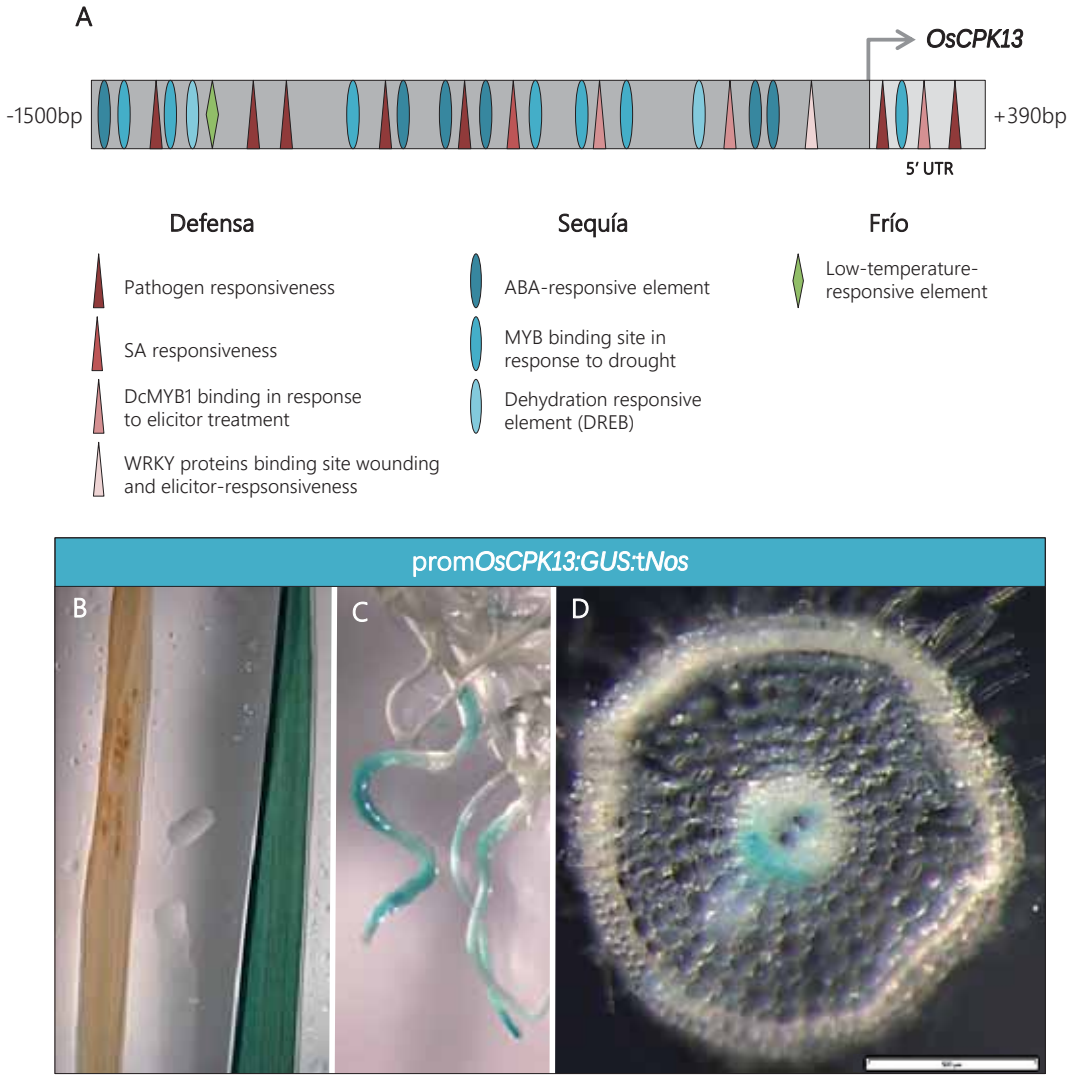

Figura 13. Actividad del promotor de *OsCPK13* en tejidos de arroz. A. Elementos regulatorios encontrados en la secuencia de la región promotora de OsCPK13. Se tomaron las secuencias de los 1500 pb antes del inicio de la transcripción y la secuencia de 5'UTR del gen *OsCPK13*. Las secuencias se analizaron en las plataformas en bioinformáticas *en línea* PlantCARE y PLACE. Sólo se indican los elementos relacionados con las respuestas en las que *OsCPK13* ya ha sido descrita (sequía, frío) y aquellos relevantes para los estudios realizados en este trabajo (defensa y fosfatos). **B-D.** Ensayos de actividad β-glucuronidasa en plantas de arroz portadoras de la construcción prom*OsCPK13:GUS*:t*Nos.* Fotos de hojas viejas (izquierda) y jóvenes recién emergidas (derecha) **(B)**, de raíces enteras **(C)** y de un corte transversal de raíz **(D)** de plantas de 14 días crecidas en medio hidropónico nutritivo Yoshida en condiciones controladas de luz y temperatura, donde se observa la tinción en haces vasculares. Datos representativos de 3 réplicas biológicas. Fotos tomadas con el estereomicroscopio acoplado a una cámara digital. La barra de escala corresponde a 500 µm.

2. Estudio de la localización subcelular de la proteína OsCPK13

La localización subcelular de una proteína es un importante determinante de su función. Es por ello que para caracterizar funcionalmente OsCPK13 es relevante conocer su localización, para lo cual se realizó un estudio de la localización subcelular de la proteína OsCPK13 en ensayos de expresión transitoria de proteínas de fusión fluorescentes y visualización mediante microscopía confocal.

2.1 Obtención de vectores para la expresión de *OsCPK13* fusionado a proteínas fluorescentes

Para llevar a cabo los estudios de expresión transitoria se prepararon vectores de expresión en planta basados en los plásmidos pGWB541 y pGWB544, amablemente cedidos por el Dr. Nakagawa (Nakagawa *et al.*, 2007). Estos vectores permiten la expresión de proteínas de fusión a las proteínas fluorescentes CFP (*Cian Fluorescent Protein*) y YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), respectivamente. La expresión de las fusiones está dirigida por el promotor constitutivo CaMV35S. El sistema de clonación de estos vectores está basado en la tecnología Gateway®. Se ha optado por este tipo de clonaje por ser relativamente rápido y por tener una alta eficiencia, debido a que permite seleccionar sólo las células de *E. coli* cepa DH5α que hayan incorporado el plásmido recombinado, ya que los plásmidos no recombinados contienen el gen letal *ccdB*.

Ambas construcciones para la producción de proteínas fusión se realizaron con la proteína fluorescente en posición C-terminal de OsCPK13, para evitar posibles interferencias con las señales de miristoilación localizadas en el dominio N-terminal de OsCPK13. La secuencia de la proteína OsCPK13 se analizó utilizando la plataforma bioinformática Myristoylator (http://web.expasy.org/myristoylator/) que mostró la presencia de un potencial sitio de miristoilación (MGNACGG, en la posición 2 de la proteína, Figura 14) con un puntaje de 0,96 con una alta confianza de probabilidades de ocurrencia. La miristoilación de proteínas es determinante de su anclaje a membranas y

de la correcta localización subcelular, como se ha demostrado para otras proteínas CPKs (Asai *et al.*, 2013; Campos-Soriano *et al.*, 2011; Coca & San Segundo, 2010). Por lo tanto, esta disposición es más favorable para mostrar la correcta localización de la proteína OsCPK13.

En la Figura 14 se muestra un esquema del proceso seguido para la obtención de las construcciones. En primer lugar se obtuvo el cDNA codificante para la proteína OsCPK13 por retrotranscripción de una población de mRNAs de raíces de plántulas de arroz de 30 días crecidas en cultivo hidropónico. La amplificación del cDNA se realizó con cebadores específicos diseñados para eliminar el codón de parada e introducir las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción en los extremos 5' (BamHI) y 3' (XhoI). El producto de amplificación se clonó por T/A en un vector de transición (pGEM-TEasy®, Promega™), para luego clonarlo en un vector pENTR3C de tecnología Gateway® por los sitios de restricción BamHI y XhoI. El vector pENTR3C contiene secuencias de recombinación homóloga attL que permitió clonar mediante una reacción de recombinación LR de Gateway® en los vectores pGWB541 y pGWB544 que contienen los sitios de recombinación attR (Nakagawa *et al.*, 2007). La identidad de las secuencias de los vectores así obtenidos, especialmente en la zona de fusión, fue verificada mediante secuenciación. De esta forma se obtuvieron los vectores de expresión en plantas de las proteínas OsCPK13-CFP y OsCPK13-YFP.

2.2 Localización subcelular de OsCPK13

El estudio de la localización subcelular de OsCPK13 se realizó en el sistema de expresión transitoria basado en la infiltración de células foliares de *Nicotiana benthamiana* con una suspensión de células de *A. tumefaciens* portadoras de los vectores con las construcciones codificantes para las proteínas de fusión fluorescentes (pGWBOsCPK13YFP o pGWBOsCPK13CFP). Se agroinfiltraron hojas jóvenes de *N. benthamiana* mutante en el gen *RdR6*. La proteína RdR6 (*RNA-dependent RNA polymerase 6*) está implicada en el silenciamiento génico de RNAs exógenos (Schwach *et*

al., 2005). Así, estas plantas tienen bloqueada la maquinaria de silenciamiento y permiten la expresión de transgenes. Luego de 48 horas de la agroinfiltración se analizó la localización de las proteínas fusión bajo microscopía confocal. Imágenes representativas de los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15.

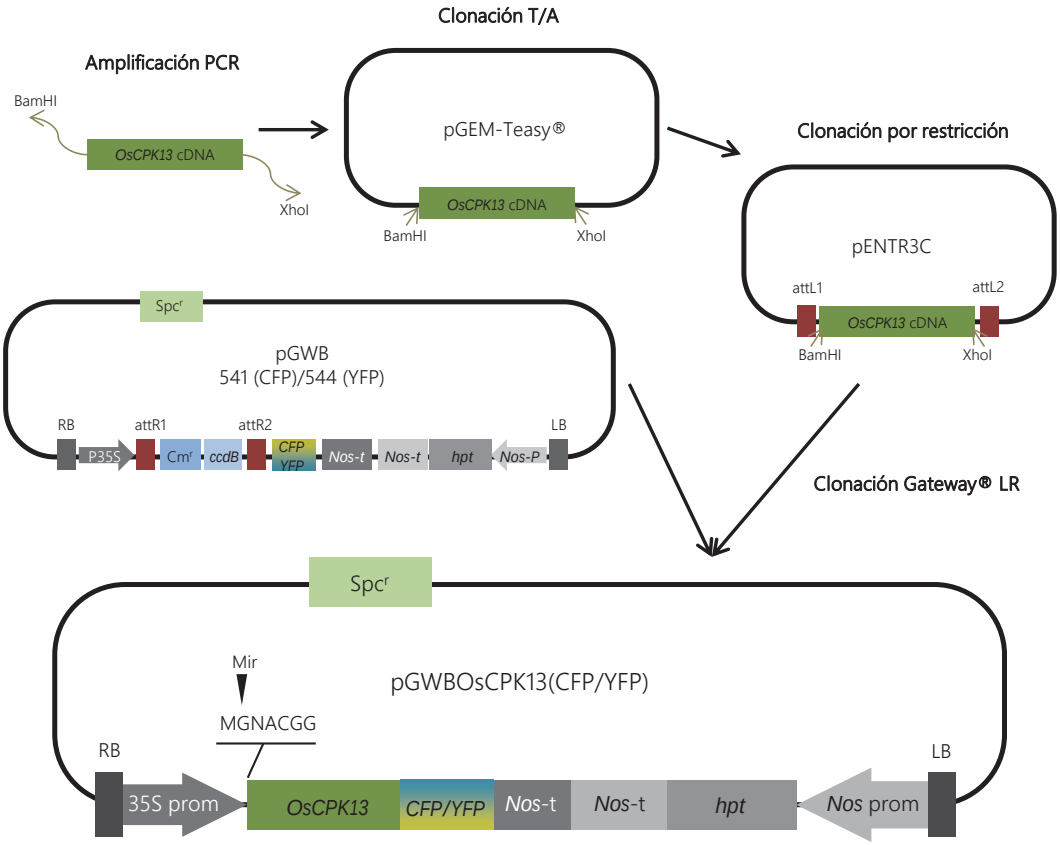

Figura 14. Esquema de la preparación de los vectores para la expresión en plantas de las proteínas de fusión fluorescentes OsCPK13-YFP y OsCPK13-CFP. Amplificación por PCR del cDNA OsCPK13 sin incluir el codón de parada e incorporando los sitios de restricción indicados. Clonación del producto de PCR en el vector pGEM-T mediante el sistema de clonación T/A. Clonación del fragmento de restricción BamHI-XhoI del pGEM-T:OsCPK13 en el vector intermedio pENTR3C. Clonación mediante recombinación entre pENTR3C:OsCPK13 a los vectores pGWB541 y pGWB544 para generar los vectores: pGWBOsCPK13-CFP y pGBOsCPK13-YFP. En ambos vectores, la expresión de los genes codificantes de las proteínas de fusión OsCPK13-CFP o OsCPK13-YFP está dirigida por promotor 35S. Se muestra en detalle la secuencia N-terminal de OsCPK13 correspondiente al sitio de miristoilación de la proteína predicho en la plataforma bioinformática Myristoylator (Score: 0,96). *Nos*: nopalina sintasa; *hpt*: gen de resistencia a higromicina; 35S: promotor del virus del mosaico del coliflor; Spc: gen de resistencia a espectinomicina.

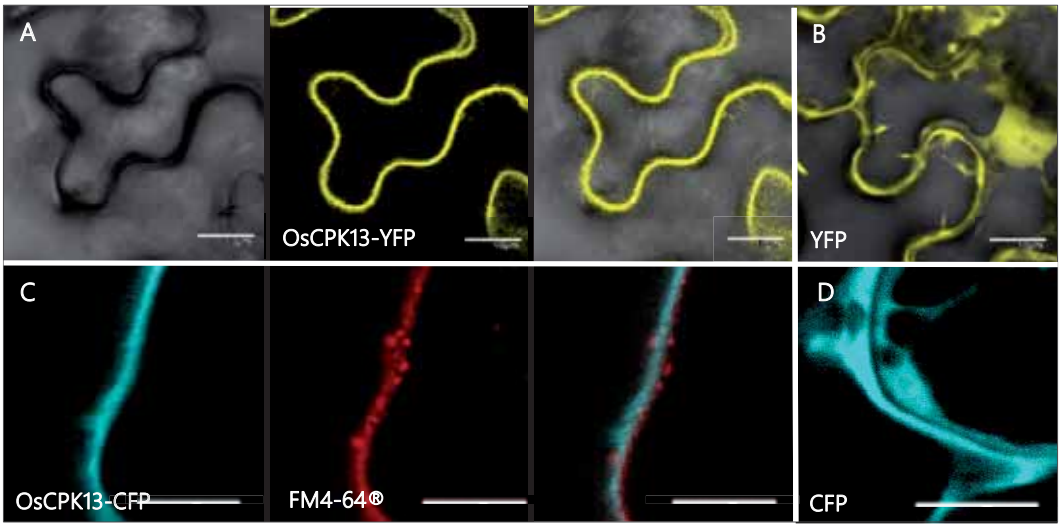

Figura 15. Localización subcelular de OsCPK13. Imágenes de microscopía confocal secciones simples en un solo plano que muestran la localización subcelular de proteínas fusión OsCPK13-YFP y OsCPK13-CFP en células foliares de *N. benthamiana RdR6*. Las células fueron transformadas transitoriamente mediante agroinfiltración de células de *A. tumefaciens* portadoras de los vectores pGWBOsCPK13YFP **(A)**, pGWBOsCPK13CFP **(C)** y vectores de expresión constitutiva de YFP **(B)** y de CFP **(D)**. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de ser agroinfiltradas. **A.** Imágenes del canal de transmisión (panel izquierdo), de fluorescencia en el canal amarillo (panel central), y de superposición de ambos canales (panel derecho) **B.** Imagen de superposición del canal de transmisión y de fluorescencia en el canal amarillo. **C.** Imágenes de fluorescencia en el canal azul (panel izquierdo), de fluorescencia en el canal rojo (panel central), y de superposición ambos canales. En este caso la hoja fue además infiltrada con el compuesto fluorescente FM4-64 (rojo) marcador de membrana plasmática a una concentración 5 µM durante 5 min. **D.** Imagen de fluorescencia en canal azul. Las barras de escala corresponden a 10 µm (A-C), 5 µm (D).

Las imágenes muestran que la fluorescencia tanto de la proteína OsCPK13-YFP (Figura 15A) como de la OsCPK13-CFP (Figura 15C) se localiza en la periferia celular, probablemente coincidiendo con la membrana plasmática, y claramente diferente de la localización citoplasmática de la YFP (Figura 15B) y de la CFP (Figura 15D). Para confirmar que esta localización se corresponde con la membrana plasmática, hojas agroinfiltradas con el vector pGWBOsCPK13CFP se trataron con una solución de FM4-64®, un compuesto fluorescente lipofílico que se adhiere a la membrana plasmática (Van Leeuwen *et al.*, 2007). Las imágenes muestran que la fluorescencia de FM4-64 (en rojo) colocaliza con la fluorescencia de la proteína OsCPK13-CFP (azul) (Figura 15C), indicando que la proteína OsCPK13 se localiza en la membrana plasmática.

3. Caracterización de las líneas transgénicas con expresión alterada del gen *OsCPK13*

Al inicio de este trabajo se disponía de plantas transgénicas de arroz que habían sido transformadas con una construcción diseñada para la sobreexpresión de *OsCPK13* (*OsCPK13*-Ox) o con una construcción diseñada para silenciar la expresión de *OsCPK13* mediante la expresión de un amiRNA (*OsCPK13*-Kd). Estas líneas no habían sido caracterizadas molecularmente, y por tanto antes de usarlas para la caracterización funcional de *OsCPK13* era necesario determinar los niveles de expresión de *OsCPK13* y de acumulación de la correspondiente proteína.

La acumulación de tránscritos de *OsCPK13* se analizó en hojas de plantas adultas de 90 días de las líneas *OsCPK13*-Ox y controles. Se tomaron muestras para la síntesis de cDNA a partir de la población de mRNAs de los tejidos foliares. La cuantificación de la expresión se realizó mediante qRT-PCR utilizando cebadores específicos para la región 5' del tránscrito de *OsCPK13*. Los resultados dan cuenta de que todas las líneas *OsCPK13*-Ox analizadas presentan mayor expresión de *OsCPK13* a nivel transcripcional, comparadas con la variedad silvestre (Wt) y líneas del vector vacío (Ev) (Figura 16A).

Por análisis *Northern blot* y utilizando una sonda específica para el tránscrito del gen *OsCPK13* (fragmento correspondiente a la región N-terminal de la proteína) se examinaron los niveles de acumulación en las líneas *OsCPK13*-Kd. Estas líneas expresan un miRNA artificial específico frente a las secuencias 3' UTR del mRNA *OsCPK13* (Figura 16B). Según se muestra en la Figura 16C, estas líneas tienen disminuidos los niveles de acumulación del transcrito *OsCPK13* en comparación con las líneas transformadas con el vector vacío y las plantas silvestres no transformadas.

Por otra parte, se crecieron plántulas de las líneas de expresión diferencial de *OsCPK13* y controles durante 7 días en condiciones de esterilidad *in vitro* y bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Se tomaron muestras de tejido radicular

para la extracción de proteínas totales y se realizó un análisis *Western blot* para evaluar los niveles de acumulación de la correspondiente proteína. Para la detección de la proteína OsCPK13 se utilizó un anticuerpo específico para la región N-terminal, previamente producido en conejos. Los niveles de acumulación de la proteína OsCPK13 tanto en las líneas de ganancia como de pérdida de función, se corresponden con la expresión transcripcional observada. Las líneas *OsCPK13*-Ox presentan niveles más altos de la proteína OsCPK13 mientras que las líneas *OsCPK13*-Kd acumulan menos, en comparación con las líneas controles transformadas con el vector vacío o sin transformar (Figura 16D).

Los resultados obtenidos con estos análisis confirman que las líneas *OsCPK13*-Ox sobreexpresan eficientemente *OsCPK13* y acumulan niveles más altos de la correspondiente proteína, mientras que las líneas *OsCPK13*-Kd son efectivas en el procesamiento y degradación de los tránscritos de *OsCPK13* y presentan niveles de acumulación más bajos de la correspondiente proteína.

No se han observado efectos aparentes en el fenotipo de las plantas de las líneas *OsCPK13*-Ox ni *OsCPK13*-Kd, crecidas en condiciones de hidroponía o en tierra durante 30 días, comparadas con la variedad silvestre no transformada y líneas transgénicas del vector vacío. En este trabajo se pudieron obtener T3 homocigotas de las líneas *OsCPK13*-Kd, sin embargo, no fue posible para las líneas *OsCPK13*-Ox. Las plantas que sobreexpresan *OsCPK13* en homocigosis tienen un fenotipo letal. Es necesario mencionar que las plantas adultas de estas líneas hemicigotas presentan un fenotipo de "*lesion mimic*" en las hojas adultas principalmente (Figura 17). Estas lesiones surgen espontáneamente y no son debidas a infección por patógenos ni a respuestas a condiciones de luz (datos no mostrados). Esta observación fue determinante para iniciar los estudios de respuesta a fertilización fosfatada que se describirá más adelante. En este trabajo, por lo tanto, se han utilizado líneas T3 hemicigotas de estas líneas.

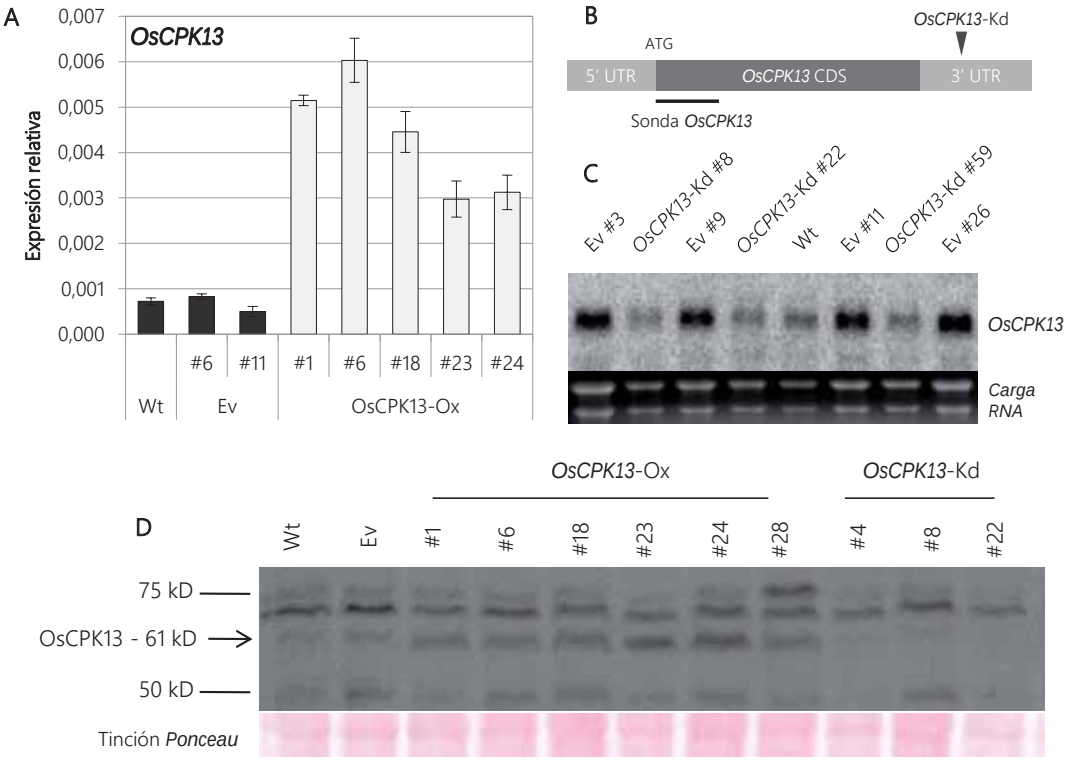

Figura 16. Caracterización molecular de las líneas transgénicas *OsCPK13*-Ox y *OsCPK13*-Kd. A. Análisis de la expresión de *OsCPK13* (LOC_Os04g49510) mediante qRT-PCR en las plantas de arroz no transformadas (WT), transformadas con el vector vacío (EV) y sobreexpresoras de *OsCPK13* (*OsCPK13*-Ox). Los números indican líneas independientes. Las muestras se tomaron de hojas jóvenes de plantas de 90 días crecidas en tierra bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. La expresión del gen *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) fue utilizada como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los resultados son representativos de 2 réplicas experimentales **B.** Esquema del mRNA *OsCPK13* indicando el fragmento utilizado como la sonda en la hibridación por *Northern blot* y el sitio de corte del miRNA artificial. **C.** *Northern blot* de plantas de las líneas *OsCPK13*-Kd. La membrana fue hibridada con una sonda específica para el tránscrito *OsCPK13*. **D.** Acumulación de la proteína OsCPK13 analizada por *Western blot*. Cantidades equivalentes de extractos proteicos de fracciones enriquecidas en membrana obtenidas de raíces de plantas de 7 días crecidas en cultivo *in vitro* en medio MS sólido de las líneas indicadas, se separaron mediante SDS-PAGE (10% A/B). Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se inmuno-detectaron utilizando anticuerpos específicos frente al dominio N-terminal específico para la proteína OsCPK13. La reacción se detectó mediante quimioluminiscencia. El panel inferior corresponde a la tinción con rojo Ponceau (*Rubisco*) como control de carga.

Figura 17. Fenotipo de las plantas *OsCPK13*-Ox. Aparición de lesiones necróticas espontáneas en las hojas. **A.** Apariencia fenotípica de plantas adultas de las líneas *OsCPK13*-Ox crecidas en tierra en invernadero y bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. **B.** Detalle de las lesiones espontáneas observadas en las hojas viejas de plantas adultas *OsCPK13*-Ox.

4. Caracterización de OsCPK13 en la respuesta de defensa de la planta de arroz

4.1 Respuesta de *OsCPK13* a infección por *M. oryzae*

Las respuestas de las plantas frente a elicitores fúngicos son aproximaciones para predecir lo que ocurre frente al reconocimiento del hongo fitopatógeno cuando inicia el proceso infectivo. Sin embargo, en tal caso, las respuestas de la planta no van más allá del reconocimiento de los PAMPs y el desencadenamiento de la respuesta PTI. Las respuestas específicas frente al proceso infectivo, como las respuestas ETI, no ocurren cuando la planta es expuesta a elicitores. Por lo tanto, el sistema ideal para observar estas respuestas, es el de la interacción directa de la planta con el agente patógeno. En este trabajo se caracterizó la respuesta de OsCPK13 frente a la infección por *M. oryzae*.

Se realizaron ensayos de infección de plantas de arroz mediante la inoculación de suspensiones de esporas del aislado Guy11 de *M. oryzae* y se tomaron muestras de la parte aérea de esas plantas y de plantas controles no inoculadas. Por análisis *Western blot* se analizaron los niveles de acumulación diferencial de la proteína OsCPK13 en respuesta a infección por *M. oryzae*, utilizando para la detección un anticuerpo

específico para la región N-terminal de la proteína. Los resultados muestran que aparentemente esta proteína sufre pocos cambios en su acumulación en respuesta a infección por este patógeno, excepto a las 24 horas post-infección (Figura 18A). Se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas específicas para OsCPK13 mediante el programa informático de análisis de imágenes MultiGauge v2.0 y se pudo constatar una acumulación mayor de OsCPK13 luego de 24 horas de iniciada la infección por *M. oryzae*, comparada con las condiciones control (Figura R18B). Estos resultados podrían indicar que OsCPK13 tiene una respuesta tardía en respuesta a infección por *M. oryzae*.

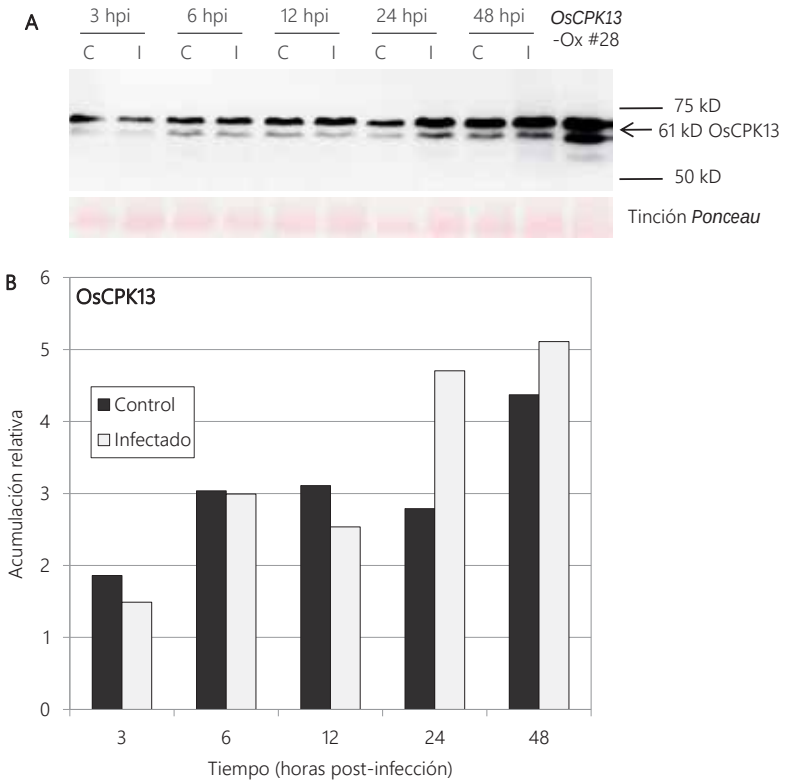

Figura 18. Acumulación de la proteína OsCPK13 en respuesta a infección por *M. oryzae*. A. Análisis mediante *Western blot* de cantidades equivalentes de extractos proteicos de fracciones enriquecidas en membrana, obtenidas de la parte aérea (hojas y tallos) de plantas de arroz (Nipponbare) inoculadas con una solución de esporas de *M. oryzae* Guy11 (10^5 esporas/ml) (I) o con agua estéril (C). Las muestras fueron tomadas a los diferentes tiempos indicados post-inoculación. Muestras de plantas de la línea sobreexpresoras de *OsCPK13* #28 se incluyeron como control positivo. La inmunodetección se realizó con anticuerpos específicos frente a la región N-terminal de OsCPK13 a una dilución 1/1000 y revelado quimoluminiscente. **B.** Cuantificación de la intensidad de la banda mediante análisis de imágenes utilizando el programa Multi Gauge de Fuji™ v2.0, relativa a la banda de tinción con rojo Ponceau (*Rubisco*) utilizada como referencia de carga.

4.2 Fenotipo de líneas de expresión alterada de *OsCPK13* frente a infección

La proteína OsCPK13 se ha visto acumulada en plantas de arroz tratadas con *M. oryzae*, y este hecho puede indicar que altos niveles de la misma podrían ser necesarios para que las plantas puedan defenderse ante el ataque del patógeno. Las plantas de las líneas de ganancia (*OsCPK13*-Ox) y pérdida (*OsCPK13*-Kd) de la función de OsCPK13 representan herramientas idóneas para la caracterización funcional de esta proteína en la respuesta de defensa de las plantas de arroz. Por ello se decidió analizar el fenotipo de estas líneas frente a infección por el patógeno de arroz *M. oryzae*.

Los ensayos de infección se realizaron con plantas enteras crecidas en tierra, aunque debido a que las líneas OsCPK13-Ox eran hemicigotas, hubo que seleccionarlas creciéndolas en cultivo *in vitro* en presencia del antibiótico (higromicina) cuya resistencia está codificada en el T-DNA durante 7 días y después trasplantarlas a tierra. En paralelo se cultivaron los controles del vector vacío y las líneas *OsCPK13*-Kd. Las plantas fueron inoculadas con el aislado FR13 de *M. oryzae* incompatible con el cultivar Nipponbare de arroz. La inoculación se realizó por aspersión de una suspensión de esporas a una concentración de 10^5 esp/ml utilizando un aerógrafo a 2 atm de presión, a razón de 10 plantas por línea crecidas en una misma maceta. Las plantas se mantuvieron tras la inoculación en condiciones controladas de alta temperatura y humedad, y la progresión de la enfermedad se evaluó visualmente hasta los 7 días. En ese momento se cuantificaron las lesiones desarrolladas en la penúltima hoja emergida de cada planta mediante análisis de imágenes utilizando el programa Assess v2.0.

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos. Se presentan imágenes representativas de las lesiones desarrolladas en las hojas de las líneas analizadas. Todas las hojas desarrollan las lesiones típicas del quemado del arroz a diferencia de las hojas de la variedad resistente-R (*O. sativa* var. Saber). Estas lesiones son mayores y más abundantes en las hojas de las plantas *OsCPK13*-Ox y comparables a las desarrolladas en la variedad de arroz sensible-S (*O. sativa* var. Maratelli). Las hojas de las líneas *OsCPK13*-

Kd en cambio tienen un aspecto bastante similar al de las controles sin transformar (Nipponbare) o las transformadas con el vector vacío. La cuantificación del área lesionada mediante análisis de imágenes muestra un incremento significativo en la incidencia de lesiones en las líneas *OsCPK13*-Ox, mientras que las líneas *OsCPK13*-Kd no difieren significativamente de las controles sin transformar y de las transformadas con el vector vacío. Estos resultados indican que la sobreexpresión del gen *OsCPK13* confiere una mayor susceptibilidad a la infección por *M. oryzae* en plantas de arroz. Su silenciamiento, sin embargo, no tiene efectos visibles en el desarrollo de la infección por *M. oryzae*. Tampoco se han visto diferencias visibles en el fenotipo de las líneas *OsCPK13*-Kd en respuesta a infección por *F. verticillioides* ni por la bacteria fitopatógena *D. dadantii* comparadas con la variedad silvestre (Figura 20). La ausencia de fenotipo frente a ataque por patógenos podría ser el reflejo de que a pesar de que las líneas *OsCPK13*-Kd son efectivas en la regulación post-transcripcional de *OsCPK13*, otro miembro de la amplia familia CPK puede estar supliendo sus funciones ante la falta de la correspondiente proteína.

4.3 Producción de especies reactivas de oxígeno en las líneas *OsCPK13*-Ox

Uno de los procesos fisiológicos más importantes en respuesta a agentes patógenos es la producción de especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*-ROS), como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e iones superóxido (O_2^-) (Perez & Brown, 2014). Las moléculas ROS pueden ser tóxicas para el patógeno, provocar la respuesta hipersensible e impedir la propagación del patógeno, así como pueden ser moléculas señalizadoras de la respuesta de defensa en la planta. Sin embargo, pueden también causar daño a las células vegetales, especialmente en las membranas (Apel & Hirt, 2004; Zurbriggen *et al.*, 2010). Puesto que se había observado que las líneas *OsCPK13*-Ox desarrollaban lesiones espontáneas en las hojas, similares a la respuesta hipersensible, y este fenotipo ha sido asociado en la literatura a la alteración de la

producción de ROS (Chen *et al.*, 2013b) se analizó la producción de ROS durante la respuesta de defensa de estas plantas.

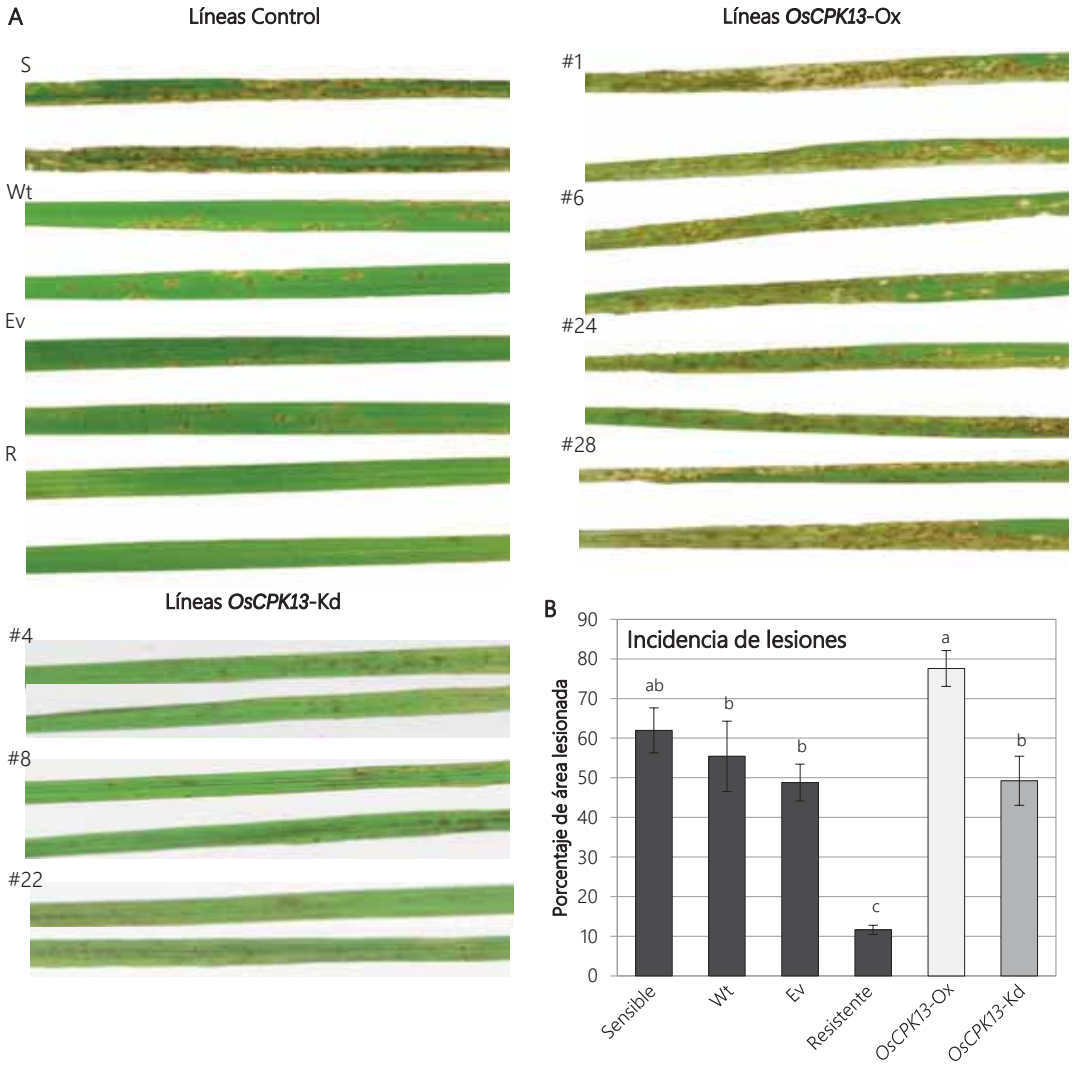

Figura 19. Fenotipo frente a infección por *M. oryzae* de las plantas transgénicas de arroz con expresión alterada de *OsCPK13*. A. Imágenes representativas de las lesiones causadas por la infección con *M. oryzae* aislado FR13 en hojas de diferentes líneas *OsCPK13*-Ox, *OsCPK13*-Kd, transformadas con el vector vacío (Ev) y controles no transformados (Wt, Nipponbare). Como controles de la infección se incluyó una variedad de arroz resistente R (*O. sativa* var. Saber) y una susceptible S (*O. sativa* var. Maratelli). Se muestra siempre la penúltima hoja emergida a los 7 días post-inoculación con una suspensión de esporas a concentración de 10^5 esporas/ml. **B.** Promedio del porcentaje del área foliar lesionada debido a la infección por *M. oryzae*. Cuantificación del área de lesión realizada por análisis de imágenes con el programa informático Assess v2.0., de al menos 10 hojas por línea. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de al menos 6 réplicas biológicas. Letras diferentes corresponden a una diferencia significativa según análisis de ANOVA ($p<0,05$). Los datos mostrados son de un ensayo independiente representativo de dos réplicas experimentales.

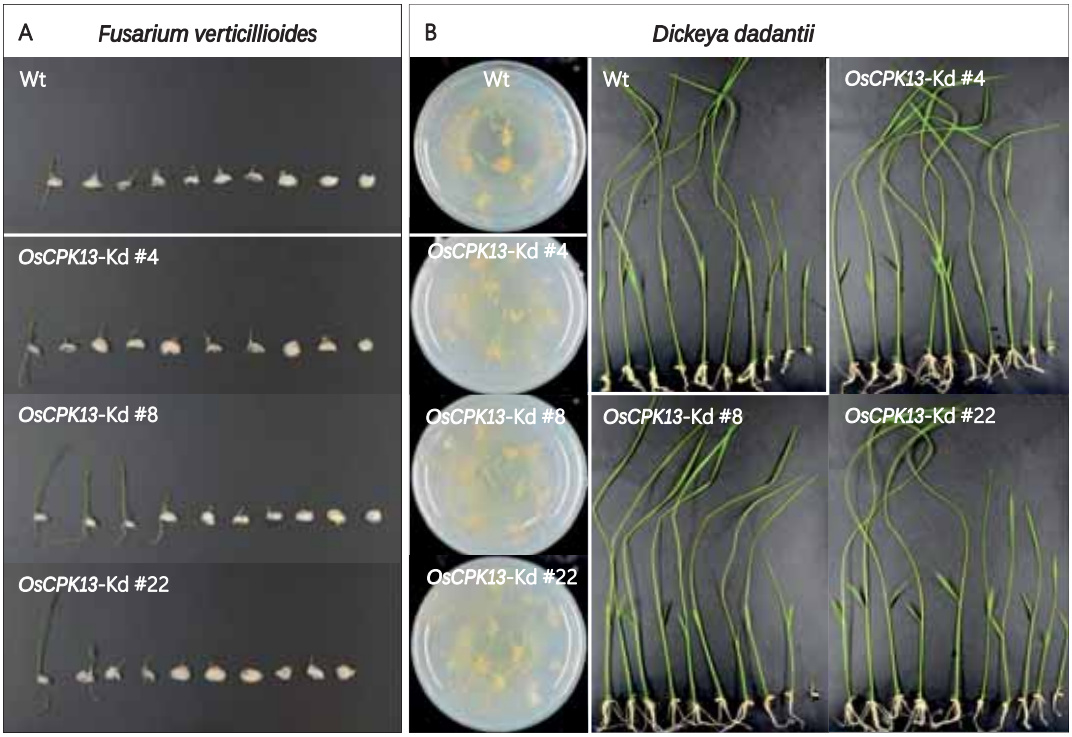

Figura 20. Fenotipo de las plantas transgénicas de arroz *OsCPK13*-Kd frente a infección por *F. verticillioides* y *D. dadantii*. A. Imágenes representativas de la infección causada por *F. verticillioides* en semillas de diferentes líneas *OsCPK13*-Kd y controles no transformados (Wt, Nipponbare). Las semillas fueron infectadas *in vitro* y mantenidas en condiciones de alta humedad y temperatura. Las imágenes fueron tomadas después de 7 días de la inoculación de cada semilla con 50 µl de una suspensión de esporas a concentración de 10^4 esporas/ml. **B.** Plantas de diferentes líneas *OsCPK13*-Kd y líneas controles no transformadas crecidas durante 7 días después de que las semillas hayan sido inoculadas *in vitro* con 50 µl de una suspensión de células de *D. dadantii* aislado AC4150 a una concentración de 10^4 CFU/ml. Resultados de un único experimento.

Para ello se realizó un ensayo de visualización de la producción de ROS en respuesta al tratamiento con elicitores de *M. oryzae*, basado en el marcaje fluorescente de las moléculas ROS con el compuesto marcador CM-H2DCFDA (Plancot *et al.*, 2013). El marcaje se hizo con hojas de plantas de 21 días infiltradas con una solución de CM-H2DCFDA y tratadas con elicitores de *M. oryzae* a una concentración de 300 µg/ml o con agua estéril como control durante 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21A, donde se observa que las hojas de las de las líneas *OsCPK13*-Ox muestran una intensa fluorescencia en condiciones controles, antes del tratamiento con elicitores, a diferencia de las líneas transformadas con el vector vacío y las no

transformadas. Estas últimas muestran un claro aumento de la fluorescencia tras el tratamiento con elicitores, sin llegar a fluorescer tan intensamente como las líneas *OsCPK13*-Ox. Estos resultados indican que la producción de ROS está alterada en las plantas que acumulan más proteína OsCPK13.

Se realizó además un ensayo específico para visualizar los radicales superóxido en respuesta infección con *M. oryzae*. En este ensayo la tinción ROS se realizó con NBT (*Nitro blue tetrazolium*) que forma un precipitado violáceo. El ensayo se realizó igualmente en hojas de plantas de 21 días crecidas en tierra, pero en este caso la infección se realizó localmente con esporas de *M. oryzae* aislado Guy11 (10^5 esp/ml) en hojas cortadas que se mantuvieron en medio MS al 100% de humedad para favorecer la infección. Como control se usaron plantas tratadas con agua estéril y mantenidas en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 21B. Igualmente a lo observado con la sonda fluorescente, se detectó tinción con NBT en las hojas *OsCPK13*-Ox en condiciones no infectadas, pero no en las líneas controles de la variedad silvestre o transformada con el vector vacío. En estos controles se observa la tinción en las hojas infectadas. La infección con esporas de *M. oryzae* supone un incremento en la producción de O_2^- en todas las líneas, las cuales tienen niveles similares de tinción.

La gráfica de la Figura 21C muestra la cuantificación del área de tinción con NBT en las hojas, y se puede ver que la sobreexpresión de *OsCPK13* otorga una producción significativamente superior de O_2^- en condiciones basales sin infectar, mientras que la infección supone un incremento de la detección de esta molécula ROS en todas las líneas, llegando a contenidos similares.

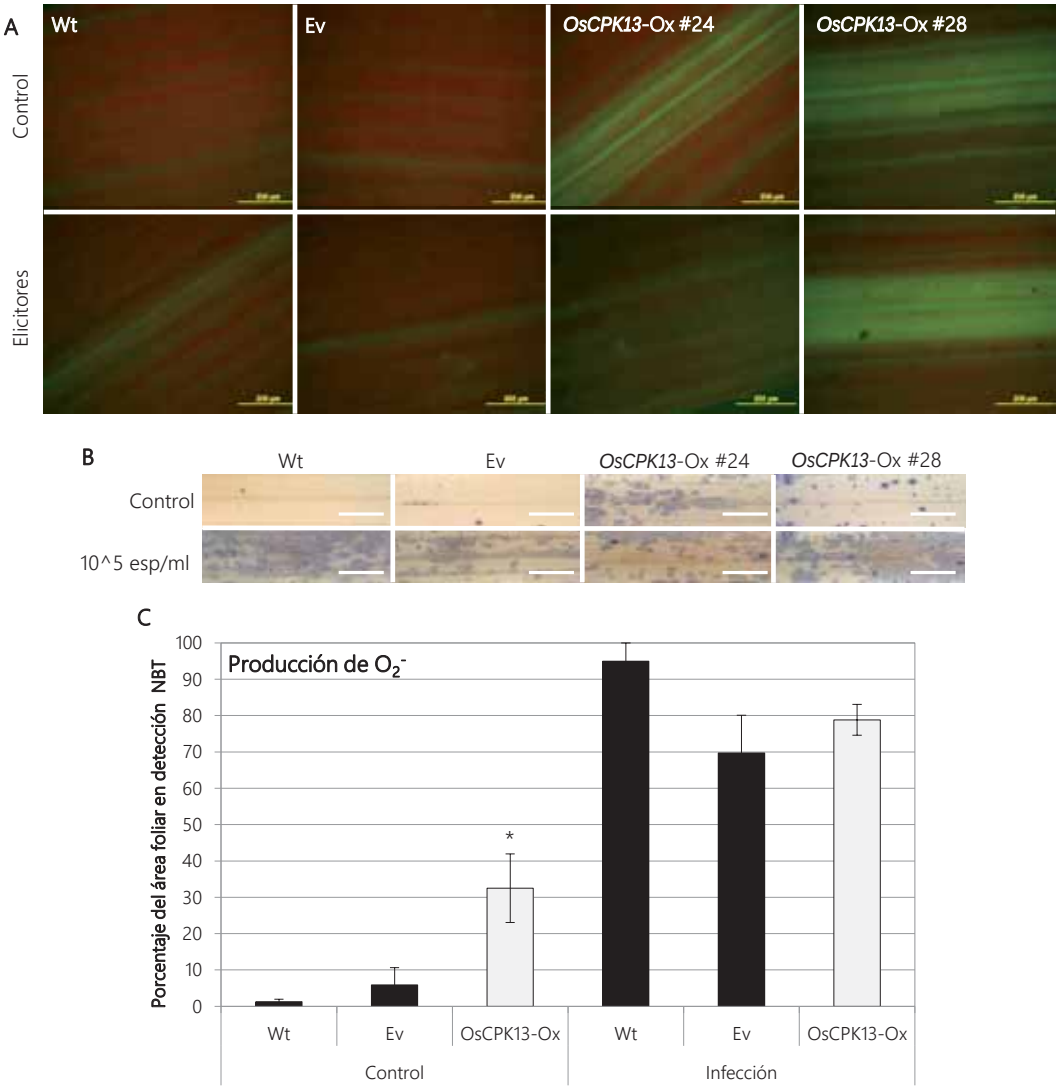

Figura 21. Producción de ROS en las hojas *OsCPK13*-Ox durante la respuesta de defensa a *M. oryzae*. A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de hojas de plantas de 21 días de diferentes líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* (*OsCPK13*-Ox) y controles (Wt y Ev), infiltradas con una solución de CM-H2DCFDA (10 µM), y tratadas con agua estéril (Control) o con una solución de elicitores de *M. oryzae* a una concentración de 300 µg/ml, 30 minutos después de tratamiento. Las barras de escala corresponden a 200 µm. **B.** Imágenes de campo claro tomadas con lupa estereoscópica de hojas de las mismas plantas que en A pero inoculadas localmente con discos de papel embebidos en agua estéril (Control) o en una solución de esporas de *M. oryzae* (aislado Guy11, 10^5 esp/ml) a las 72 horas post inoculación. Los resultados son representativos de al menos 3 réplicas biológicas. Las barras de escala corresponden a 5 mm. **C.** Porcentaje del área foliar con producción de iones superóxido (O_2^-) detectado en el análisis histoquímico por NBT en (B) en tejido foliar de las líneas *OsCPK13*-Ox y las líneas control silvestre (Wt) y del vector vacío (Wt) infectados o sin infectar. Cuantificación realizada mediante el programa informático de análisis de imágenes Assess v2.0 de 3 líneas *OsCPK13*-Ox y al menos 3 hojas por línea. Las barras de erros corresponden al error estándar de la media (SEM) de al menos 3 réplicas biológicas. El asterisco indica diferencias significativas con las líneas controles según análisis de ANOVA (*p<0,05).

Se cuantificó la expresión de la peroxidasa *OsPOX22.3*, la cual ha sido descrita como implicada en la respuesta de defensa ante patógenos (Gómez-Ariza *et al.*, 2007) y además se sabe que estas enzimas están relacionadas con la detoxificación de H_2O_2 en la célula. Por qRT-PCR se analizó la expresión de *OsPOX22.3* en hojas jóvenes de plantas de las líneas estudiadas, crecidas durante 90 días en condiciones de invernadero. Se ha encontrado que los tránscritos de *OsPOX22.3* se acumulan a niveles más altos en las líneas *OsCPK13*-Ox, con valores significativamente diferentes respecto a los cuantificados en las líneas control Wt y Ev (Figura 22). Los altos niveles de expresión de este gen podrían ser debidos a la necesidad de detoxificar la acumulación excesiva de H_2O_2.

Los resultados referentes a la producción de ROS en las líneas *OsCPK13*-Ox sugieren que estas plantas tienen un desbalance en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, y que esta característica fenotípica podría influir en el fenotipo que presentan estas líneas frente a *M. oryzae*.

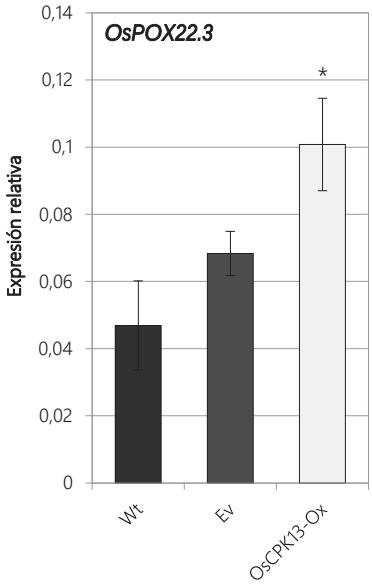

Figura 22. Expresión del gen de la peroxidasa *OsPOX22.3* en las líneas *OsCPK13-Ox*. Análisis de expresión mediante qRT-PCR del gen *OsPOX22.3* (LOC_Os07g01370) en hojas de líneas *OsCPK13*-Ox (3 líneas independientes), líneas transformadas con vector vacío (Ev, 2 líneas independientes) y plantas no transformadas (Wt) relativo al gen *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) de arroz. Las muestras se tomaron a partir de al menos 3 plantas por línea crecidas en tierra durante 90 días en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Los resultados son representativos de dos ensayos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. El asterisco indica que existen diferencias significativas según análisis de ANOVA (*p<0,05).

4.4 Análisis de expresión de genes relacionados con defensa en líneas *OsCPK13*-Ox

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de *OsCPK13* aumenta la susceptibilidad frente a la infección por *M. oryzae*, por lo que se propuso analizar si la

acumulación incrementada de esta CPK influye en las respuestas de defensa de la planta de arroz. Para ello se analizó la expresión de genes implicados en distintas rutas de señalización de defensa en las líneas *OsCPK13*-Ox infectadas con *M. oryzae*.

Las plantas de líneas *OsCPK13*-Ox y controles se inocularon mediante aspersión con una suspensión de esporas de esporas del aislado incompatible Guy11 de *M. oryzae* y se tomaron muestras de la parte aérea de las plantas a diferentes tiempos después de la inoculación. En esta cinética de infección, se han cuantificado por qRT-PCR los niveles de expresión transcripcional de genes relacionados con las rutas de señalización por ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido jasmónico (JA). Se analizó la cinética de expresión de *OsPR1a* (*Pathogenesis-related 1a*), marcador de la activación de respuestas de defensa ante la infección por patógenos, producto de la señalización mediada por SA; *OsPR5* (*Pathogenesis-related 5*), una thaumatina relacionada con patogénesis; *OsJAmyb* (*JA-related MYB transcription factor*) factor de transcripción relacionado con la vía de señalización mediada por JA y *OsEREBP* (*Ethylene responsive element binding protein*), un factor de transcripción de respuesta a ET (Campos-Soriano *et al.*, 2012).

Como se presenta en la Figura 23, todos los genes analizados mostraron inducción en respuesta a la infección por *M. oryzae*, principalmente a las 12 horas de iniciada la inoculación, tanto en las líneas control como en las sobreexpresoras de *OsCPK13*. Sin embargo, no se han encontrado diferencias de expresión entre las líneas *OsCPK13*-Ox y los controles del vector vacío o sin transformar (Ev y Wt). Estos resultados indican, al menos en lo que respecta a los genes marcadores analizados y en las condiciones experimentales utilizadas de este trabajo, que el fenotipo de susceptibilidad observado en las líneas *OsCPK13*-Ox no se debe a una alteración de las vías de señalización por SA, JA o ET. No obstante, para comprobar que estas vías no están alteradas, quizás deberían llevarse a cabo análisis de otros marcadores de las rutas, incluso en otras condiciones de infección u estado fisiológico de las plantas.

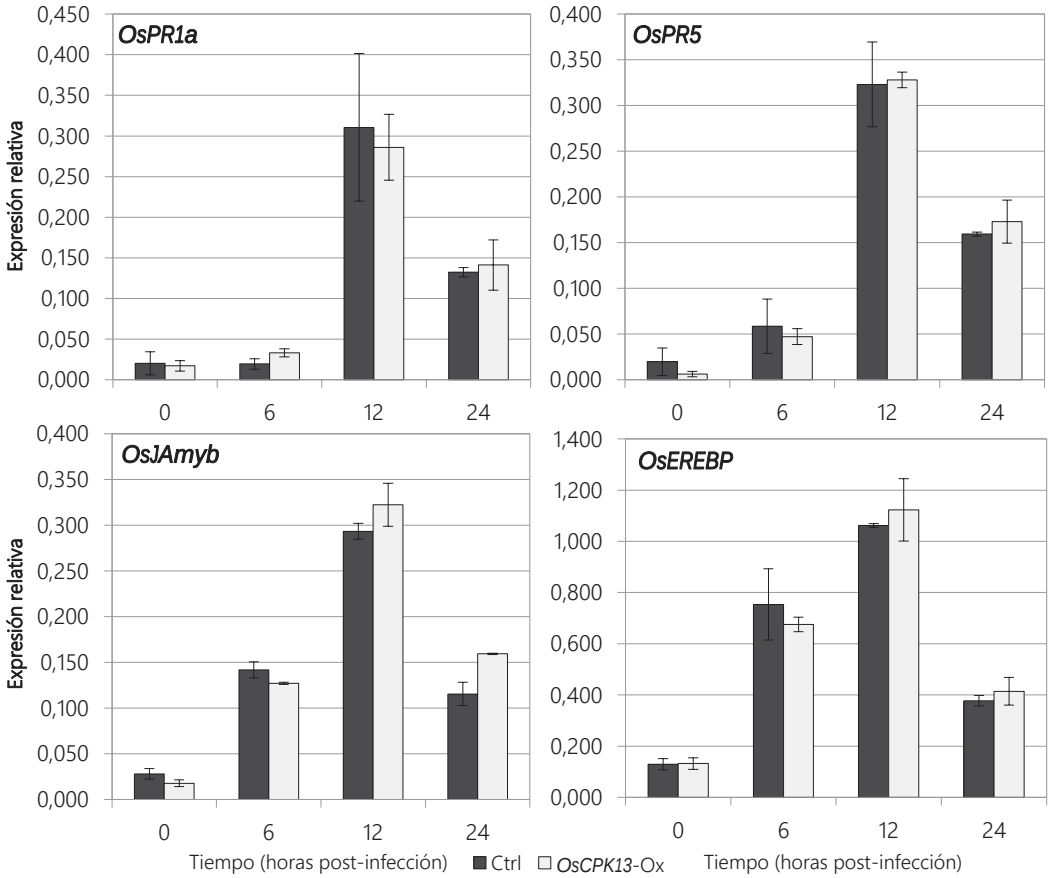

Figura 23. Análisis de la expresión de genes relacionados con defensa en respuesta a infección por *M. oryzae* en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*. Cinética de la expresión de genes relacionados con defensa en la parte aérea de plantas de 21 días crecidas en tierra e inoculadas por aspersión con esporas de *M. oryzae* Guy11 (10^5 esporas/ml). El análisis de expresión se realizó mediante qRT-PCR de los genes *OsPR1a* (LOC_Os07g03710), *OsPR5* (LOC_Os03g46070), *OsJAmyb* (LOC_Os11g45740) y *OsEREBP* (LOC_Os09g26420) tomando como gen de referencia el gen *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Cada muestra corresponde a un grupo al menos 3 plantas de líneas controles (Wt y una línea Ev) y *OsCPK13*-Ox (3 líneas independientes, líneas #18, #24 y #28) tomadas a los diferentes tiempos indicados luego de realizar la inoculación.

5. Caracterización de OsCPK13 en respuesta a fertilización fosfatada

Se conoce que la proteína OsCPK13 está implicada en la respuesta a varios tipos de estreses, principalmente abióticos (salinidad, sequía, frío) y en esta tesis se ha establecido su implicancia en respuestas a estrés biótico. Además de la versatilidad funcional de OsCPK13 en la planta de arroz, el hecho de que esta proteína se haya

encontrado localizada muy específicamente en tejidos de los haces vasculares en raíces y a nivel subcelular en membrana plasmática, ha puesto en consideración que podría tener también implicaciones en transporte de nutrientes o en vías de señalización relacionadas.

Plantas adultas de las líneas *OsCPK13*-Ox a menudo presentaban lesiones de quemaduras en las hojas o "*lesion mimic*", a diferencia de plantas silvestres o líneas del vector vacío. Estos síntomas fueron evaluados y los mismos no se debían a infección por patógenos ni estaban relacionados con respuestas a condiciones de luz. Sin embargo, se podían corresponder a deficiencia o toxicidad por exceso de algún nutriente, entre ellos el fósforo. Además, en este trabajo se ha visto que la actividad β-glucuronidasa guiada por el promotor de *OsCPK13* está localizada principalmente en tejidos foliares de nueva formación, lo cual se corresponde con la característica móvil de este nutriente. Las plantas son capaces de translocar el fósforo desde tejidos antiguos a los nuevos conforme avanza el estado fisiológico (Mahler, 2004). Estos datos proporcionaron ciertas pistas sobre la implicancia de esta proteína en la homeostasis de fosfatos en la planta. Se realizaron entonces estudios de *OsCPK13* y su relación con la fertilización fosfatada, según los objetivos propuestos en este trabajo de tesis.

5.1 Respuesta de *OsCPK13* a diferentes condiciones de fertilización fosfatada

Como primera aproximación para establecer la relación de este gen con la respuesta a fosfatos, se ha evaluado la expresión transcripcional de *OsCPK13* bajo diferentes condiciones de fertilización fosfatada. Para esto, se crecieron plantas silvestres de arroz durante 30 días en medio hidropónico nutritivo Yoshida para arroz en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Se aplicaron tres diferentes condiciones de fosfatos en el medio: suficiencia (condiciones normales del medio Yoshida), deficiencia (10% de las fuentes de fosfato suficientes) y exceso (10X de fosfatos). Se extrajeron muestras de raíces para la síntesis de cDNA a partir de la población de mRNAs y se cuantificó la expresión transcripcional de *OsCPK13* por qRT-

PCR. Los resultados obtenidos dan cuenta que los niveles de acumulación transcripcional fueron generalmente más altos en condiciones de fosfatos excesivos, comparados con las condiciones normales de suficiencia del nutriente (Figura 24). La expresión de *OsCPK13* se vio inducida en condiciones de exceso de fosfatos en la mayoría de ensayos realizados. Sin embargo, es necesario mencionar que en ciertas ocasiones se ha visto inducción también en condiciones de deficiencia del nutriente. Esta situación podría ser un reflejo de la implicancia de OsCPK13 en la regulación fina de la homeostasis de fosfatos, tanto en deficiencia como en exceso, y no cuando la planta crece en condiciones normales de contenido del mineral. Estos resultados indican que la proteína OsCPK13 podría cumplir un papel en la respuesta de las plantas de arroz a la fertilización fosfatada.

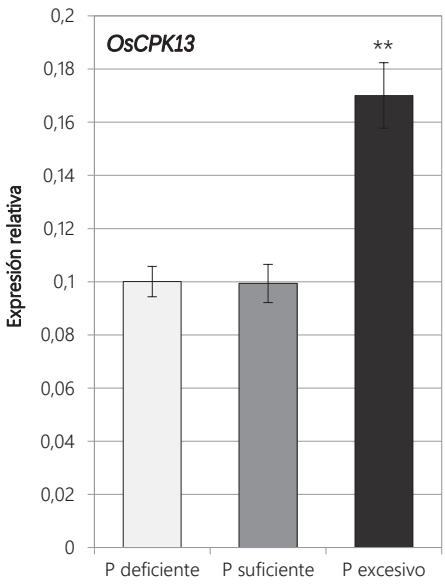

Figura 24. Expresión de *OsCPK13* en diferentes condiciones de fertilización fosfatada. Expresión de *OsCPK13* (LOC_Os04g49510) en raíces de plantas silvestres de arroz (*O. sativa* var. Nipponbare) crecidas en diferentes condiciones de fosfatos. La cuantificación se realizó por qRT-PCR utilizando el gen *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) como referencia. Se muestran los valores medios de 3 réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Las muestras corresponden a plantas de 30 días crecidas en cultivo hidropónico en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. P deficiente: solo un 10% de contenido normal de fosfatos; P suficiente: condiciones normales de contenido de fosfatos, medio Yoshida; P excesivo: 10X de contenido normal de fosfatos. Cada muestra corresponde a un grupo de raíces de al menos 3 plantas. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas por análisis de ANOVA (**$p<0,01$).

5.2 Fenotipo radicular de líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*

El contenido de fosfatos disponible en el medio de crecimiento de las plantas influye en la arquitectura radicular que estas desarrollan en respuesta a esa condición. Así, en condiciones de deficiencia de fosfatos las plantas amplían el área de búsqueda

del nutriente en el suelo en tres dimensiones mediante la exploración de mayor profundidad en el suelo (alargamiento de la raíz principal) y de áreas colindantes a la raíz principal (aumento del número de raíces secundarias). Esto último ayuda además a aumentar el área de absorción, lo que incrementa las probabilidades de tomar del suelo el nutriente escaso (Niu *et al.*, 2013; Ticconi & Abel, 2004). Se propuso entonces analizar el fenotipo radicular de las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* e intentar relacionarlo con una posible alteración en la homeostasis de fosfatos de esas líneas.

Para evaluar el fenotipo de las raíces, se crecieron plantas de líneas *OsCPK13*-Ox y líneas control silvestre y del vector vacío durante 7 días en condiciones normales de contenido de fosfatos sobre medio MS sólido, manteniendo controladas la esterilidad, luz y temperatura. Luego de este tiempo, se cuantificaron las raíces secundarias y se midió la longitud de la raíz principal de cada planta. En el análisis fenotípico se encontró que las líneas sobreexpresoras de *OsCPK13* eran visiblemente más cortas que las líneas control (Figura 25A), lo que se correspondía con los datos cuantitativos de la longitud de la raíz principal, observándose diferencias significativas entre las líneas *OsCPK13*-Ox y la variedad silvestre y líneas del vector vacío (Figura 25B). Además, las plantas de las líneas sobreexpresoras de *OsCPK13* desarrollan significativamente más raíces secundarias que las líneas controles (Wt y Ev) (Figura 25C).

Los resultados revelan que las líneas *OsCPK13*-Ox tienen un desarrollo radicular que mimetiza al que presentan las plantas frente a deficiencia de fosfatos en el medio. Creciendo en condiciones normales y suficientes de fosfatos, estas plantas desarrollan un mayor número de raíces secundarias. Sin embargo, la raíz principal en plantas sobreexpresoras de *OsCPK13* es más corta que en las plantas silvestres. Según estos resultados, se podría inferir que las raíces de las plantas *OsCPK13*-Ox son incapaces de detectar de manera efectiva la situación de la fertilización fosfatada en el medio.

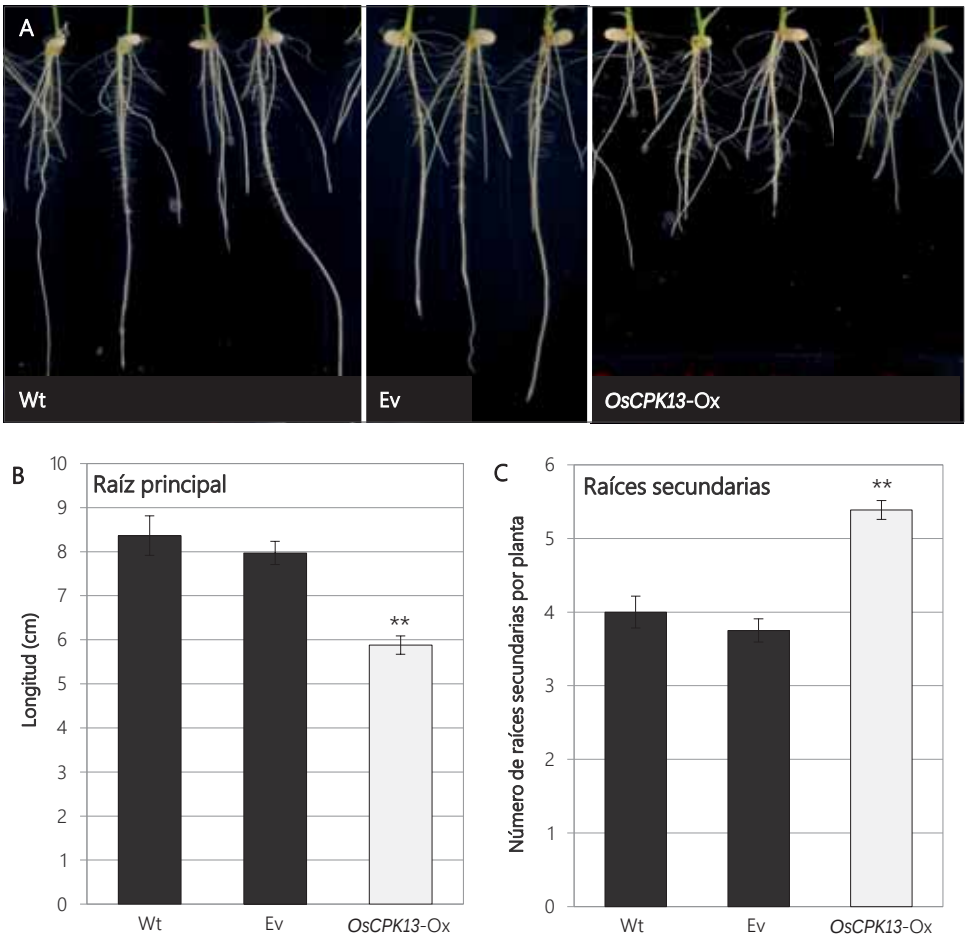

Figura 25. Fenotipo radicular de líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*. A. Imágenes representativas de la apariencia de raíces de plantas silvestres (Wt), del vector vacío (Ev) y de líneas sobreexpresoras de *OsCPK13* (*OsCPK13*-Ox) crecidas en condiciones normales. **B.** Longitud promedio de la raíz principal de las plantas. **C.** Número promedio de raíces secundarias. Los gráficos representan los promedios de mediciones de 3 réplicas biológicas y 6 líneas independientes de *OsCPK13*-Ox. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas por análisis de ANOVA (**$p<0,01$). Las plantas se crecieron durante 7 días en medio MS sólido en condiciones controladas de luz y temperatura. Los resultados son representativos de dos ensayos independientes.

5.3 Caracterización fenotípica de líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* en diferentes condiciones de fertilización fosfatada

Anteriormente se había mencionado que las plantas adultas de las líneas *OsCPK13*-Ox a menudo desarrollaban lesiones espontáneas en las hojas y que las mismas no eran debidas a infección por patógenos, sino más bien recordaba a síntomas

por toxicidad de algún nutriente. Tampoco se habían podido obtener líneas homocigotas, por lo que se podría decir que la acumulación excesiva de la proteína OsCPK13 en plantas de arroz conlleva severos efectos en el desarrollo.

Para investigar si se trataba de un problema de toxicidad de algún nutriente, y dado que ciertos indicios apuntaban al fosfato, se evaluó el crecimiento de las plantas *OsCPK13*-Ox en condiciones de suficiencia y deficiencia de fosfato. Las plantas de las líneas *OsCPK13*-Ox y las control silvestre y vector vacío, se crecieron durante 120 días en tierra en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, bajo condiciones normales de fertilización fosfatada. Estas condiciones corresponden a suficiencia de fosfatos en el medio, conteniendo el sustrato un abono de liberación lenta y una fertirrigación nutritiva. Las plantas *OsCPK13*-Ox así crecidas desarrollaron lesiones necróticas en las hojas y mostraron menor crecimiento en comparación con las líneas controles (Figura 26A). En cambio cuando las plantas se cultivaron en condiciones de baja fertilización fosfatada, que corresponde al sustrato con abono de liberación lenta y a la fertirrigación nutritiva desprovista de fuente fosfatada, se observó que las líneas *OsCPK13*-Ox ya no desarrollan lesiones espontáneas y muestran un crecimiento comparable al de las líneas control (Figura 26B).

En paralelo se analizaron otros parámetros fisiológicos como indicadores del crecimiento durante la fase vegetativa, tales como el número de hojas e hijuelos, así como la producción de panículas y semillas como indicadores de la fase reproductiva. Los resultados dan cuenta de que la sobreexpresión de *OsCPK13* tiene fuerte incidencia en el desarrollo y fisiología de la planta tanto en la fase vegetativa como en la reproductiva, provocando una disminución significativa en la producción de hojas, hijuelos, panículas y semillas bajo condiciones suficientes de fertilización fosfatada, en comparación con los controles de las líneas Wt y Ev (Figura 27A). Estos resultados tomados en conjunto sugieren que las plantas sobreexpresoras de *OsCPK13* presentan toxicidad debida al fosfato, y que son sensibles a una concentración normal de este

nutriente en el medio. Se podría decir que para estas plantas es suficiente una baja fertilización fosfatada para su crecimiento normal y sin efectos tóxicos que influyan en su desarrollo.

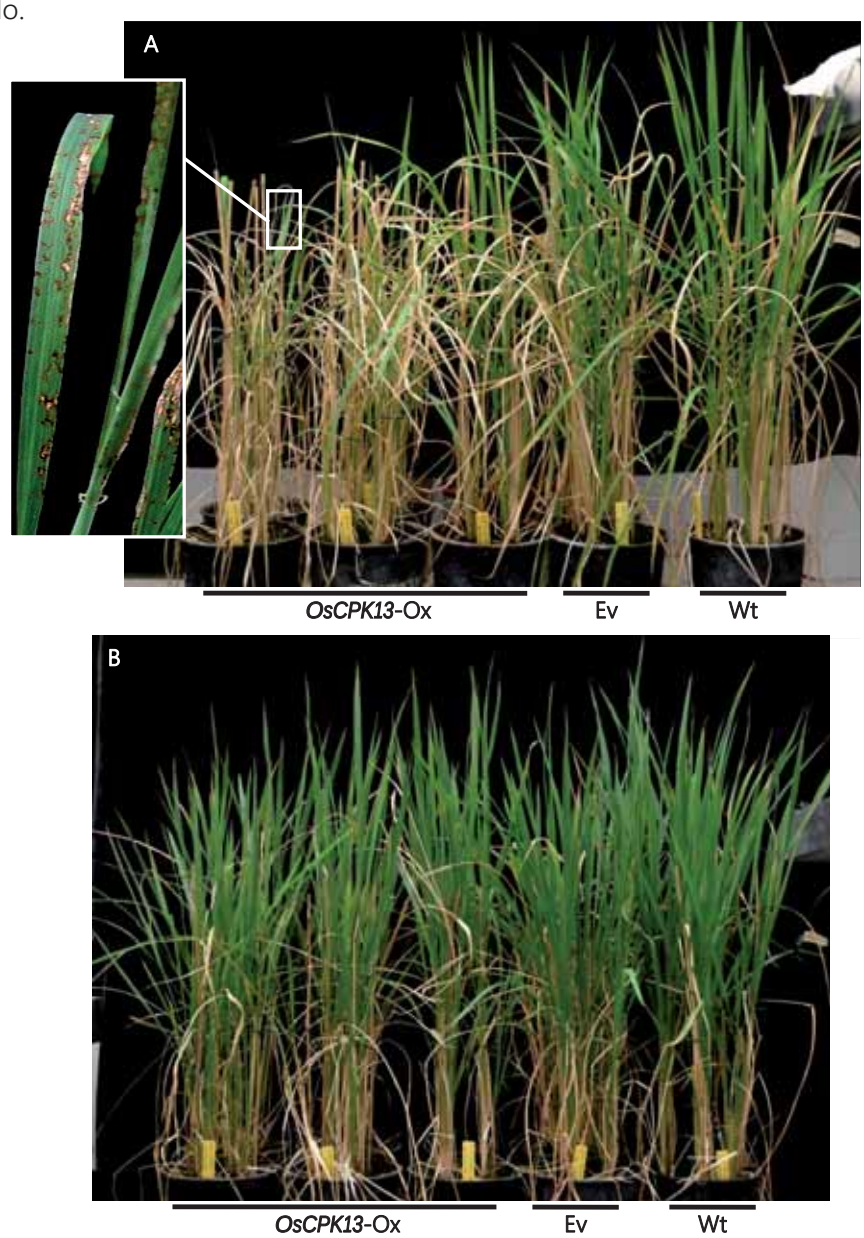

Figura 26. Fenotipo de líneas *OsCPK13*-Ox crecidas en diferentes condiciones de fertilización fosfatada. Apariencia de plantas de arroz de 120 días de líneas sobreexpresoras de *OsCPK13* (*OsCPK13*-Ox) comparadas con líneas transformadas con el vector vacío (Ev) y sin transformar (Wt) crecidas en invernaderos en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura y bajo fertilización normal suficiente de fosfatos **(A)** y en condiciones de baja fertilización de fosfatos **(B)**. Detalle mostrando las lesiones espontaneas desarrolladas en las hojas de las plantas *OsCPK13*-Ox. El fenotipo observado es representativo de dos experimentos independientes.

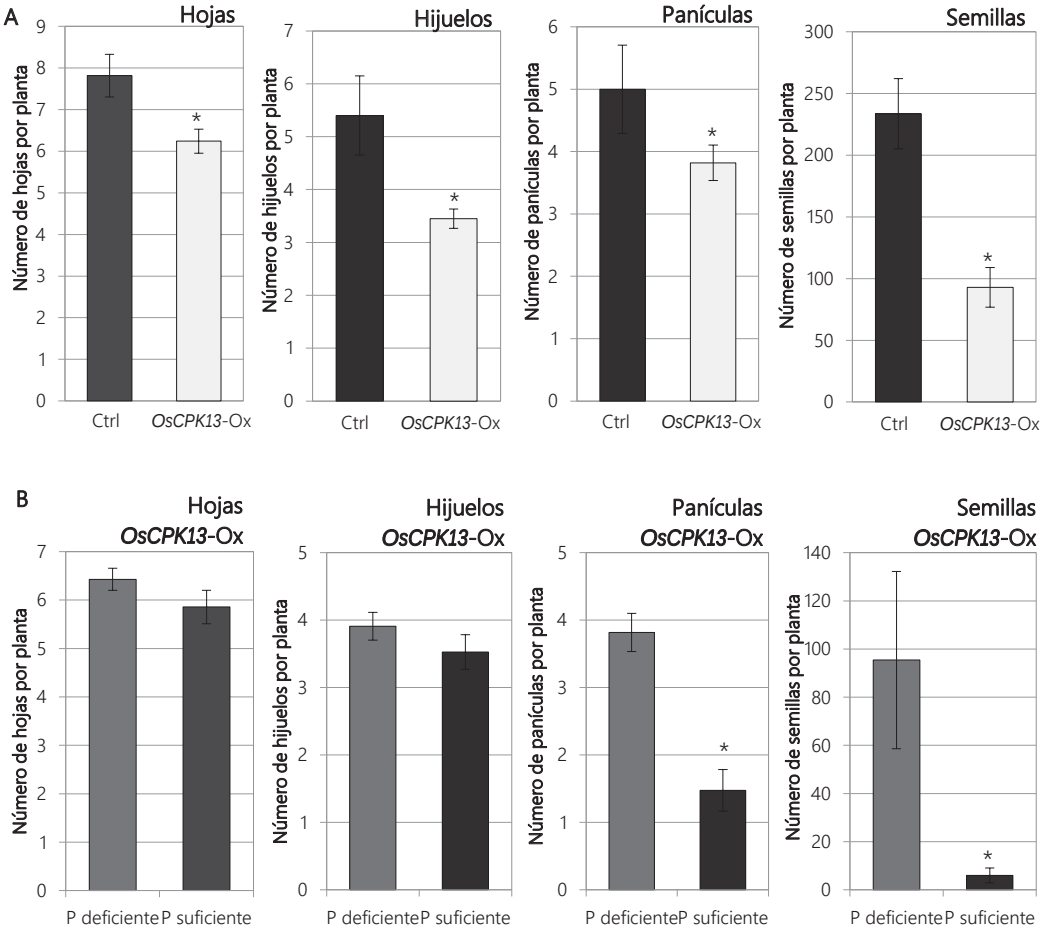

Figura 27. Efectos fisiológicos causados por diferentes condiciones de fertilización fosfatada en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*. A. Promedio del número de hojas, hijuelos, de panículas y semillas de las líneas *OsCPK13*-Ox en comparación con líneas control (Ctrl), que agrupa a las líneas transformadas con el vector vacío (Ev) y las líneas silvestres (Wt), en condiciones de suficiencia de fosfato (fertilización fosfatada normal). Se monitorizaron al menos 3 plantas de 7 líneas independientes *OsCPK13*-Ox y 2 líneas Ev. **B.** Promedio del número de hojas, hijuelos, panículas y semillas de las líneas *OsCPK13*-Ox en diferentes condiciones de fertilización fosfatada. P suficiente: abono de liberación lenta en el sustrato + fertirrigación normal; P deficiente: abono de liberación lenta en el sustrato + fertirrigación desprovista de fuentes de fosfatos. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican diferencias significativas por análisis de ANOVA (*p<0,05).

El efecto de la toxicidad del fosfato fue mucho más notorio al observar el crecimiento de las plantas *OsCPK13*-Ox en condiciones de deficiencia comparadas con las condiciones de suficiencia de fosfatos, siendo esta última condición un contenido excesivo del nutriente para estas plantas (Figura 27B). En esas condiciones se vio

severamente afectada la producción de panículas y semillas (indicadores reproductivos) en comparación con las deficientes de fosfatos, demostrando que la sobreexpresión de *OsCPK13*-Ox provoca cambios fisiológicos en la planta de arroz relacionados con una menor tolerancia al contenido de fosfato en el medio.

5.4 Acumulación de fósforo en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*

El fenotipo de toxicidad de fosfato en las líneas *OsCPK13*-Ox nos llevó a analizar el contenido en fosfatos de estas plantas. Este se analizó en hojas nuevas y raíces de plantas de varias líneas *OsCPK13*-Ox y de la variedad silvestre (Nipponbare), crecidas en tierra en condiciones controladas de invernadero durante 120 días, bajo dos condiciones de fertilización fosfatada: deficiencia y suficiencia de fosfatos. Los resultados se muestran en la Figura 28. No se observan diferencias significativas en el contenido de P en raíces entre las líneas *OsCPK13*-Ox y los controles, pero sí se ve un claro aumento en el contenido cuando las plantas se crecen en suficiencia de fosfato (Figura 28A). En hojas se observa un incremento significativo del contenido de fósforo en condiciones de suficiencia de fosfatos en las líneas *OsCPK13*-Ox en comparación las líneas controles no transformadas. Este contenido de fosfatos en el medio de crecimiento es excesivo para las plantas *OsCPK13*-Ox. Los valores del contenido de este mineral llegan hasta una concentración de 2,5% de P en tejidos foliares, cuando los niveles normales están entre 1 y 1,5% (Figura 28B). La acumulación excesiva de fósforo en las hojas podría tener un efecto tóxico y ser determinante en los defectos fisiológicos que presentan las plantas *OsCPK13*-Ox. Esto podría indicar que las plantas *OsCPK13*-Ox tienen alterada la absorción y la translocación del nutriente a la parte aérea de la planta, favorecida por el mayor desarrollo radicular.

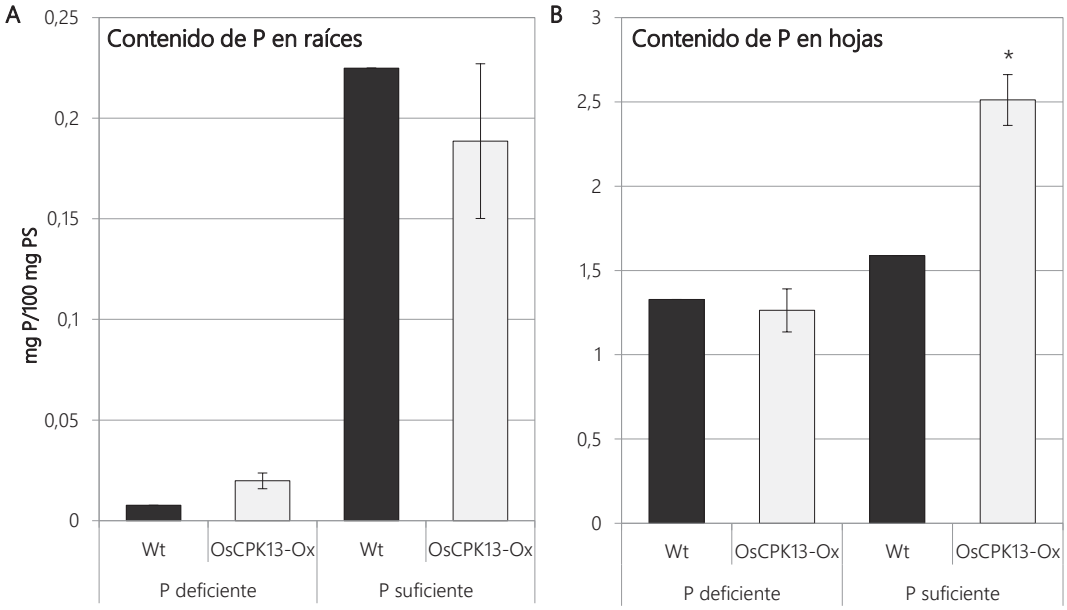

Figura 28. Acumulación de P en las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*. Contenido de P en raíces **(A)** y en hojas **(B)** de plantas de las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* (*OsCPK13*-Ox) comparado con la variedad silvestre no transformada (*O. sativa* var. Nipponbare, Wt) condiciones de fertilización fosfatada deficientes (abono de liberación lenta + fertirrigación desprovista de fuentes de fosfatos) y en suficiencia de fosfatos (abono de liberación lenta + fertirrigación normal). El contenido de P se determinó en raíces y hojas de plantas de 120 días crecidas en tierra en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Los valores corresponden al promedio de al menos 3 plantas Wt y de 3 plantas de 3 líneas independientes *OsCPK13*-Ox. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El asterisco indica diferencias significativas según análisis de ANOVA (*$p<0,05$). Los resultados son correspondientes a un ensayo experimental representativo de dos réplicas independientes.

5.5 Expresión de genes relacionados con la homeostasis de fosfatos en las líneas *OsCPK13*-Ox

Para evaluar si existen alteraciones en la ruta de señalización por fosfatos en las líneas *OsCPK13*-Ox, se realizó la cuantificación de los niveles de expresión transcripcional de algunos de los genes relacionados con la homeostasis de fosfatos en plantas de arroz.

Estos estudios de expresión génica se realizaron con plantas en el mismo estadío de desarrollo y cultivadas en las mismas condiciones en las que se determinó el contenido de fósforo. Los genes estudiados y cuantificados por qRT-PCR fueron dos

factores de transcripción (*OsPHR1* y *OsPHR2*), dos transportadores de fosfatos (*OsPT2* y *OsPT6*), una E3 ubiquitina-ligasa (*OsPHO2*) y una fosfatasa (*OsPAP10*), los cuales muestran cambios de expresión génica en respuesta a la disponibilidad de fosfatos en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos en este análisis se recogen en la figura 29. Los niveles de expresión de los factores de transcripción no se encuentran alterados en las plantas *OsCPK13*-Ox, con lo que se podría inferir que si OsCPK13 tuviera una función en esta ruta, sería por debajo de la señalización por *OsPHR1* y *OsPHR2*. El gen *OsPHO2* tiene una acumulación transcripcional significativamente mayor en *OsCPK13*-Ox en relación con la variedad silvestre. La proteína OsPHO2 es una E3 ubiquitina-ligasa que reprime la acumulación del transportador OsPT2, uno de los responsables de la translocación del fosfato desde las raíces a la parte aérea de la planta (Ai *et al.*, 2009). En las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*, sin embargo, se ha visto que la expresión de *OsPT2* también se encuentra inducida.

Según estos resultados se puede inferir que la inducción de *OsPHO2* podría deberse a un mecanismo de autorregulación, en el intento de disminuir los niveles de acumulación del transportador. Tampoco deberían descartarse otros mecanismos de regulación que influyan sobre *OsPHO2* en estas líneas, por lo que se sugieren trabajos posteriores sobre la implicancia de esta CPK en la ruta de señalización por fosfatos. A partir de estos resultados se podría deducir que OsCPK13 cumple sus funciones en la cascada de señalización de fosfatos por encima de OsPT2, regulando su expresión positivamente. No se observaron diferencias en las líneas *OsCPK13*-Ox en comparación con la línea control, en la expresión del transportador *OsPT6*, que ha sido descrito como uno de los responsables de la absorción de fosfatos en las raíces (Ai *et al.*, 2009). Así también se ha visto que el gen de la fosfatasa *OsPAP10* se expresa a niveles significativamente más bajos en las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* comparadas con la línea silvestre. Las fosfatasas son enzimas que hidrolizan y liberan grupos fosfatos a partir de moléculas orgánicas y los hacen disponibles para su reutilización nutritiva en

la célula, por lo que normalmente se inducen en respuestas por falta de fosfatos en el medio (Panigrahy *et al.*, 2009). Posiblemente la baja acumulación de esta enzima es consecuencia del contenido excesivo de fosfatos en las plantas. Las líneas *OsCPK13*-Ox tienen alterados ciertos procesos fisiológicos y moleculares relacionados con la homeostasis de fosfatos, como son el transporte (OsPT2), la ubiquitinación de proteínas (OsPHO2) y la reutilización de fosfatos (OsPAP10), por lo que OsCPK13 podría cumplir funciones en esa ruta de señalización.

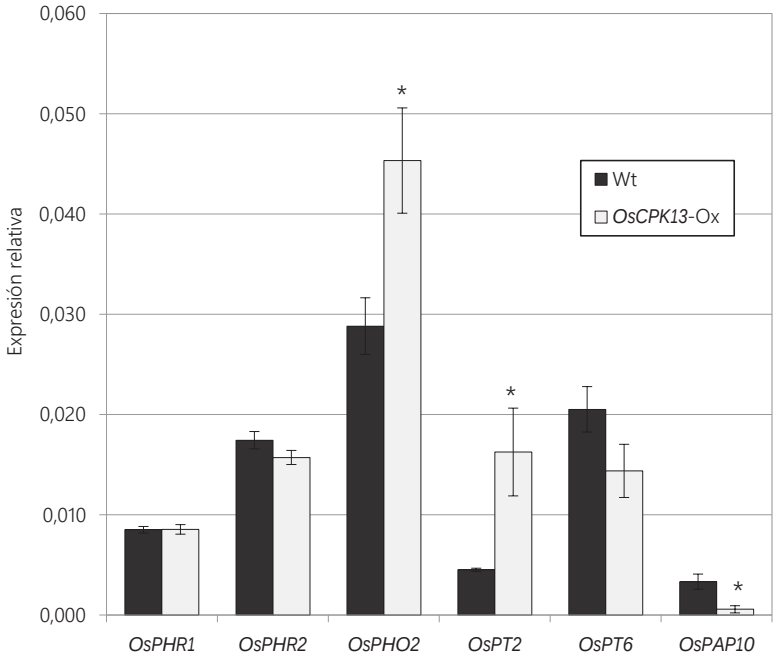

Figura 29. Expresión de genes relacionados con la homeostasis de fosfato en líneas de sobreexpresión de *OsCPK13*. Análisis de expresión génica mediante qRT-PCR en raíces de 3 plantas de 120 días de líneas *OsCPK13*-Ox (al menos 3 líneas independientes) y de al menos 3 plantas silvestres Nipponbare (Wt) crecidas en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad y con suficiente fertilización fosfatada. Los genes analizados fueron los de los factores de transcripción *OsPHR1* (LOC_Os03g21240) y *OsPHR2* (LOC_Os07g25710); de los transportadores de fosfato *OsPT2 (*LOC_Os03g05640) y *OsPT6* (LOC_Os08g45000); de la ubiquitina-ligasa *OsPHO2* (LOC_Os05g48390); y de la fosfatasa *OsPAP10* (LOC_Os01g56880). La expresión del gen *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) fue utilizada como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Asteriscos indican diferencias significativas según análisis de ANOVA (*p<0,05).

5.6 Expresión de *OsCPK13* en líneas alteradas en la ruta de homeostasis de fosfatos

Con el fin de intentar elucidar el sitio que ocupa la proteína OsCPK13 en la cascada de señalización de la ruta del fosfato, se ha pensado analizar la expresión de este gen en ciertas líneas de arroz que tienen alterada esta ruta en puntos específicos.

Para este propósito se contaba con líneas sobreexpresoras de miRNAs que han sido descritos como reguladores post-transcripcionales de dos componentes importantes de la ruta. El miRNA osa-miR399 regula negativamente a *OsPHO2* y osa-miR827 tiene como diana de corte al tránscrito de *OsSPX1* (Hu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010). Se propuso entonces analizar si en alguna de estas líneas sobreexpresoras (*osa-MIR399*-Ox y *osa-MIR827*-Ox) se observaban alteraciones en la expresión de *OsCPK13* e intentar relacionar los cambios con su ubicación reguladora por debajo de estos componentes en la cascada de señalización.

En raíces de plantas adultas de las líneas *osa-MIR399*-Ox y *osa-MIR827*-Ox se evaluó la expresión transcripcional de *OsCPK13* en comparación con sus respectivas variedades silvestres. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de este gen en ninguna de las líneas sobreexpresoras de estos miRNAs comparadas con su respectivo control silvestre (Figura 30).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en relación a OsCPK13 y su posible rol en la ruta de señalización de fosfatos, se podría decir que esta proteína cumple una función en esta vía y que se encuentra por encima del transportador de fosfatos de translocación a parte aérea OsPT2. La sobreexpresión de los miRNAs osa-miR399 y osa-miR827 no tiene incidencia en la expresión de *OsCPK13*, lo que sugiere que podría ser parte de la cascada de señalización por encima de estos reguladores. La función específica que cumple la proteína OsCPK13 está por definir, por lo que deberían llevarse a cabo más estudios con el fin de caracterizarla en la ruta de señalización de fosfatos. Se

han realizado además análisis de interacción proteína-proteína entre OsCPK13 y OsPT2, sin lograr obtener resultados concluyentes.

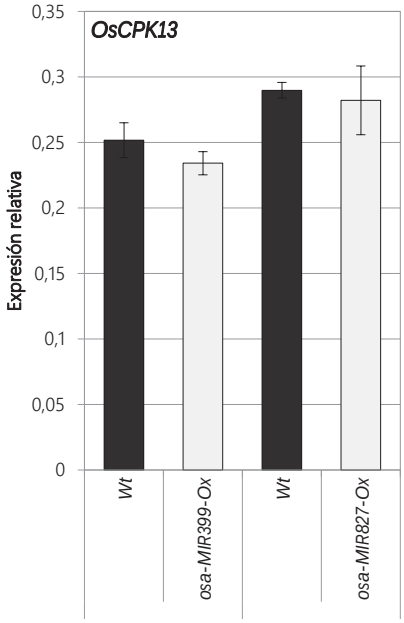

Figura 30. Expresión de *OsCPK13* en líneas alteradas en la ruta de homeostasis de fosfatos. Expresión de *OsCPK13* en raíces de plantas de 120 días de líneas de sobreexpresión de los miRNAs cuyas dianas son genes relacionados con fosfatos *osa-miR399* (*osa-miR399*-Ox) y *osa-miR827* (*osa-miR827*-Ox) comparadas con líneas control de las variedades silvestres *O. sativa* var. Tainung67 (fondo genético de *osa-miR399*-Ox) y var. Nipponbare (fondo genético de *osa-miR827*-Ox) crecidas en condiciones normales y controladas de luz, temperatura y humedad. Cuantificación realizada por RT-PCR en tiempo real cuantitativa. La expresión del gen *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) fue utilizada como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Los valores corresponden al promedio de 3 diferentes líneas independientes. Resultados de un único experimento.

Discusión

En el primer capítulo de este trabajo se ha caracterizado la proteína OsCPK13 y su funcionalidad en las respuestas de defensa de las plantas de arroz y frente a la fertilización fosfatada. Nuestros estudios confirman que esta isoforma de la familia CPK de arroz, participa funcionalmente en varias cascadas de señalización, además de la ya descrita en respuesta a estreses abióticos, salinidad, sequía y frío (Saijo, *et al.*, 2000); modula el mantenimiento de la homeostasis de fosfatos y la respuesta inmune frente al patógeno de arroz *M. oryzae*. Estos resultados sugieren que a pesar de que se había propuesto una diversificación de las proteínas CPKs que explicara la complejidad de esta familia multigénica de tal manera que cada isoforma mediase una señal (Harmon *et al.*, 2000), parece ser que algunas CPKs podrían participar en varias cascadas de señalización a la vez. Según los resultados, podría ser que OsCPK13 medie en la interacción de la señalización a varios estreses abióticos y bióticos para orquestar la respuesta apropiada para la planta, lo que resulta interesante teniendo en cuenta que la planta se ve normalmente sometida a varios estreses de manera simultánea.

Estudio de la función de OsCPK13 mediante aproximaciones de ganancia y pérdida de la función

Para caracterizar la función del gen *OsCPK13*, es importante conocer su patrón de Los estudios funcionales se han realizado utilizando líneas transgénicas de arroz que sobreexpresan el gen *OsCPK13* y líneas transgénicas de silenciamiento de la expresión del gen *OsCPK13* mediante la expresión de un miRNA artificial (amiRNA). La caracterización molecular de las plantas transgénicas muestra la acumulación constitutiva de la proteína OsCPK13 en las líneas sobreexpresoras, mientras que se observa la disminución en la acumulación de la proteína en las líneas de silenciamiento. Estos datos indican que el amiRNA expresado es eficiente en el silenciamiento post-transcripcional del gen *OsCPK13*, y valida la estrategia para el estudio funcional de genes candidatos (Warthmann *et al.*,

2008). A pesar de ello, en nuestros estudios no hemos podido observar cambios fenotípicos en las líneas de silenciamiento. Este resultado podría explicarse, bien debido a redundancia génica o bien a compensación génica como se ha sugerido para otros genes cuya pérdida de función no conlleva cambios fenotípicos aparentes (Lloyd & Meinke, 2012). Esta explicación resulta plausible en el caso del gen *OsCPK13* por tratarse de una familia multigénica con 31 miembros en arroz, los cuales están muy conservados tanto estructuralmente como a nivel de secuencia (Wan *et al.*, 2007). También es posible que ante la baja expresión de un gen de esta familia, otra CPK pueda suplirla en sus funciones. No podemos descartar que realmente OsCPK13 no esté implicada funcionalmente en la inmunidad de la planta de arroz por la ausencia de fenotipo en ensayos de infección con los patógenos *M. oryzae*, *F. verticillioides* y *D. dadantii*. No se ha analizado el fenotipo de estas líneas en condiciones de crecimiento con niveles de fosfato alterado. Saijo y colaboradores (2000) sí describieron que las líneas con niveles reducidos de *OsCPK13* son menos tolerantes a salinidad que las líneas silvestres, confirmando así su implicación en las respuestas a estrés salino.

Los estudios con las líneas de sobreexpresión tienen que tomarse con precaución, porque en este caso se expresa de forma constitutiva el gen, acumulándose la proteína en tejidos o momentos que en condiciones normales no estaría, eso puede provocar interacciones con proteínas con las que normalmente no se encontraría, y conllevar a interpretaciones erróneas sobre la función de la proteína. De todas formas, la estrategia de sobreexpresar un gen para estudiar su función ha sido ampliamente usada y aceptada en la literatura. Así se ha estudiado la función de otras proteínas quinasa de arroz, tales como las proteínas receptores quinasa *OsSIK1* (Ouyang *et al.*, 2010) y *OsSIK2* (Chen *et al.*, 2013a), la proteína quinasa Pstol1 (Gamuyao *et al.*, 2012), la proteína quinasa asociada a pared celular *OsWAK1* (Li *et al.*, 2009) o proteínas CIPK (Xiang *et al.*, 2007), incluyendo OsCPKs (Asano *et al.*, 2012; Campo *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014). Incluso también así se ha caracterizado funcionalmente el gen *OsCPK13* frente a distintos estreses abióticos como

frío, salinidad y sequía, utilizando líneas de sobreexpresión del gen bajo el control del promotor constitutivo *35S* del CaMV (Saijo *et al.*, 2000).

En nuestro estudio las plantas transgénicas acumulan la proteína OsCPK13 completa con su dominio regulador de unión a calcio intacto, por lo que a priori la proteína debe estar en estado basal inactivo y solo será activada ante un incremento de los niveles de calcio. Así, la activación de la señalización mediada por OsCPK13 solo se producirá en las líneas sobreexpresoras ante el estímulo desencadenante de la respuesta. Este tipo de sobreexpresión es diferente a la de otros trabajos en los que se ha producido una forma constitutiva activa de CPKs u otras quinasas, que supone una señalización constitutiva (Dubiella *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2007). Por tanto, la acumulación de la proteína completa no conlleva una activación constitutiva, aunque tal vez sea más temprana su inducción ante el estímulo, por estar ya presente la proteína en condiciones basales, lo que podría conferir cierta ventaja y conllevar menos efectos pleiotrópicos a la planta. Aun así, no se pudieron obtener líneas homocigotas sobreexpresoras de *OsCPK13* y las líneas hemicigotas producen con el tiempo lesiones necróticas espontáneas en las hojas y muestran serios defectos en el desarrollo y en la producción de las semillas. Estos datos muestran que la sobreexpresión de *OsCPK13* conlleva efectos no deseables en la planta de arroz. El trabajo de Saijo *et al.* (2000) no hace alusión al desarrollo de lesiones necróticas y los estudios sólo se realizaron en la generación T1, aún segregante, y no se refieren a la producción de líneas homocigotas. Además, en ese trabajo la expresión del cDNA *OsCPK13* está bajo el control del promotor *CaMV35S*, que es menos fuerte que el promotor *ZmUbi1* usado en nuestros estudios. Tal vez, las diferencias se deban solo a una menor carga génica y a una menor sobreexpresión del gen. El mismo fenotipo de lesiones espontáneas sí se observa en las plantas transgénicas de sorgo sobreexpresoras de *OsCPK13*, también bajo el control del promotor *ZmUbi1*, así como problemas de fertilidad (Mall *et al.*, 2011). Estas lesiones, al igual que en nuestros estudios, se desarrollan en las hojas más viejas, tejido donde no se expresa *OsCPK13* en condiciones normales, como muestran nuestros ensayos de actividad GUS guiada por el promotor *OsCPK13*.

Aparentemente la acumulación de la proteína OsCPK13 en hojas viejas provoca el desarrollo de lesiones necróticas, sugiriendo que este fenotipo está asociado a la expresión constitutiva y no tanto a una función normal de la proteína. Además todo ello muestra que los niveles de acumulación de una proteína reguladora, como es OsCPK13, han de estar finamente regulados, y que cambios pequeños pueden conllevar consecuencias graves para el desarrollo y la fertilidad de la planta de arroz.

En conjunto, nuestros estudios con las líneas de sobreexpresión y silenciamiento del gen *OsCPK13* representan una aproximación útil para investigar la función de esta proteína, siempre tomando en consideración que la proteína se está acumulando de manera constitutiva pero manteniendo su regulación por calcio.

Caracterización de OsCPK13 en la inmunidad de la planta de arroz

Este trabajo ha mostrado que existe una inducción lenta del gen *OsCPK13* en respuesta a elicitores, lo que se corresponde con la acumulación tardía de la proteína en respuesta a infección por el hongo fitopatógeno de arroz *M. oryzae*. El proceso infectivo de *M. oryzae* comienza con la germinación de las esporas y la formación de apresorios en la superficie de las de las hojas, que ocurre dentro de las primeras 6 horas, para comenzar la colonización de los tejidos entre 12 y 24 horas después (Campos-Soriano *et al.*, 2013; Rebollar & López-García, 2013; Talbot, 2003; Valent & Chumley, 1991). Después de un desarrollo inicial biótrofo dentro de las células vivas, el hongo cambia su estrategia invasiva al modo necrótrofo provocando la muerte celular del huésped, lo que ocurre entre 1 y 3 días luego del inicio de la infección. (Horbach *et al.*, 2011; Kankanala *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009; Wilson & Talbot, 2009). La proteína OsCPK13 se acumula tardíamente entre las 24 y las 48 horas del inicio de la infección, coincidiendo con el cambio al crecimiento necrotrófico del hongo, sugiriendo que OsCPK13 podría desempeñar su función en esta etapa.

En general, la regulación transcripcional de los genes *CPK*s se ha asociado a su participación en la respuesta al agente inductor, aunque no siempre se dispone de los estudios funcionales (Klimecka *et al.*, 2007). La acumulación de la proteína OsCPK13 en respuesta a infección, en principio hace suponer que la planta la produce como una respuesta en la defensa, en el intento de evitar que progrese la infección. Dado el caso, es lógico pensar que la sobreexpresión del gen *OsCPK13* en las plantas de arroz otorgaría resistencia frente a *M. oryzae*. Por el contrario, las líneas *OsCPK13*-Ox resultaron ser sensibles al desarrollo de la enfermedad e incluso se ha visto mayor incidencia de lesiones que en plantas de arroz de la variedad sensible Maratelli.

Este fenotipo podría estar asociado a la acumulación constitutiva de ROS observada en las hojas de las líneas *OsCPK13*-Ox, probablemente ligado a la expresión constitutiva del gen peroxidasa *OsPOX22.3*. Las peroxidasas asociadas a la pared celular, incluida la proteína OsPOX22.3, se han visto implicadas en la producción de ROS durante la respuesta de defensa (Baxter *et al.*, 2014). Estas enzimas además cumplen funciones de detoxificación de peróxido de hidrógeno cuando existe una producción excesiva de esta molécula en las células. Esta situación indica una posible desregulación de la producción de ROS en estas líneas. La acumulación de ROS es una de las primeras respuestas de defensa (Torres, 2010). Las moléculas ROS cumplen un papel importante en la inducción de la respuesta hipersensible por muerte celular localizada (HR) para evitar la propagación del patógeno, además de actuar como moléculas señalizadoras (Barna *et al.*, 2012; Perez & Brown, 2014). La acumulación de ROS en los tejidos vegetales está relacionada, en general, con la resistencia ante el ataque por patógenos biótrofos y susceptibilidad a la infección por necrótrofos (Barna *et al.*, 2012). *M. oryzae* es considerado un hongo hemibiótrofo, con un crecimiento inicial biotrófico que cambia a necrotrófico provocando muerte celular en los tejidos de la planta (Wilson & Talbot, 2009). La hipersensibilidad de las plantas *OsCPK13*-Ox frente a la infección por el hongo *M. oryzae* podría estar ligada a la producción descontrolada de ROS en los tejidos foliares, siendo incapaces de defenderse ante la fase necrótrofa del patógeno.

Nuestros estudios muestran que la expresión de genes de defensa no está alterada en las líneas *OsCPK13*-Ox, al menos para los genes analizados y en plántulas jóvenes, estado del desarrollo en el que se realizaron los ensayos de infección. Entre los genes analizados se incluyeron genes codificantes para proteínas relacionadas con patogénesis de la ruta de señalización mediada por SA, tales como *OsPR1a* y *OsPR5*, y genes reguladores (factores de transcripción) de la respuesta de defensa de la vía del JA y del ET como *OsJAmyb* y *OsEREBP*, respectivamente. Se observó que las líneas *OsCPK13*-Ox muestran una acumulación basal y un perfil de inducción durante la respuesta de defensa similar al de líneas no transformadas. Estos datos sugieren que la expresión constitutiva de *OsCPK13* no altera la señalización de los genes de defensa mediados por las rutas del SA, JA o ET. Además se sugiere que el fenotipo de hipersensibilidad a la infección por *M. oryzae* de las líneas *OsCPK13*-Ox no es debido a un bloqueo de la respuesta de defensa.

La producción excesiva de ROS en las líneas *OsCPK13*-Ox podría ser un factor influyente en la formación de las lesiones necróticas observadas en las hojas de las líneas *OsCPK13*-Ox. Lesiones similares se han descrito previamente en mutantes de arroz con alteraciones en la expresión de la peroxidasa *OsPOX22.3* (Wu *et al.*, 2008) y en el metabolismo y producción de ROS (Chen *et al.*, 2013b; Liu *et al.*, 2012a). En la literatura, el fenotipo de lesiones necróticas causado por una desregulación de la muerte celular programada se ha relacionado frecuentemente con la HR que ocurre en respuesta a infección por patógenos y en arroz se han identificado varias proteínas de defensa alteradas en mutantes que desarrollan lesiones espontáneas (Bruggeman *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013b; Fekih *et al.*, 2014; Mizobuchi *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2000). La gran mayoría de estos mutantes presentan una marcada resistencia a enfermedades, principalmente bacterianas, aunque en ciertos casos también frente a *M. oryzae*, debido a que desarrollan una HR rápidamente que detiene la progresión de patógenos biótrofos (Chen *et al.*, 2013b; Feng *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012a; Mizobuchi *et al.*, 2002; Mur *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2010; Undan *et al.*, 2012; Vega-Sanchez *et al.*, 2012;

Wu *et al.*, 2008). En cebada se han estudiado una serie de mutantes con lesiones necróticas para evaluar el fenotipo de resistencia/susceptibilidad frente a patógenos, encontrándose que muestran susceptibilidad a hongos hemibiótrofos como el hongo facultativo *Ramularia collo-cygni* (McGrann *et al.*, 2015). Interesantemente, se han encontrado fuertes semejanzas entre las líneas *OsCPK13*-Ox y el mutante en el gen *MLO* de *Hordeum vulgare*, codificante de una proteína transmembrana de unión a calmodulina (Stein & Somerville, 2002). Este mutante presenta lesiones espontáneas, defectos en el crecimiento y baja productividad (Kjær *et al.*, 1990) además de ser resistente al patógeno biótrofo *Blumeria graminis* pero altamente susceptible al ataque por patógenos hemibiótrofos como *M. oryzae* (Jarosch *et al.*, 1999), *F. graminearum* (Jansen *et al.*, 2005), *Bipolaris sorokiniana* (Kumar *et al.*, 2001) y *R. collo-cygni* (McGrann *et al.*, 2014). La proteína MLO de cebada ha sido descrita como un regulador negativo de la muerte celular y de la resistencia a enfermedades (Peterhansel *et al.*, 1997; Piffanelli *et al.*, 2002), mientras que en este trabajo se ha caracterizado a la proteína OsCPK13 como un regulador positivo de la muerte celular y de la acumulación de ROS, siendo regulador negativo de la resistencia a *M. oryzae*. En este punto se plantea la caracterización del fenotipo de las líneas de sobreexpresión de *OsCPK13* frente a la infección por patógenos estrictamente biótrofos, lo que podría ayudar a determinar si esta proteína cumple una función en la inmunidad de la planta de arroz.

Nuestros estudios han mostrado que la proteína OsCPK13 se encuentra asociada a la membrana plasmática de la célula. La proteína presenta un sitio de miristoilación en el N-terminal, probablemente determinante de su asociación a membrana, tal como se ha descrito para otras proteínas CPKs (Asai *et al.*, 2013; Campos-Soriano *et al.*, 2011; Coca & San Segundo, 2010). Es aquí en la membrana plasmática donde se inicia la producción de ROS en respuesta a reconocimiento del patógeno mediante la activación de las NADPH-oxidasas y las peroxidasas apoplásticas durante la respuesta de defensa basal o ETI (Torres, 2010). La localización de OsCPK13 en membrana plasmática y la acumulación de ROS constitutiva detectada en las líneas *OsCPK13*-Ox sugieren que esta proteína

desempeñaría su función activando la producción ROS, probablemente a través de peroxidasas apoplásticas como OsPOX22.3, en respuesta a las alteraciones en los niveles de calcio citoplasmáticos inducidos durante la respuesta de defensa. La conexión entre las CPKs y la producción de ROS se ha documentado ampliamente en la literatura (Dubiella *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2007; Romeis *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2015). Las NADPH-oxidasas de membrana plasmática y catalasas, ambas implicadas en la producción y detoxificación de ROS, han sido identificadas como dianas de proteínas CPKs (Dubiella *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2015). La activación tardía de proteína OsCPK13 sugiere que participaría en la segunda onda de la explosión oxidativa, y no la primera onda mucho más temprana, que se observan durante la respuesta de defensa.

En resumen, nuestros estudios sugieren OsCPK13 regula la producción de ROS durante la respuesta de defensa, que la expresión constitutiva de *OsCPK13* resulta en la desregulación de la acumulación de ROS y consecuentemente en un incremento de la susceptibilidad al hongo hemibiótrofo *M. oryzae*.

Caracterización de OsCPK13 en la homeostasis de fosfatos

El papel que cumplen varias proteínas en las respuestas de las plantas frente a la insuficiencia de fósforo en el medio de crecimiento y los mecanismos moleculares de esas respuestas vienen siendo estudiados y descritos detalladamente desde hace varios años (Hu & Chu, 2011; Jain *et al.*, 2012; Panigrahy *et al.*, 2009). No obstante, hasta donde se conoce, no se han relacionado proteínas de plantas con funciones en la homeostasis de fosfatos bajo condiciones de alta fertilización fosfatada, como se ha hecho en este trabajo con la proteína OsCPK13. Se ha visto que el gen *OsCPK13* presenta cambios en su expresión transcripcional en raíces bajo condiciones de exceso de fosfatos en el medio de crecimiento, aunque en este trabajo se encontró a menudo que su expresión también está regulada en respuesta a deficiencia de fosfatos (datos no mostrados). Se ha visto previamente la inducción de un gen *CPK* de Arabidopsis en respuesta a deficiencia de

fosfatos (Wu *et al.*, 2003), sin embargo, aunque las CPKs se han implicado en las respuestas a diferentes estímulos ambientales y procesos de desarrollo, no habían sido asociadas directamente a los procesos de adaptación o mantenimiento de la homeostasis de fosfatos. En un estudio previo donde se describe la participación de la quinasa Pstol1 en la tolerancia a deficiencia de fosfatos en plantas de arroz mediante su sobreexpresión (Gamuyao *et al.*, 2012), y en estas plantas se encontró que el gen *OsCPK13* está reprimido constitutivamente, estableciendo nuevamente su relación con el mantenimiento de la homeostasis de fosfatos. Estas evidencias sugieren que la proteína OsCPK13 podría ser un regulador de las respuestas de la planta de arroz a contenidos anormales de fosfatos.

En arroz, así como en otras varias especies vegetales, se han identificado proteínas que cumplen funciones en la ruta de señalización de deficiencia de fosfatos, buscando la adaptación de la planta a estas condiciones de crecimiento (Hu & Chu, 2011; Panigrahy *et al.*, 2009). Así, se han descrito transportadores de fosfatos (Ai *et al.*, 2009; Schünmann *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2012), proteínas de ubiquitinación (Hu *et al.*, 2011), factores de transcripción (Dai *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008), señalizadores (Hou *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009a; Wang *et al.*, 2009c) y miRNAs (Hackenberg *et al.*, 2013a; Hackenberg *et al.*, 2013b) entre otros componentes de las vías de señalización. Las proteínas quinasas son fundamentales en la transducción de señales y existen evidencias de la participación de quinasas en la señalización de la respuesta a diferentes condiciones de fosfatos. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto la inducción rápida de PKA (*Protein kinase A*) y su vía de regulación, mediada por el transportador de fosfatos Pho84 en células deprivadas de fosfatos (Giots *et al.*, 2003; Popova *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se sabe de las funciones de las quinasas de plantas implicadas en este proceso. En Arabidopsis específicamente, se han estudiado mutantes en el gen *AtIPK1* (*Inositol polyphosphate kinase*) que son hipersensibles a concentraciones de fosfatos en el medio de crecimiento (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005) y en arroz la quinasa citoplasmática Pstol1 (*Phosphorus-starvation tolerance*) confiere tolerancia a deficiencia de fosfatos particularmente en la variedad silvestre Kasalath (Gamuyao *et al.*, 2012). Se ha establecido también el papel que

podría tener el Ca^{+2} en la detección y señalización por fosfatos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), en las que se ha encontrado incrementos en los niveles de una Ca^{+2}-ATPasa, importante para el transporte de calcio, cuando las raíces eran sometidas a bajas concentraciones de fosfatos (Muchhal *et al.*, 1997). En este contexto, la proteína de membrana OsCPK13, sensora de calcio y transmisora de la señal por fosforilación de proteínas, podría tener una función en la detección de los niveles de fosfatos y la señalización posterior para la adaptación de la planta a estas condiciones de crecimiento con contenidos anormales de fosfatos.

Los estudios de actividad GUS guiada por el promotor *OsCPK13*, muestran mayor actividad en tejidos de nueva formación tanto en hojas como en raíces. Esta distribución de la actividad del promotor *OsCPK13* se podría corresponder con la habilidad que tiene el fósforo de movilizarse dentro de la planta desde los tejidos viejos a los tejidos más nuevos, donde este nutriente es mayormente requerido (Mahler, 2004). El promotor de *OsCPK13*, se ha observado también activo específicamente en los tejidos acompañantes de los haces vasculares de las raíces. Varios componentes de la ruta de señalización por fosfatos y que están relacionados con la detección, transporte y translocación de este nutriente localizan su actividad también en los haces vasculares, incluidos *ath-MIR399*, *OsIPS1*, *OsPHO2*, *Pstol1*, así como también de los transportadores de fosfatos *OsPT1*, *OsPT2* y *OsPT6* (Ai *et al.*, 2009; Aung *et al.*, 2006; Gamuyao *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Por lo tanto, nuestros estudios indican que *OsCPK13* es co-expresado con otros componentes de la vía de señalización de la homeostasis de fosfatos en los tejidos vasculares, responsables de la movilización del nutriente a toda la planta.

El fosfato es relativamente inmóvil en el suelo, por lo que cuando las plantas crecen en condiciones donde la disponibilidad de fosfatos es limitada, en el sistema radicular se desencadenan una serie de respuestas adaptativas ante el estrés por fosfatos o PSRs (*Phosphate stress responses*), incluyendo cambios en la morfología y arquitectura

de la raíz, exudación de ácidos orgánicos y fosfatasas al suelo, inducción o mejora de la expresión de transportadores de alta afinidad y establecimiento de simbiosis con micorrizas (Zhang *et al.*, 2014b). En este trabajo se ha visto que la sobreexpresión de *OsCPK13* en las plantas provoca una disminución de la longitud de la raíz principal y un aumento del número de raíces secundarias en condiciones normales de crecimiento. Se sabe que los cambios en la elongación de las raíces principales es un fenómeno típico en respuesta a la disponibilidad de fosfatos en arroz, y en Arabidopsis existen estudios que demuestran que bajas concentraciones de fosfatos favorece el crecimiento de raíces laterales en detrimento de la elongación de la raíz principal (Linkohr *et al.*, 2002; Reymond *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2001; Wissuwa, 2003; Yi *et al.*, 2005). La alteración de genes relacionados con la ruta del fosfato en arroz provoca cambios en la arquitectura del sistema radicular, como la mutación en el gen *OsSIZ1*, homólogo de *AtSIZ1*, responsable de la sumoilación de *AtPHR1*, provoca la inhibición del crecimiento de la raíz principal y un aumento del número y longitud de raíces secundarias y pelos radiculares (Wang *et al.*, 2011), fenotipo similar al observado en las líneas *OsCPK13*-Ox. La sobreexpresión del factor de transcripción *OsMYB2P-1* ocasiona una reducción en la longitud de la raíz principal y del número de raíces secundarias en condiciones de suficiencia de fosfatos, mientras que en condiciones de bajas concentraciones del nutriente aumenta la longitud de la raíz principal y el número de raíces adventicias (Dai *et al.*, 2012). Así también, plantas de arroz sobreexpresoras de *OsPHR2* presentan raíces primarias y adventicias más largas, cuando son crecidas en deficiencia de fosfatos en el medio y mayor proliferación de pelos radiculares en condiciones normales (Zhou *et al.*, 2008). La línea *Itn1*, mutante en el gen *OsPHO2* presenta raíces primarias y adventicias significativamente más largas en condiciones de nula fertilización fosfatada (Hu *et al.*, 2011). Plantas sobreexpresoras de la quinasa Pstol1 presentan raíces más largas y un mayor área radicular que las plantas silvestres, tanto en condiciones de suficiencia como en deficiencia de fosfatos (Gamuyao *et al.*, 2012). Según estas observaciones, las raíces de las plantas sobreexpresoras de *OsCPK13* presentan un fenotipo que podría corresponderse o

mimetizar ciertos aspectos de la arquitectura radicular frente a condiciones anormales de fosfatos en el medio de crecimiento, a causa de tener alterada la vía de señalización.

La sobreacumulación de la proteína OsCPK13 en las plantas de arroz causa severos defectos en el crecimiento y el desarrollo, tanto vegetativo como reproductivo y se ha asociado este fenotipo con la acumulación excesiva de fosfatos en la parte aérea de la planta. Fenotipos similares se han descrito para líneas alteradas en algunos de los componentes de la ruta de señalización por fosfatos en plantas de arroz. Por ejemplo, la sobreexpresión individual de los factores de transcripción *OsMYB2P-1* y *OsPHR2* provoca un aumento en el contenido de fosfatos en las plantas crecidas en condiciones normales, presentando un crecimiento retardado, menor producción de hijuelos, biomasa y altura; mientras que en condiciones de deficiencia de fosfatos las plantas tienen un desarrollo igual o mejor que plantas silvestres (Dai *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008). Igualmente, las líneas *Itn1*, mutantes en *OsPHO2*, la enzima conjugadora de ubiquitina que regula al transportador de fosfatos OsPT2, muestran menor altura, menor producción de hijuelos, reducida fertilidad y acumulación excesiva de fósforo cuando crecen en condiciones normales de fosfatos, revirtiéndose este fenotipo cuando las plantas crecen en medio deficiente en el nutriente (Hu *et al.*, 2011). Las plantas sobreexpresoras de *OsSPX1* y *OsSPX3*, así como las de expresión reducida de *OsSPX1* producen menor biomasa tanto en condiciones de suficiencia como en deficiencia de fosfatos, y esta última presenta además un aumento en el contenido de fosfatos (Wang *et al.*, 2009a; Wang *et al.*, 2009c). La sobreexpresión del transportador *OsPT2* incrementa el contenido de fosfatos en las plantas de arroz y ocasiona un crecimiento retardado en condiciones normales, mientras que a bajas concentraciones de fosfatos mejora el crecimiento a niveles comparables con plantas silvestres (Liu *et al.*, 2010). Líneas de arroz mutantes en *OsSIZ1* muestran defectos en el desarrollo vegetativo, con altura y tamaño reducidos, y en el reproductivo, produciendo panículas pequeñas y reducido número de flores y semillas (Wang *et al.*, 2011), mientras que la sobreexpresión heteróloga de este gen en *Agrostis stolonifera* deriva en un aumento del contenido de fosfatos en parte aérea (Li *et al.*, 2013b). Líneas de RNA

interferencia para Pstol1 en la variedad de arroz tolerante a bajas concentraciones de fosfatos, presentan un menor crecimiento que la variedad nativa (Gamuyao *et al.*, 2012). En tejidos radiculares en cambio, las líneas *OsCPK13*-Ox no presentan una acumulación diferencial de fosfatos, resultados similares a los obtenidos en las líneas de sobreexpresión de *OsPHR2* y mutantes en *OsPHO2*, lo que resulta particularmente interesante ya que ambos genes han sido relacionados con la translocación del fosfato a la parte aérea de las plantas (Hu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2008). La sobreexpresión de *OsMYBP2-1* y *OsPT2* sin embargo, resulta en la acumulación de mayores cantidades de fósforo en raíces, y en estos casos ambas han sido relacionadas además de la translocación a la parte aérea, con la absorción del nutriente desde el suelo (Dai *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010). El desbalance en la acumulación de fósforo en las líneas que tienen alterada la ruta de señalización por fosfatos demuestra que existe una regulación muy fina de la homeostasis de este mineral y que la desregulación de uno de los componentes arrastra consigo la alteración de los componentes por debajo de la ruta de señalización cuyos efectos son acumulativos. Las evidencias demuestran que tanto la acumulación de fosfatos en la parte aérea como los defectos fenotípicos en las líneas *OsCPK13*-Ox son consecuencia de una alteración en la ruta de homeostasis de fosfatos y que podría relacionarse a la proteína OsCPK13 con la translocación de fosfatos a la parte aérea de las plantas de arroz.

Desde hace décadas se vienen realizando estudios sobre la interacción Zinc-Fósforo (Zn-P) y se sabe que la principal causa de toxicidad por fosfatos en plantas es la que ocurre como consecuencia de una deficiencia de Zn (Bouain *et al.*, 2014; Zhu, 2001) e incluso la falta de Zn causa una inducción de ciertos transportadores de fosfatos (Huang *et al.*, 2000). No obstante, poco se sabe sobre los síntomas de los efectos tóxicos de la sobreacumulación de fósforo en las plantas, puesto que esta no es una situación corriente en los suelos del mundo. Entre los síntomas de toxicidad por exceso de fosfatos se mencionan: inhibición del crecimiento, clorosis intervenal, senescencia acelerada y necrosis en las hojas (Silber *et al.*, 2002). Sobre los niveles tóxicos en los tejidos, se ha descrito que en arroz el nivel crítico entre la suficiencia y la toxicidad del contenido de

fósforo en hojas es del 1% en la madurez (De Datta, 1981) y en este trabajo se vio que en las hojas de las líneas *OsCPK13*-Ox existe hasta un 2,5% del peso seco, muy por encima del nivel crítico y más del doble del contenido observado en hojas de las plantas silvestres bajo condiciones normales, que no llegan al 1,5% de contenido de fósforo.

Nuestros estudios también muestran que existe una relación entre el desarrollo de lesiones necróticas espontáneas en las hojas viejas de las plantas *OsCPK13*-Ox de arroz y la toxicidad por exceso de fosfatos, puesto que estas lesiones desaparecen cuando las plantas son crecidas con baja fertilización fosfatada. Un fenotipo similar de desarrollo de lesiones necróticas asociado a la toxicidad del fosfato se ha reportado en líneas de alteración de los componentes de la ruta del fosfato como en plantas sobreexpresoras de *OsPHR2*, de *OsPT2*, mutantes en *OsPHO2* y de expresión reducida de *OsSPX1* (Hu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009a; Zhou *et al.*, 2008). Las líneas de interferencia *OsSPX1* presentan además alta sensibilidad al estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2009a; Wang *et al.*, 2013a). En general, las plantas sufren estrés oxidativo en las hojas ante la deficiencia de fosfatos, debido a la reducción en fotosíntesis por falta de fósforo, la foto-inhibición y el consecuente estrés foto-oxidativo en cloroplastos que causa la pérdida de clorofilas y la peroxidación de lípidos (Hernandez & Munne-Bosch, 2015). Similarmente, el mutante de Arabidopsis en el gen codificante para el transportador de fosfatos PHT4;6 muestra una elevada producción basal de ROS, la inducción constitutiva de las respuestas de defensa y el desarrollo de lesiones necróticas espontáneas (Hassler *et al.*, 2012). Estos trabajos establecen una conexión entre el estrés oxidativo, el desarrollo de lesiones necróticas y la homeostasis de fosfatos, además de con las respuestas inmune de la planta, al igual que lo observado en las líneas *OsCPK13*-Ox.

En este trabajo se han identificado genes reguladores de la vía de señalización por fosfatos que tienen alterada su expresión en las líneas *OsCPK13*-Ox. En raíces se observaron niveles de acumulación transcripcional elevados en el transportador de fosfatos *OsPT2* y su regulador negativo *OsPHO2*, y así también se vio una represión en la

expresión de la fosfatasa *OsPAP10*. La proteína OsPT2 ha sido descrita como un transportador de fosfatos de baja afinidad que cumple funciones en los haces vasculares de las raíces y específicamente en la membrana plasmática de las células, siendo responsable de la translocación del fosfato desde las raíces hasta la parte aérea de la planta de arroz (Ai *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). La expresión de este transportador también se ha visto inducida en líneas sobreexpresoras del factor de transcripción *OsMYB2P-1* y reprimidas en sus líneas de RNA interferencia, observándose la regulación contraria para *OsPHO2* (Dai *et al.*, 2012). Los cambios en la acumulación de OsPT2 en las líneas *OsCPK13*-Ox podrían ser responsables del exceso de fósforo en la parte aérea de estas plantas. Este transportador es regulado positivamente por el factor de transcripción OsPHR2, el cual no presenta cambios en las líneas sobreexpresoras de *OsCPK13*. Sin embargo, su regulador negativo *OsPHO2* se ve inducido en estas líneas, por lo tanto, si la regulación directa de la expresión de *OsPT2* es debida a los altos niveles de OsPHO2 en las líneas *OsCPK13*-Ox, cabría esperar que el transportador esté reprimido, como ocurre en el caso del trabajo presentado por Dai *et al.* (2012). Este no es el caso de las líneas *OsCPK13*-Ox, sugiriendo que el exceso de acumulación de la proteína OsCPK13 es la responsable de la inducción del gen *OsPT2*. En cambio, la inducción de *OsPHO2* podría ser resultado de la autorregulación de la ruta de fosfatos a consecuencia de la acumulación excesiva de fosfatos, en el intento de degradar el exceso del transportador OsPT2, que podría ser el responsable de los efectos tóxicos de la acumulación de fosfatos en la parte aérea. No se han visto diferencias en la expresión de *OsPT6* en las líneas *OsCPK13*-Ox. Este transportador ha sido descrito como implicado principalmente en la absorción de fosfatos del suelo (Ai *et al.*, 2009). Estas observaciones sugieren que las líneas *OsCPK13*-Ox tienen alterada principalmente la translocación de fosfatos desde las raíces a la parte aérea.

Por otra parte, las fosfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ciertos sustratos ricos en fosfatos, actuando como un "reciclador" de grupos fosfatos, haciendo disponible al fósforo para su utilización o remobilización (Schenk *et al.*, 2013). Estas enzimas son parte de la ruta de señalización por fosfatos y generalmente son necesarias

en caso de insuficiencia de fosfatos en la planta. En las líneas *OsCPK13*-Ox, la fosfatasa *OsPAP10* se encuentra reprimida, probablemente debido a la acumulación excesiva de fósforo, por lo que no es necesario el proceso de reutilización de fosfatos. En otros casos de sobreacumulación de fosfatos en plantas de arroz, como en la sobreexpresión de *OsMYB2P-1* y *OsPHR2* y en mutantes de *OsPHO2*, no se ha visto la represión de las fosfatasas, sino más bien al contrario (Dai *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010). Esta característica molecular podría ser un indicador fiable de los niveles tóxicos de fosfatos que poseen estas plantas sobreexpresoras de *OsCPK13*.

Se encontró además que los niveles de expresión de *OsCPK13* no están alterados en líneas sobreexpresoras de los miRNAs *osa-MIR399* y *osa-MIR827*, que están implicados en esta ruta como reguladores negativos de *OsPHO2* y *OsSPX1*, respectivamente. Se podría entonces considerar que las funciones de la proteína OsCPK13 en la regulación de la vía de señalización por fosfatos no está por debajo de la regulación por estos miRNAs. Según este análisis, OsCPK13 cumple funciones en la ruta del fosfato en condiciones de suficiencia de fosfatos, por encima de OsPT2 y de forma independiente de la vía regulada por OsSPX1 y OsPHO2. En la Figura 31 se muestra un modelo adaptado de Liu *et al.* (2010) para la regulación de la homeostasis en condiciones de suficiencia de fosfatos en arroz mediada por OsCPK13.

La expresión de *OsCPK13* está regulada en presencia de un exceso de fosfatos en el medio y su sobreexpresión induce al transportador de fosfatos de baja afinidad *OsPT2* causando una acumulación excesiva y tóxica de fosfatos en la parte aérea. Estos datos podrían indicar que la proteína OsCPK13 señaliza las altas concentraciones de fosfatos en las raíces, activando al transportador que media la translocación del nutriente a la parte aérea, sugiriendo a OsPT2 como posible diana de OsCPK13. Además, el hecho de que ambas proteínas se localizan en la membrana plasmática celular y en los mismos tejidos facilitaría su posible interacción. También, la secuencia aminoacídica de OsPT2 presenta varios motivos de fosforilación, lo que apunta a una regulación del transportador por

fosforilación. Sin embargo, los estudios de interacción OsCPK13-OsPT2 en expresión transitoria en *N. benthamiana* mediante FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) realizados en el transcurso de este trabajo no mostraron interacción entre ambas proteínas. No podemos descartar que, a pesar de estos resultados, haya interacción entre ambas proteínas y que en las condiciones realizadas y mediante FRET no pueda ser observada por deficiencias en la técnica. Experimentos adicionales serían necesarios para determinar la relación entre OsCPK13 y el transportador OsPT2, y entender a nivel molecular el modo de acción de OsCPK13 en la vía de señalización de fosfatos.

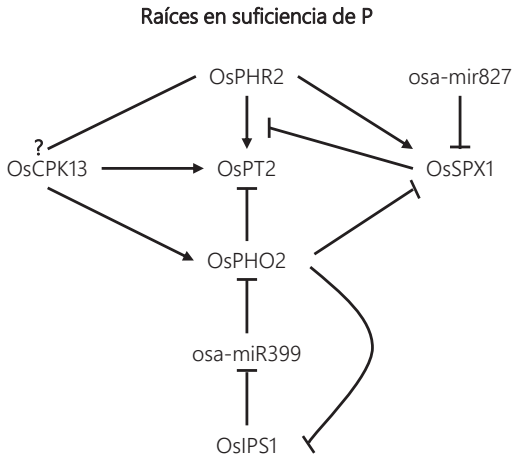

Figura 31. Modelo propuesto para la regulación de la homeostasis de fosfatos mediada por OsCPK13 en condiciones de suficiencia de fosfatos. Adaptado de Liu *et al.* (2010).

En resumen, nuestros estudios muestran que OsCPK13 regula la homeostasis de fosfatos en las plantas de arroz modulando su translocación de la raíz a la parte aérea. La sobreexpresión de *OsCPK13* resulta en alteraciones morfológicas en las raíces, una mayor absorción de fosfato, su sobreacumulación en la parte aérea, y los consecuentes efectos fenotípicos causados por la toxicidad del exceso de fosfato, tales como el desarrollo de lesiones necróticas en las hojas, la reducción del crecimiento y una menor producción de semillas. Así, OsCPK13 podría representar una diana de mejora en la eficiencia de absorción de fosfato en el cultivo del arroz en suelos pobres en este macronutriente, que

permita reducir el uso de fertilizantes fosfatados en la práctica agrícola, aunque siempre modulando los niveles de acumulación de esta proteína reguladora.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la proteína OsCPK13 propuesta hace años como diana de mejora genética para la tolerancia a sequía y altas concentraciones salinas (Saijo *et al.*, 2000), también puede mejorar el aprovechamiento del fosfato en el cultivo de arroz. Sin embargo, la aproximación no es directa y ha de tomarse con precaución, modulando estrictamente los niveles de proteína, puesto que si la acumulación de la proteína supera un determinado umbral puede tener consecuencias graves en el crecimiento, desarrollo y productividad de la planta de arroz, además de aumentar la susceptibilidad a patógenos. Esta situación está motivada por tratarse de una proteína implicada en varias vías de señalización, y por regular la acumulación de ROS que además de ser moléculas señalizadoras de muchas respuestas de la planta y procesos de desarrollo, son moléculas tóxicas que pueden causar daño celular y su producción ha de estar finamente regulada.

El descubrimiento del efecto negativo de la acumulación excesiva de OsCPK13 sobre la sensibilidad frente a la piriculariosis y sobre el desarrollo de la planta, podría ser influyente en la visión de que la sobreexpresión de ese gen podría ser una vía interesante para la obtención de variedades con un mejor desempeño en suelos salinos, en condiciones de sequía y con bajas temperaturas (Saijo et al., 2000; Wang et al., 2008). Queda una vez más demostrado que pueden existir efectos pleiotrópicos importantes cuando se sobreexpresan genes que podrían estar implicados en varios procesos fisiológicos de la planta. Esta situación podría ser objeto de estudios posteriores, pudiendo utilizarse promotores inducibles frente a una situación específica, como sequía, salinidad, frío o deficiencia de fosfatos, en el intento de evitar los efectos negativos de una sobreacumulación de forma constitutiva.

Capítulo II

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE miRNAs DE ARROZ IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE Y EN LA RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO

Antecedentes

En el grupo de investigación se realizó previamente un análisis masivo de pequeños RNAs con el propósito de identificar miRNAs cuya expresión esté regulada por el tratamiento con elicitores del hongo *M. oryzae*. Así, utilizando este análisis, se seleccionarían aquellos miRNAs que puedan desempeñar un papel regulador en la respuesta inmune de las plantas de arroz. El análisis se realizó a partir de la secuenciación masiva de pequeños RNAs (sRNA-seq) en la plataforma Illumina Solexa®. El método utilizado para la secuenciación en esta plataforma se resume en la Figura 32, y consiste en la ligación de adaptadores de RNAs a los extremos 3' y 5' de los sRNAs, los cuales, como resultado del proceso de maduración mediado por proteínas DCL, poseen grupos hidroxilo y fosfato, respectivamente. Por medio de una reacción de retrotranscripción (RT) se realiza la síntesis del cDNA que luego es amplificado utilizando cebadores específicos que contienen secuencias señalizadoras, utilizadas para diferenciarlas de los fragmentos de la reacción de ligación de RNA y como marcadores para las lecturas de secuenciación.

También se ha hecho un análisis de secuenciación masiva de RNAs mensajeros degradados por miRNAs (degradoma). En la Figura 33 se muestra el método utilizado, denominado PARE (*Parallel Analysis of RNA Ends*), descrito por German *et al.* (2009) y utilizado en arroz por Zhai *et al.* (2014). Los miRNAs de plantas regulan la acumulación de sus dianas predominantemente a través del corte del RNA mensajero, lo que ocurre generalmente entre el décimo y el undécimo nucleótido desde el extremo 5' del miRNA. El fragmento 3' del tránscrito diana está poliadenilado y posee un grupo fosfato en su extremo 5', características que hacen a estos fragmentos compatibles para la ligación de adaptadores mediante ligasas de RNA. Luego de la extracción de RNAs poliadenilados, se añaden adaptadores con el sitio de reconocimiento por la enzima *Mme*I al extremo 3' y se realiza la síntesis de cDNA. Tras la amplificación por PCR se digiere el producto por la enzima *Mme*I para obtener fragmentos del mismo tamaño que contengan los nucleótidos con los cuales emparejan los miRNAs, y se purifican por geles. A estos fragmentos se

añaden después unos adaptadores de DNA de doble cadena en su extremos 3' y se procede a la secuenciación masiva del degradoma.

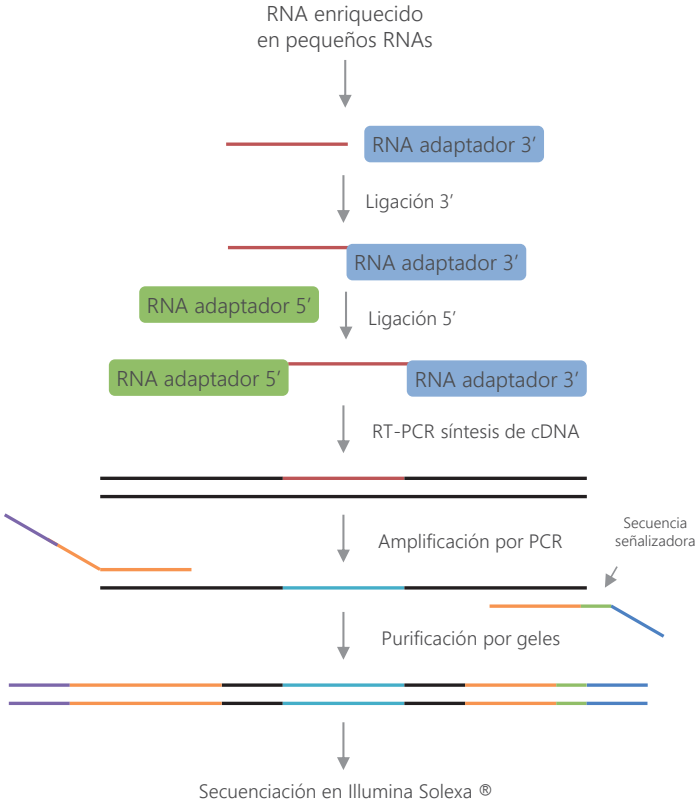

Figura 32. Esquema del proceso de obtención de genotecas para la secuenciación masiva de pequeños RNAs en la plataforma Illumina Solexa®. A 1 µg de RNA enriquecido en fragmentos pequeños se añaden RNAs adaptadores específicos a los extremos 3' y 5'. A partir de estos fragmentos se realiza la síntesis del cDNA complementario por retrotranscripción. El cDNA sintetizado se utiliza como molde para la amplificación por PCR utilizando cebadores específicos de las secuencias adaptadas en los extremos. El cebador 3' contiene además una secuencia señalizadora. Luego de la purificación y selección de los amplicones en geles PAGE, se someten a la secuenciación masiva en la plataforma Illumina Solexa®. Adaptado del protocolo para la utilización del kit TruSeq Small RNA de Illumina®.

Los resultados de estos análisis fueron la base para la selección de algunos miRNAs potencialmente implicados en las respuestas de defensa de la planta de arroz y para su posterior caracterización funcional tanto frente a infección por *M. oryzae* como frente a estrés hídrico. En el trabajo publicado por Baldrich *et al.* (2015) se describe el análisis de sRNA-seq realizado en respuesta a elicitores de *M. oryzae*, en plantas de arroz variedad Nipponbare, en tejidos foliares y radiculares a dos tiempos post-tratamiento (30

minutos y 2 horas). Así también se detalla el análisis de degradoma realizado en hojas tratadas en las mismas condiciones y a los mismos tiempos que el sRNA-seq. El esquema experimental se resume en la Figura 34. En ese trabajo se realizó el cribaje informático de los datos de la secuenciación masiva tanto de pequeños RNAs como del degradoma, así como el mapeo de las secuencias con el genoma del arroz.

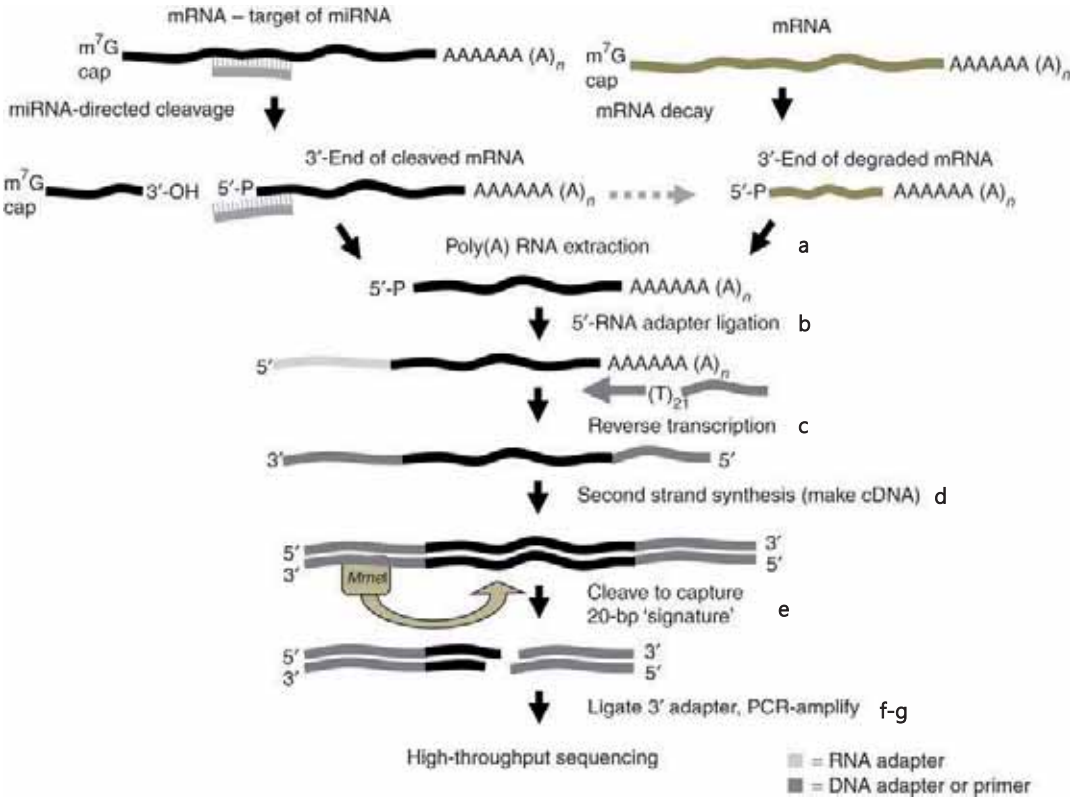

Figura R33. Esquema de la construcción de genotecas PARE. Esquema del procedimiento seguido para la obtención de genotecas "*Parallel Analysis of RNA Ends*" para la identificación de dianas cortadas por miRNAs: **(a)** Extracción del RNA poliadenilado; **(b)** Ligación de RNAs adaptadores al extremo 5′ de los RNAs de cadena simple que hayan sido cortados por miRNAs o degradados por otros procesos, los cuales son competentes para la ligación por poseer un grupo monofosfato; **(c)** Síntesis de cDNA a partir de esos fragmentos de RNAs con un cebador dT; **(d)** Amplificación del cDNA por PCR; **(e)** el producto de PCR es digerido por la enzima de restricción *Mme*I para generar fragmentos de igual tamaño que después se purifican por PAGE; **(f)** Ligación de adaptadores de doble cadena al extremo 3´ de los fragmentos digeridos y purificados; **(g)** Amplificación por PCR con cebadores específicos y purificación del producto que será utilizado para la secuenciación masiva. Esquema publicado por German *et al.* (2009).

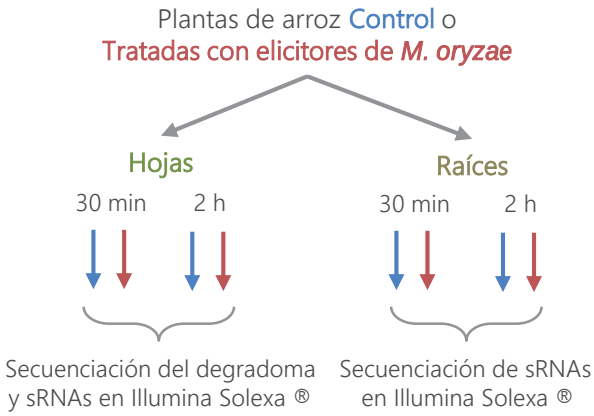

Figura 34. Esquema experimental de la obtención de genotecas para la secuenciación masiva de pequeños RNAs y de tránscritos degradados por miRNAs en la plataforma Illumina Solexa®. Se trataron hojas y raíces de plantas de arroz variedad Nipponbare con una suspensión de elicitores de *M. oryzae* a una concentración de 300 µg/ml. Las muestras para la extracción de RNAs fueron tomadas a los 30 minutos y 2 horas después del tratamiento. Además se tomaron muestras de tejidos tratadas con una solución control. Cada genoteca se realizó por triplicado. La secuenciación de los pequeños RNAs (sRNAs) se realizó en la plataforma Illumina Solexa® tanto en las genotecas de hojas como de raíces. Los tejidos foliares se utilizaron además para la obtención de genotecas para la secuenciación de tránscritos degradados por miRNAs (degradoma). Esquema experimental del trabajo publicado por Baldrich *et al.* (2015).

Resultados

1. Selección de miRNAs con acumulación alterada durante la respuesta inmune de plantas de arroz

En este trabajo de tesis se propuso identificar miRNAs implicados en la respuesta de defensa de la planta de arroz. Para ello se analizaron los datos del sRNA-seq generado previamente en el grupo de investigación. Los criterios utilizados para la selección de los miRNAs fueron fundamentalmente tres: 1) miRNAs regulados negativamente a tiempos cortos en tejidos foliares durante la respuesta frente a elicitores. El cambio logarítmico en la acumulación relativa entre el tratamiento y el control se fijó en -0,5 o menos. Una regulación negativa implicaría que las proteínas dianas cumplirían una función positiva en las respuestas de defensa de la planta de arroz frente a *M. oryzae*. Un cambio a tiempos cortos podría suponer que estos miRNAs son reguladores de la respuesta temprana frente a infección; 2) miRNAs cuya abundancia promedio en condiciones control en tejidos foliares sea al menos superior a 20 lecturas. Este valor ha sido fijado también como umbral por Campo *et al.* (2013) y ayuda a seleccionar miRNAs que puedan ser detectados por análisis *Northern blot* o por qRT-PCR; y 3) miRNAs cuyas potenciales dianas codifiquen proteínas que pudieran cumplir funciones en las respuestas de defensa o frente a estrés abiótico. El análisis del sRNA-seq utilizando los criterios indicados llevó a la selección de 10 miRNAs, que están listados en la Tabla 4.

Utilizando el servidor en línea del programa bioinformático *RNA-fold web server* (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi) se ha predicho la estructura secundaria de los precursores de los miRNAs (pre-miRNAs) seleccionados que se muestran en la Figura 35, indicando la posición donde se encuentra cada uno de los miRNAs. Los 10 miRNAs están organizados en 7 pre-miRNA distintos, puesto que los miRNAs osa-

miR390-3p y osa-miR390-5p, los osa-miR535-3p y osa-miR535-5p, y los osa-miR1847.1 y osa-miR1847.2 se encuentran a pares en los mismos precursores.

Todos los miRNAs seleccionados cumplen con los criterios mencionados más arriba (Tabla 4), excepto osa-miR535-3p, que si bien presenta una disminución en su acumulación, no llega al umbral fijado. Este miRNA, sin embargo, está asociado a osa-miR535-5p por ser ambos parte del precursor *osa-MIR535* y por este motivo también se lo tuvo en cuenta en análisis posteriores. Como se muestra en la Figura 36, la acumulación de los miRNAs seleccionados está regulada negativamente a tiempos tempranos luego del tratamiento con elicitores de *M. oryzae* (30 minutos). Esta represión se mantiene hasta 2 horas después del tratamiento en 5 de los miRNAs en estudio (osa-miR535-3p, osa-miR535-5p, osa-miR1319a, osa-miR1847.2 y osa-miR5808), mientras que en otros 5 (osa-miR390-3p, osa-miR390-5p, osa-miR397a, osa-miR397b y osa-miR1847.1) se observa una ligera inducción en su acumulación después de 2 horas del tratamiento.

Tabla 4. Selección de miRNAs reprimidos en respuesta al tratamiento con elicitores de *M. oryzae*. (a) Valores logarítmicos del cambio de acumulación en respuesta al tratamiento con una suspensión de elicitores de *M. oryzae* (300 µg/ml) en comparación con la solución control en los tejidos indicados de la planta de arroz (var. Nipponbare) y a los tiempos de tratamiento indicados. El criterio de selección fue: FC≤-0,5 en hojas). **(b)** Valores del promedio de lecturas (*reads*), en condiciones control sin tratar. El criterio de selección fue: R≥20 en hojas.

miRNA	FC: Cambio en la acumulación [a]				R: Abundancia [b]	
	Hojas		Raíces			
	30 min	2 hs	30 min	2 hs	Hojas	Raíces
osa-miR390-3p	-0,8254	0,1711	0,2145	0,8418	23	11,5
osa-miR390-5p	-0,6113	0,0197	0,0219	0,2568	148,5	23
osa-miR397a	-0,8062	0,1325	-0,2726	0,2601	2498	618,5
osa-miR397b	-0,8062	0,1325	-0,2726	0,2601	2498	618,5
osa-miR535-3p	-0,3645	-0,4095	-0,7151	0,1637	80	10,5
osa-miR535-5p	-0,5103	-0,2370	-0,3407	0,3861	238,5	36
osa-miR1319a	-1,7514	-1,7675	1,6069	0,0117	22,5	2,5
osa-miR1847.1	-0,9889	0,2890	2,0219	-	26,5	1
osa-miR1847.2	-1,0885	-0,2147	-0,7855	0,8418	84	8
osa-miR5808	-0,6269	-0,2105	0,6499	1,0788	71	9

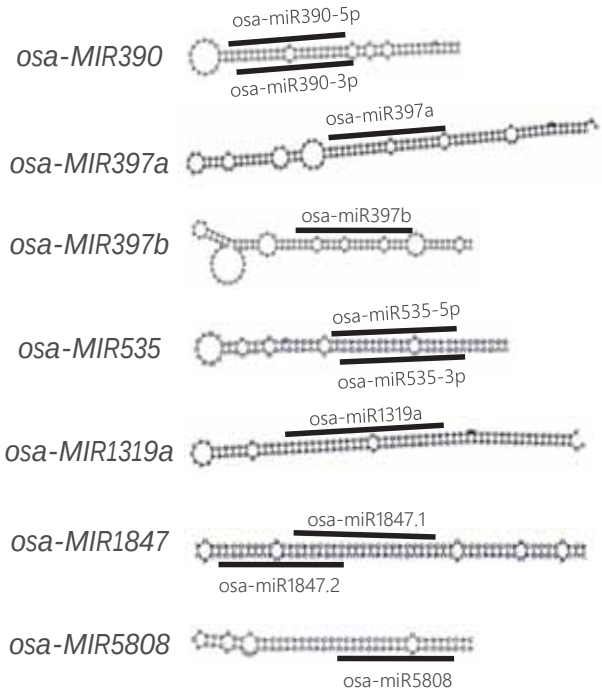

Figura 35. Precursores de los miRNAs seleccionados por su respuesta frente a elicitores de *M. oryzae*. Representación de la estructura secundaria en forma de horquilla de los pre-miRNAs seleccionados. Las secuencias de los pre-miRNAs fueron consultadas en la base de datos miRBase (www.mirbase.org) y sus estructuras secundarias fueron modeladas en la plataforma bioinformática *en línea RNAfold web server* (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi). Las barras indican la posición en la que se encuentran los miRNAs maduros producto del procesamiento de estos pre-miRNAs.

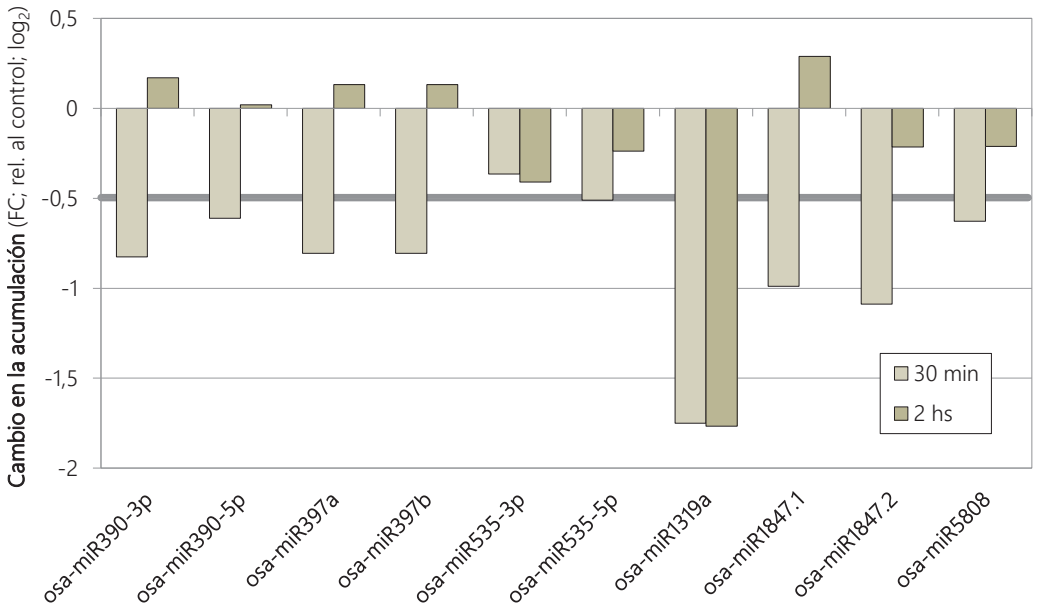

Figura 36. Perfiles de acumulación de los miRNAs seleccionados en respuesta a tratamiento con elicitores de *M. oryzae* en hojas de arroz. La gráfica representa el cambio logarítmico de la acumulación de los miRNAs seleccionados en respuesta a tratamientos con una suspensión de elicitores de *M. oryzae* (300 µg/ml) en hojas de arroz var. Nipponbare, a los 30 minutos y 2 horas post-tratamiento. Valores de la acumulación cuantificados por análisis de sRNA-seq. Se indica con una barra ancha el umbral del cambio en la acumulación fijado para la selección de los miRNAs (FC≤-0,5).

En general, los miRNAs maduros que son producto del procesamiento de un mismo precursor, tienen el mismo perfil de expresión, como ocurre en este caso para los miRNAs de los precursores *osa-MIR390* y *osa-MIR535*. En este análisis se encontró llamativo que los miRNAs osa-miR1847.1 y osa-miR1847.2 tengan una respuesta opuesta a las 2 horas de tratamiento, el primero presentando una inducción (0,28) y el segundo reprimido (-0,21). Una posible explicación podría ser que estos miRNAs controlen la regulación de ciertos tránscritos relacionados con defensa a tiempos cortos, y que con el paso del tiempo tengan un papel regulador de otros procesos fisiológicos. Los resultados para los niveles de acumulación de los miRNAs maduros osa-miR397a y osa-miR397b son exactamente iguales. El miRNA con la respuesta más fuerte en respuesta a elicitores es osa-miR1319a, observándose una represión continuada desde los 30 minutos (-1,75) hasta las 2 horas (-1,76).

2. Características de los miRNAs seleccionados

Las características genómicas, secuencias y evidencias experimentales de los miRNAs seleccionados están recogidas en la Tabla 5, y es la información que consta en las bases de datos indicadas. Según los datos, todos los miRNAs seleccionados han sido previamente detectados mediante sRNA-seq de arroz y los osa-miR390-5p y osa-miR535-5p además fueron analizados por *Northern blot*. No se han encontrado datos que demuestren que estos miRNAs hayan sido relacionados previamente con las respuestas de defensa.

Según Zhao & Li, (2013), los pre-miRNAs de *O. sativa* provienen de intrones (aproximadamente 49% de ellos), de regiones intergénicas (35% de los casos), de UTRs (cerca del 12%) o de exones (sólo 4%). El análisis genómico de los 7 precursores seleccionados muestra que 5 de ellos se ubican en zonas intergénicas (*osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b*, *osa-MIR535* y *osa-MIR1319a*), uno de ellos es intrónico (*osa-MIR1847*, ubicado dentro del tercer intrón del gen de resistencia a enfermedades *OsRPM1*) y uno ubicado en la región 3' UTR del gen que codifica el factor de

transcripción *OsZOS9-16* (*osa-MIR5808*). Cabe destacar que el precursor *osa-MIR1319a* se encuentra en una disposición genómica especial, ya que en la cadena opuesta del DNA se ubica el gen *OsLTPL6*, codificante para una proteína de transporte de lípidos (*Lipid transfer protein-like*). En la Figura 37 se muestra un esquema de la ubicación en el genoma de los precursores intragénicos *osa-MIR1827* y *osa-MIR5808*, y de *osa-MIR1319a*.

Tabla 5. Características generales de los miRNAs seleccionados. (a) Secuencia nucleotídica de los miRNAs según la base de datos miRBase (www.mirbase.org). (b) Métodos utilizados y evidencias experimentales en los trabajos previos para la detección de los miRNAs. Consultado en miRBase y los artículos indicados. (c) Corresponde a la posición en el genoma del precursor, indicando el cromosoma, las coordenadas específicas y la cadena (+o-) en la que está codificado. (d) Tipo de precursor relativo a su posición génica: intergénica o intragénica (exónica, intrónica o secuencias no traducidas-UTR). En caso de ser intragénica, se indica además el locus y el nombre del gen que lo contiene. Consultado en la base de datos *Rice Genome Annotation Project* (http://rice.plantbiology.msu.edu/).

miRNA	Secuencia del miRNA [a]	Evidencia experimental [b]	Ubicación genómica del precursor [c]	Tipo de precursor [d]
osa-miR390-3p	CGCUAUCUAUCCUGAGCUCC	SmallRNA-seq Illumina (Du *et al.*, 2011)	Chr3: 34275140-34275230 Cadena [−]	Intergénico
osa-miR390-5p	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	*Northern blot* (Sunkar *et al.*, 2005)		
osa-miR397a	UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG	SmallRNA-seq Illumina (Wu *et al.*, 2009)	Chr6: 28489768-28489911 Cadena [+]	Intergénico
osa-miR397b	UUAUUGAGUGCAGCGUUGAUG	SmallRNA-seq Illumina (Wu *et al.*, 2009)	Chr2: 3280781-3280898 Cadena [−]	Intergénico
osa-miR535-3p	GUGCUUUCUCCCGUUGUCACU	SmallRNA-seq Illumina (Du *et al.*, 2011)	Chr11: 16290530-16290623 Cadena [−]	Intergénico
osa-miR535-5p	UGACAACGAGAGAGAGCACGC	*Northern blot* (Arazi *et al.*, 2005)		
osa-miR1319a	AACCGGCAUCUGUAAUAUAUUAUA	SmallRNA-seq Roche 454 (Morin *et al.*, 2008)	Chr11: 702071-702191 Cadena [−]	Intergénico
osa-miR1847.1	UGCAGUUUGCAGUUGUGGCAC	SmallRNA-seq Roche 454 (Zhu *et al.*, 2008)	Chr1: 20332878-20332987 Cadena [+]	Intragénico: Intrónico *OsRPM1* LOC_Os01g36640
osa-miR1847.2	UGGCCCACAUGUUAGUGCCACAAC	SmallRNA-seq Roche 454 (Zhu *et al.*, 2008)		
osa-miR5808	ACUAAAUCGUUUCUGAUCGUUGGA	SmallRNA-seq Illumina (Jeong *et al.*, 2011)	Chr9: 18739255-18739333 Cadena [+]	Intragénico: 3' UTR *OsZOS9-16* LOC_Os09g31140

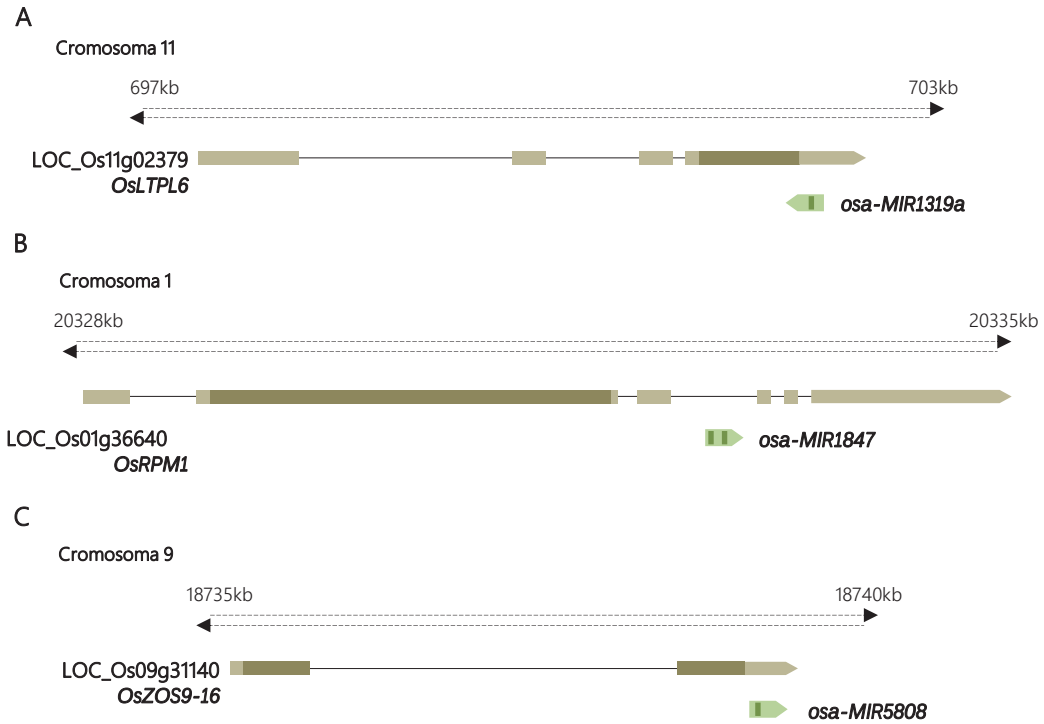

Figura 37. Localización genómica de los precursores *osa-MIR1319a*, *osa-MIR1847* y *osa-MIR5808*. Representación gráfica que indica la ubicación en el genoma de *osa-MIR1319a* con respecto al gen adyacente *OsLTPL6* (LOC_Os11g02379) **(A)** y de los precursores intragénicos *osa-MIR1847* **(B)** y *osa-MIR5808* **(C)** respecto a los genes que los contienen *OsRPM1* (LOC_Os01g36640) y *OsZOS9-16* (LOC_Os09g31140), respectivamente. Las líneas discontinuas corresponden a la doble cadena de DNA. Las barras anchas en los genes corresponden a las regiones no traducidas-UTRs (claras) y exones (oscuras). Las líneas continuas corresponden a los intrones. Las barras anchas en los *MIR* corresponden al precursor (claras) y a los miRNAs maduros (oscuras). Localizaciones genómicas consultadas en la base de datos *Rice Genome Annotation Project* (http://rice.plantbiology.msu.edu/).

Se ha realizado también un análisis de la conservación de los miRNAs seleccionados en diferentes especies vegetales, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Tabla 6). Este análisis de conservación se basó en la presencia o ausencia de pre-miRNAs homólogos anotados en el genoma de las especies y se han analizado sólo aquellas que presentan un mayor número de precursores anotados en la base de datos miRBase (www.mirbase.org). Entre las monocotiledóneas, además de *O. sativa*, las especies que tienen más anotaciones son *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *Hordeum vulgare*. Entre las dicotiledóneas con mayor número de pre-miRNAs anotados se encuentran las especies *Glycine max*, *Arabidopsis*

thaliana, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, así como las arbóreas *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* y *Malus domestica*. Todas estas especies evaluadas son además de gran importancia agrícola y plantas modelo en investigación. Entre los miRNAs seleccionados, el *MIR397* y el *MIR390* son los más conservados, mientras que se ha visto baja conservación evolutiva para los miRNAs *MIR535*, *MIR1319*, *MIR1847* y *MIR5808*. El *MIR397* se encuentra en todas las especies analizadas, siendo el más conservado de todos ellos. En cambio, el *MIR390* está conservado en casi todas las especies dicotiledóneas excepto en *M. domestica*, mientras que en algunas monocotiledóneas no se encuentra, como *H. vulgare* y *T. aestivum*. Curiosamente, el *MIR535* sólo se ha encontrado en arroz y en especies arbóreas como *V. vinifera* y *M. domestica*, no encontrándose en otras monocotiledóneas ni en especies dicotiledóneas menores. El *MIR1847* sólo está conservado en las monocotiledóneas *O. sativa* y *T. aestivum*. No se ha visto conservación para los miRNAs *MIR5808* y *MIR1319*, por lo que hasta ahora se consideran específicos de arroz, y este último posee dos distintos precursores miembros (*osa-MIR1319a* y *osa-MIR1319b*).

Tabla 6. Conservación en diferentes especies de los miRNAs seleccionados. En la tabla se indica la presencia (+) o ausencia (–) de genes *MIR* homólogos de los miRNAs de arroz seleccionados en las diferentes especies vegetales indicadas de acuerdo a los datos del miRBase (www.mirbase.org). Hv: *Hordeum vulgare*; Ta: *Triticum aestivum*; Zm: *Zea mays*; Sb: *Sorghum bicolor*; Bd: *Brachypodium distachyon*; At: *Arabidopsis thaliana*; Gm: *Glycine max*; St: *Solanum tuberosum*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Pt: *Populus trichocarpa*; Mt: *Medicago truncatula*; Vv: *Vitis vinifera*; Md: *Malus domestica*.

miRNA	Monocotiledóneas					Dicotiledóneas							
	Hv	Ta	Zm	Sb	Bd	At	Gm	St	Nt	Pt	Mt	Vv	Md
MIR390	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
MIR397	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MIR535	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
MIR1319	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MIR1847	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MIR5808	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

3. Identificación de los tránscritos dianas de los miRNAs seleccionados

3.1 Predicción bioinformática de dianas

Para determinar las dianas de los miRNAs seleccionados, en primer lugar, se realizó una predicción *in silico* utilizando las plataformas bioinformáticas *en línea* psRNATarget (Dai & Zhao, 2011) y UEA sRNA toolkit (Moxon *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7, donde se incluyen potenciales tránscritos dianas excluyendo los codificantes para proteínas desconocidas y transposones.

Tabla 7. Predicción bioinformática de dianas de los miRNAs seleccionados. Se indican los miRNAs (a); los loci de las dianas potenciales (b) según la predicción *in silico* utilizando las plataformas bioinformáticas *en línea* psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/) y UEA sRNA toolkit (http://srna-tools.cmp.uea.ac.uk/); posición inicial (c) y final (d) del apareamiento del miRNA con la diana; las descripciones de las proteínas que codifican las potenciales dianas (e); las anotaciones funcionales de esas proteínas (f) según la base de datos Uniprot (http://www.uniprot.org/) utilizando el siguiente código: D, desarrollo; DEF, defensa; E, estrés; EA, estrés abiótico; EO, estrés oxidativo; M, metabolismo; PRNA, procesamiento de RNAs; S, señalización; SAU, señalización por auxinas; T, transporte.

miRNA [a]	Diana [b]	Inicio [c]	Final [d]	Descripción [e]	Función [f]
osa-miR390-3p	LOC_Os02g41550	2710	2729	FAD binding domain of DNA photolyase domain containing protein, expressed	D
	LOC_Os06g36990	3065	3084	phospholipid-transporting ATPase 4, putative, expressed	M
	LOC_Os06g49030	682	701	activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog, putative, expressed	M,EA
	LOC_Os09g27080	2266	2285	axi 1 like protein, growth regulator related protein, putative, expressed	D
osa-miR390-5p	LOC_Os01g33110	1664	1684	RLK5-receptor-like protein kinase 5 precursor, putative, expressed	S
	LOC_Os02g10100	2170	2190	LRREXS-leucine-rich repeat receptor protein kinase EXS precursor, putative, expressed	S
	LOC_Os03g51040	784	804	ATP binding protein, STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 6 precursor, putative, expressed	S
	LOC_Os04g29960	1966	1986	OsWAK43 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed	S
	LOC_Os04g29990	1741	1761	OsWAK44 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed	S
	LOC_Os04g30060	622	642	wall-associated receptor kinase-like 10 precursor, putative, expressed	S
	LOC_Os04g30330	1078	1098	OsWAK59 - OsWAK receptor-like cytoplasmic kinase OsWAK-RLCK, expressed	S
	LOC_Os04g45170	496	516	leucine-rich repeat family protein, putative, expressed	S
	LOC_Os04g46700	777	796	ABC family transporter: toluene tolerance, putative, expressed	T
	LOC_Os05g33160	1812	1832	OsBAK-Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase, putative, expressed	S
	LOC_Os06g03970	1608	1628	OsSIK1-receptor-like protein kinase 5 precursor, putative, expressed	S, EA
	LOC_Os11g36140	1033	1053	RLK2-receptor-like protein kinase 2 precursor, putative, expressed	S
osa-miR397a	LOC_Os01g44330	681	701	OsLAC2-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os01g62480	793	813	OsLAC4-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os01g62490	761	781	OsLAC26-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os01g63200	666	686	OsLAC8-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os02g01710	1626	1645	peptidase family C78 domain containing protein, expressed	M
	LOC_Os03g16610	782	801	OsLAC10-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os05g38410	747	767	OsLAC12-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os05g38420	747	767	OsLAC13-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os07g31310	480	499	PPR repeat domain containing protein, putative, expressed	PRNA
	LOC_Os08g35210	2841	2860	ferric reductase like transmembrane component family protein, putative, expressed	T
	LOC_Os10g03850	409	429	OsFBX352 - F-box domain containing protein, expressed	M
	LOC_Os10g04900	671	691	OsFBX364 - F-box domain containing protein, expressed	M
	LOC_Os11g48060	1158	1178	OsLAC22-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
osa-miR397b	LOC_Os01g44330	681	701	OsLAC2-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os01g62490	761	781	OsLAC26-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os01g63180	678	698	OsLAC6-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os01g63200	666	686	OsLAC8-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os02g01030	781	800	hsc70-interacting, tetratricopeptide repeat domain containing protein, expressed	M, D, EA
	LOC_Os03g16610	782	801	OsLAC10-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os05g38410	747	767	OsLAC12-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os05g38420	747	767	OsLAC13-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os07g31310	480	499	PPR repeat domain containing protein, putative, expressed	PRNA
	LOC_Os08g35210	2841	2860	ferric reductase, putative, expressed	T
	LOC_Os09g27950	569	588	avr9 elicitor response protein, galactosyltransferase, putative, expressed	DEF
	LOC_Os10g04900	671	691	OsFBX364 - F-box domain containing protein, expressed	M
	LOC_Os11g48060	1158	1178	OsLAC22-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO
	LOC_Os12g15680	747	767	OsLAC24-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	M, EO

Tabla 7. Continuación.

osa-miR535-3p	LOC_Os12g26030	3119	3139	FACT complex subunit SPT16, cell division control protein 68, putative, expressed	D
osa-miR535-5p	LOC_Os02g07780	985	1005	OsSPL4 - SBP-box gene family member, expressed	D
	LOC_Os04g47580	1241	1260	cyclin B2, Cyclin, N-terminal domain, putative, expressed	D
	LOC_Os06g45310	852	872	OsSPL11 - SBP-box gene family member, expressed	D
	LOC_Os06g49010	2443	2463	OsSPL12 - SBP-box gene family member, expressed	D
	LOC_Os11g30370	1089	1109	OsSPL19 - SBP-box gene family member, expressed	D
osa-miR1319a	LOC_Os09g25770	663	682	auxin-induced, nodulin-like protein 5NG4, putative, expressed	SAU, T
	LOC_Os11g02379	1207	1230	OsLTPL6 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed	M, D, DEF
osa-miR1847.1	LOC_Os01g52250	2158	2178	starch/glycogen synthase, putative, expressed	M
	LOC_Os01g63190	154	173	OsLAC7-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed [PFAM]	M, EO
	LOC_Os03g01180	420	439	phosphoglycerate mutase pRIB5 protein, putative, expressed	M
	LOC_Os03g12450	824	843	nucleoporin, putative, expressed	D
	LOC_Os09g25430	933	952	ZOS9-07, C2H2 zinc finger protein, expressed	D, E
	LOC_Os09g38390	2414	2434	cytoeskeletal protein, octicosapeptide/Phox/Bem1p, putative, expressed	D
	LOC_Os10g31856	2483	2503	ATP binding protein, putative, expressed [PFAM]	D
	LOC_Os12g29760	1251	1270	oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein, putative, expressed	M
osa-miR1847.2	LOC_Os01g31980	436	455	MATE efflux family protein, putative, expressed	T
	LOC_Os01g42040	2145	2164	ubiquitin-conjugating enzyme, putative, expressed	M
	LOC_Os08g30780	1903	1924	ATATH3, ABC transporter, ATP-binding protein, putative, expressed	T
osa-miR5808	LOC_Os01g33350	1184	1203	zinc-binding protein, PLATZ transcription factor, putative, expressed	D
	LOC_Os01g43490	1490	1513	polygalacturonase, putative, expressed	M
	LOC_Os01g69930	575	598	dnaJ domain containing protein, expressed	D, E
	LOC_Os04g53060	3600	3623	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed	DEF
	LOC_Os06g03120	1594	1617	aspartic proteinase nepenthesin-2 precursor, putative, expressed	M
	LOC_Os09g31140	1083	1106	OsZOS9-16 - C2H2 zinc finger protein, expressed	D, E
	LOC_Os10g38540	920	943	glutathione S-transferase, putative, expressed	D, E

Como dianas predichas para osa-miR390-3p fueron encontrados 4 genes codificantes para proteínas relacionadas con desarrollo y metabolismo, como la proteína Axi-1, relacionada con la regulación del crecimiento mediado por auxinas, y un activador de proteínas de choque térmico, la cual podría ser mediadora en la respuesta a estrés abiótico. Para el miRNA osa-miR390-5p se han predicho como dianas un total de 10 tránscritos de proteínas quinasas, un factor de transcripción y un transportador. Entre estas proteínas quinasas se encuentran varias WAK (*Wall-associated kinases*) y RLK (*Receptor-like kinases*), las cuales podrían tener un papel en la detección y traducción de señales frente a estreses bióticos y abióticos, respuesta a hormonas o señales ambientales. Una de las posibles dianas codifica a la proteína OsSIK1, que ha sido descrita en la tolerancia al estrés hídrico y salino (Ouyang *et al.*, 2010).

El caso de los *osa-MIR397* es particular, pues al ser casi idénticos tienen también casi las mismas dianas predichas, las cuales son principalmente codificantes para proteínas lacasas, implicadas en el metabolismo de ligninas y en el estrés oxidativo. De hecho, dos de estas lacasas ya han sido confirmadas experimentalmente como dianas de estos miRNAs (Zhang *et al.*, 2013). También se encontraron como posibles dianas algunos factores de transcripción con dominio F-box. Los miembros osa-miR397 difieren

entre sí en un solo nucleótido, y esto podría ser determinante para que osa-miR397b tenga como dianas potenciales además a los mensajeros de una proteína de respuesta a elicitores y otra de interacción con proteínas de choque térmico, las cuales podrían tener funciones en respuesta de defensa y estrés abiótico, respectivamente. Esta característica podría significar una diferenciación funcional entre ambos miembros.

Las dianas predichas para los miRNAs maduros de *osa-MIR535* codifican proteínas implicadas en el desarrollo. Para el osa-miR535-3p se ha predicho una sola diana, que está relacionada con la división celular. Entre las potenciales dianas de osa-miR535-5p se encuentran varios genes codificantes de factores de transcripción del tipo SPL (*Squamosa-promoter binding protein-like*). Esta familia de FTs está funcionalmente implicada en el control del desarrollo tanto vegetativo como reproductivo. Además se conoce que la acumulación de tránscritos de varios genes *SPL* está regulada post-transcripcionalmente por la familia *miR156* (Wang *et al.*, 2009b).

Los tránscritos predichos como dianas para osa-miR1319a fueron los codificantes para una proteína transportadora de inducción por auxinas y para la proteína de transferencia de lípidos OsLTPL6, la cual ya ha sido presentada más arriba, porque el gen *OsLTPL6* y el precursor *osa-MIR1319a* se encuentran ubicados en el mismo sitio del genoma, pero en la cadena opuesta del DNA. Las proteínas LTP de plantas han sido descritas en el metabolismo de lípidos, en el desarrollo y relacionadas con las respuestas de defensa (Kader, 1996).

Curiosamente, osa-miR1847.1 tiene como posible diana a otra lacasa, diferente a las predichas para los osa-miR397. Se encontraron además mensajeros codificantes de factores de transcripción y enzimas relacionadas con el desarrollo y el metabolismo. En el caso de osa-miR1847.2 se encontraron dos tránscritos codificantes de proteínas de transporte, entre las que está una detoxificadora del tipo MATE (*Multi-antimicrobial extrusión protein*), la cual podría estar implicada en respuestas frente a patógenos.

Para osa-miR5808 fueron predichos como dianas, entre otros, tránscritos codificantes para factores de transcripción como la proteína dedo de zinc OsZOS9-16, mencionada anteriormente cuando se describió que el precursor del miRNA se ubica en la zona 3' UTR de este mensajero. Esta disposición genómica podría indicar la evolución conjunta como un mecanismo de autorregulación. Además se encontraron como posibles dianas genes relacionados con defensa y estrés oxidativo, como una proteína del tipo NBS-LRR de resistencia a enfermedades, una proteína glutatión transferasa, una proteasa y una proteína con un dominio dnaJ.

En resumen, muchos de los transcritos dianas predichos para los miRNAs seleccionados podrían tener funciones en la respuesta de defensa de la planta de arroz, además de en la respuesta a otros estreses ambientales.

3.2 Dianas validadas y descritas en la literatura

En trabajos realizados previamente en arroz, han sido descritas dianas para algunos de los miRNAs seleccionados y se listan en la Tabla 8. El miRNA osa-miR390-5p, tiene como dianas los tránscritos codificantes para 3 proteínas quinasas (Sunkar *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010) y 4 tasiRNAs (*trans-acting small interfering RNAs*) que regulan proteínas tipo ARF (*Auxin response factor*) (Zhu *et al.*, 2008), todas validadas funcionalmente. Así también, ambos miembros osa-miR397 tienen descritas a dos lacasas y se ha validado funcionalmente la implicancia de esta interacción en la producción de semillas (Li *et al.*, 2011b; Zhang *et al.*, 2013). Otra lacasa también ha sido descrita por análisis de degradoma para estos miRNAs (Li *et al.*, 2010a). Por análisis de degradoma se han validado dos dianas para osa-miR1847.1, correspondiente a los tránscritos de una proteína de función desconocida y una proteína de dominio ACT (Li *et al.*, 2010a).

Tabla 8. Revisión de dianas descritas para los miRNAs seleccionados. Se indican los miRNAs (a); los loci y la anotación de los tránscritos dianas (b); el método experimental utilizado para validar la interacción entre el miRNA y su diana (c); las publicaciones donde se validaron las dianas (d); posible función de la proteína codificada por el tránscrito diana (e), usando el siguiente código: D, desarrollo; EO, estrés oxidativo; M, metabolismo; PRNA, procesamiento de RNAs; S, señalización; SAU, señalización por auxinas. Datos consultados en las bases de datos TARBase v7.0 (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index) y Uniprot (http://www.uniprot.org/) y en los artículos indicados en (d).

miRNA [a]	Diana y descripción [b]	Validación experimental [c]	Referencia [d]	Función [e]
osa-miR390-3p	Sin datos	-	-	
osa-miR390-5p	LOC_Os02g10100: leucine-rich repeat receptor protein kinase EXS precursor	Funcional Degradoma	Sunkar *et al.* (2005) Zhou *et al.* (2010)	S
	LOC_Os08g34650: receptor-like protein kinase precursor, putative, expressed	Funcional	Sunkar *et al.* (2005)	S
	LOC_Os11g36140: receptor-like protein kinase 2 precursor, putative, expressed	Funcional	Sunkar *et al.* (2005)	S
	OsTAS3a1, OsTAS3a2, OsTAS3b1, OsTAS3b2	Funcional	Zhu *et al.* (2008)	SAU, PRNA
osa-miR397a	LOC_Os05g38410: L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	Funcional	Zhang *et al.* (2013)	M, EO, D
	LOC_Os05g38420: L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	Funcional	Zhang *et al.* (2013) Li *et al.* (2011)	M, EO, D
	LOC_Os11g48060: L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	Degradoma	Li *et al.* (2010)	M, EO, D
osa-miR397b	LOC_Os05g38410: L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	Funcional	Zhang *et al.* (2013)	M, EO, D
	LOC_Os05g38420: L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	Funcional	Zhang *et al.* (2013) Li *et al.* (2011)	M, EO, D
	LOC_Os11g48060: L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	Degradoma	Li *et al.* (2010)	M, EO, D
osa-miR535-3p	Sin datos	-	-	
osa-miR535-5p	Sin datos	-	-	
osa-miR1319a	Sin datos	-	-	
osa-miR1847.1	LOC_Os02g34990: ACT domain containing protein	Degradoma	Li *et al.* (2010)	M
	LOC_Os04g39170: expressed protein	Degradoma	Li *et al.* (2010)	-
osa-miR1847.2	Sin datos	-	-	
osa-miR5808	Sin datos	-	-	

3.3 Validación de dianas por análisis de degradoma

Fueron analizados los datos de la secuenciación masiva de tránscritos degradados por miRNAs en hojas de arroz en respuesta a elicitores de *M. oryzae* y los resultados se detallan en la Tabla 9. El análisis del degradoma nos permitió validar algunas dianas de los miRNAs seleccionados. Se han encontrado tránscritos codificantes degradados por 6 de los miRNAs seleccionados: osa-miR390-3p, osa-miR390-5p, osa-miR397b, osa-miR1319a, osa-miR1847.2 y osa-miR5808. Entre las dianas validadas se encuentran algunas codificantes de proteínas que podrían ser funcionales en vías de señalización (quinasas), expresión de genes relacionados con defensa (factores de transcripción), cambio en el flujo de iones de la célula y protección frente a patógenos

(LTP). A excepción de la proteína AGO, que cumple funciones en el procesamiento de sRNAs, ninguna de las dianas validadas mediante degradoma para los miRNAs seleccionados tiene función conocida. Los sitios específicos de corte por el miRNA para cada diana se señalan en la Figura 38. No se hallaron tránscritos degradados por los miRNAs osa-miR1847.1, osa-miR535-3p, osa-miR535-5p y por osa-miR397a.

Tabla 9. Tránscritos degradados por los miRNAs seleccionados en hojas de arroz en respuesta a elicitores de *M. oryzae*. Datos del degradoma realizado en hojas de plantas de arroz var. Nipponbare tratadas con una suspensión de elicitores de *M. oryzae* (300 µg/ml). Se indican los miRNAs (a); los tránscritos degradados por los miRNAs seleccionados (b); el sitio de corte del tránscrito diana por el miRNA (c); el valor de la probabilidad estadística (p≤0,05) (d); la complementariedad específica del miRNA con la secuencia diana según la descripción de Zhang (2005), donde 0 es óptimo y 5 supone mayores probabilidades de encontrar falsos positivos (e); la posible función según la base de datos Uniprot (http://www.uniprot.org/) (f), donde: D, desarrollo; DEF, defensa; M, metabolismo; PRNA, procesamiento de RNAs; S, señalización; T, transporte.

miRNA [a]	Diana y descripción [b]	Corte [c]	p-valor [d]	Score [e]	Función [f]
osa-miR390-3p	LOC_Os06g42850.1 cDNA|extracellular ligand-gated ion channel	1655	0.03	3.0	T
osa-miR390-5p	LOC_Os01g51200.2 cDNA|CK1_CaseinKinase_1.3 - CK1	1076	0.0	4.5	S
	LOC_Os01g51200.1 cDNA|CK1_CaseinKinase_1.3 - CK1	1017	0.03	4.5	
osa-miR397a	Ninguna	-	-	-	-
osa-miR397b	LOC_Os05g48970.2 cDNA|zinc finger, C3HC4 type domain containing protein	1045	0.01	3.0	
	LOC_Os02g34600.2 cDNA|CAMK_CAMK_like.13 – CAMK	646	0.02	3.0	S
	LOC_Os02g34600.1 cDNA|CAMK_CAMK_like.13 – CAMK	646	0.01	3.0	
osa-miR535-3p	Ninguna	-	-	-	-
osa-miR535-5p	Ninguna	-	-	-	-
osa-miR1319a	LOC_Os11g02379.1 cDNA|LTPL6 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family	1221	0.0	0.0	M, D, DEF
osa-miR1847.1	Ninguna	-	-	-	-
osa-miR1847.2	LOC_Os04g06770.1 cDNA|argonaute, putative	2511	0.0	4.0	PRNA
	LOC_Os04g06770.2 cDNA|argonaute, putative	2678	0.0	4.0	PRNA
osa-miR5808	LOC_Os06g13190.1 cDNA|expressed protein	623	0.0	2.0	-

En la Tabla 10 se presenta un resumen sobre las dianas predichas, descritas y validadas por degradoma en este trabajo. Algunas de las dianas que han sido predichas para los miRNAs seleccionados ya han sido descritas y validadas en trabajos previos, como para osa-miR390-5p dos quinasas (LOC_Os02g10100 y LOC_Os11g36140) y para los osa-miR397 dos lacasas (LOC_Os05g38410 y LOC_Os05g38410). El hecho más destacable es que en este trabajo se ha realizado la predicción de *OsLTPL6* como diana para osa-miR1319a y se ha validado la interacción entre estos componentes reguladores en respuesta a elicitores fúngicos por análisis de degradoma.

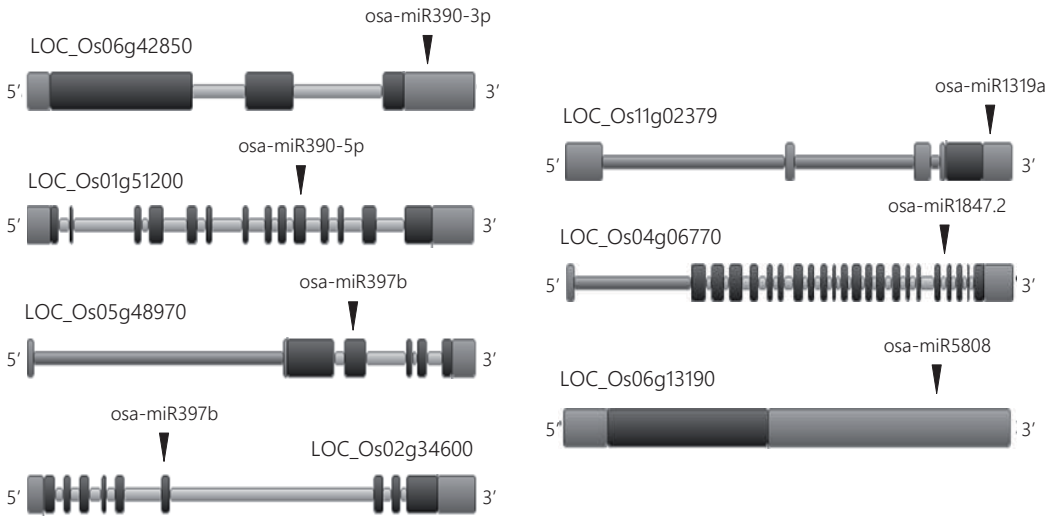

Figura 38. Sitio de corte de las dianas de los miRNAs seleccionados. Representación gráfica que indica el sitio de corte por los miRNAs estudiados. Las barras anchas corresponden a UTRs (claras) y exones (oscuras). Las barras finas corresponden a intrones. Gráficos de los genes tomados de Plaza 3.0 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/ - Proost *et al.*, 2014).

Tabla 10. Resumen de las dianas de los miRNAs seleccionados identificados *in silico*, descritas en la literatura y en el análisis de la secuenciación del degradoma.

miRNA	Diana		*In silico*	Descrita	Degradoma
osa-miR390-3p	LOC_Os06g42850	extracellular ligand-gated ion channel	–	–	+
	LOC_Os06g49030	activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog, putative, expressed	+	–	–
osa-miR390-5p	LOC_Os01g33110	RLK5-receptor-like protein kinase 5 precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g51200	CK1_CaseinKinase_1.3 - CK1	–	–	+
	LOC_Os02g10100	LRREXS-leucine-rich repeat receptor protein kinase EXS precursor, putative, expressed	+	+	–
	LOC_Os04g29960	OsWAK43 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed	+	–	–
	LOC_Os04g29990	OsWAK44 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed	+	–	–
	LOC_Os04g30060	wall-associated receptor kinase-like 10 precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os04g30330	OsWAK59 - OsWAK receptor-like cytoplasmic kinase OsWAK-RLCK, expressed	+	–	–
	LOC_Os04g45170	leucine-rich repeat family protein, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os05g33160	OsBAK1-Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os06g03970	OsSIK1-receptor-like protein kinase 5 precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os08g34650	receptor-like protein kinase precursor, putative, expressed	–	+	–
	LOC_Os11g36140	RLK2-receptor-like protein kinase 2 precursor, putative, expressed	+	+	–
osa-miR397a	LOC_Os01g44330	OsLAC2-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g62480	OsLAC4-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g62490	OsLAC26-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g63200	OsLAC8-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os03g16610	OsLAC10-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os05g38410	OsLAC12-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	+	–
	LOC_Os05g38420	OsLAC13-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	+	–
	LOC_Os11g48060	OsLAC22-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	+	–

Tabla 10. Continuación.

	LOC_Os01g44330	OsLAC2-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g62490	OsLAC26-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g63180	OsLAC6-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g63200	OsLAC8-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os02g01030	hsc70-interacting, tetratricopeptide repeat domain containing protein, expressed	+	–	–
	LOC_Os02g34600	CAMK_CAMK_like.13 – CAMK	–	–	+
osa-miR397b	LOC_Os03g16610	OsLAC10-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os05g38410	OsLAC12-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	+	–
	LOC_Os05g38420	OsLAC13-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	+	–
	LOC_Os05g48970	zinc finger, C3HC4 type domain containing protein	–	–	+
	LOC_Os09g27950	avr9 elicitor response protein, galactosyltransferase, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os11g48060	OsLAC22-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	+	–
	LOC_Os12g15680	OsLAC24-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed	+	–	–
osa-miR535-3p	LOC_Os12g26030	FACT complex subunit SPT16, cell division control protein 68, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os02g07780	OsSPL4 - SBP-box gene family member, expressed	+	–	–
osa-miR535-5p	LOC_Os06g45310	OsSPL11 - SBP-box gene family member, expressed	+	–	–
	LOC_Os06g49010	OsSPL12 - SBP-box gene family member, expressed	+	–	–
	LOC_Os11g30370	OsSPL19 - SBP-box gene family member, expressed	+	–	–
osa-miR1319a	LOC_Os11g02379	OsLTPL6 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed	+	–	+
	LOC_Os01g63190	OsLAC7-L-ascorbate oxidase precursor, putative, expressed [PFAM]	+	–	–
osa-miR1847.1	LOC_Os02g34990	ACT domain containing protein	–	+	–
	LOC_Os04g39170	expressed protein	–	+	–
	LOC_Os09g25430	ZOS9-07, C2H2 zinc finger protein, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g31980	MATE efflux family protein, putative, expressed	+	–	–
osa-miR1847.2	LOC_Os04g06770	argonaute, putative	–	–	+
	LOC_Os08g30780	ATATH3, ABC transporter, ATP-binding protein, putative, expressed	+	–	–
	LOC_Os01g69930	dnaJ domain containing protein, expressed	+	–	–
	LOC_Os04g53060	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed	+	–	–
osa-miR5808	LOC_Os06g13190	expressed protein	–	–	+
	LOC_Os09g31140	OsZOS9-16 - C2H2 zinc finger protein, expressed	+	–	–
	LOC_Os10g38540	glutathione S-transferase, putative, expressed	+	–	–

4. Análisis *in silico* de los promotores de los pre-miRNAs

Para profundizar en la caracterización de estos miRNAs se realizó un análisis *in silico* de la región promotora de los precursores seleccionados. Como ya se mencionó anteriormente, 2 de los precursores seleccionados se ubican en regiones intragénicas, uno de ellos es el precursor *osa-MIR1847* que se localiza en un intrón del gen *OsRPM1*, y el otro es *osa-MIR5808* que se encuentra en la zona 3' UTR del gen *OsZOS9-16*. La expresión de estos precursores podría estar sometida a la actividad del promotor del gen que los contienen, como se ha descrito para otros miRNAs intragénicos de Arabidopsis y arroz (Yang *et al.*, 2012). De ser este el caso, la expresión del precursor *osa-MIR1847* podría estar ligada a la regulación del gen *OsRPM1*, un gen que responde a la infección por patógenos (Tornero *et al.*, 2002) y la del precursor *osa-MIR5808* depender de la expresión de *OsZOS9-16*, del cual no se conoce su función. Aunque

tampoco se podría descartar que estos precursores posean sus propias regiones promotoras ya que la regulación de los miRNAs intragénicos continúa siendo una incógnita en plantas. Existen herramientas para el reconocimiento de promotores para miRNAs intragénicos, sin embargo sólo está disponible para miRNAs de animales, no para plantas (Marsico *et al.*, 2013). En este trabajo no se ha analizado si estos precursores poseen o no su propio promotor, por lo que en el análisis de promotores no fueron incluídos.

Se sabe que los miRNAs son producto del procesamiento inicial de un tránscrito primario (pri-miRNA), que contiene en su secuencia el pre-miRNA que se pliega en una estructura secundaria en forma de horquilla. Para realizar el análisis de los promotores de los miRNAs seleccionados, primeramente se ha hecho la predicción del sitio de inicio de la transcripción (TSS - *Transcription start site*) de los pri-miRNAs seleccionados. Este análisis se realizó desde la plataforma bioinformática *en línea* Softberry y su programa de predicción del inicio de la transcripción (www.softberry.com). En la Figura 39 se representa el sitio del inicio de la transcripción predicho para *osa-MIR390*, que inicia 1197 pb antes del pre-miRNA; *osa-MIR397a*, 148 pb; *osa-MIR397b*, 936 pb; *osa-MIR535*, 756 pb; y *osa-MIR1319a*, 88 pb.

El análisis *in silico* de los promotores se realizó tomando las secuencias correspondientes a los 1500 pb antes del inicio de la transcripción predicho y las ubicadas entre el TSS y el inicio del pre-miRNA, utilizando la herramienta bioinformática de análisis de promotores *en línea* PlantCARE. En la Tabla 11 se presenta un resumen indicando la presencia o ausencia de elementos relacionados con la respuesta de defensa, la posible respuesta a estrés hídrico, térmico y a hormonas, mientras que la Figura 39 representa un esquema de las secuencias analizadas posicionando los elementos reguladores encontrados, principalmente los de respuesta de defensa y a estrés abiótico (sequía, estrés osmótico, frío, calor, salinidad y condiciones anaeróbicas), así como las hormonas vegetales implicadas en la respuesta a estos estreses. No se han

encontrado elementos reguladores relacionados con salinidad en las secuencias promotoras de estos miRNAs. Resulta destacable que todos los promotores analizados presentan 3 o más elementos relacionados con sequía, como los sitios de unión a factores de transcripción del tipo MYB (CCAAT, CAACTG) y de respuesta a ABA (CACGTG, CCGCCGCGCT). También la mayoría de ellos presentan elementos relacionados con la respuesta de defensa u hormonas mediadoras como el JA, ET o el SA, como cajas de respuesta a elicitores (TTGACC) en los promotores de *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b* y *osa-MIR1319a*; de respuesta a hormonas como el ET (ATTTCAAA) en *osa-MIR390* y en *osa-MIR397b*, el JA (CGTCA) en todos excepto en *osa-MIR397b* y el SA (GAGAAGAATA) en *osa-MIR390*, *osa-MIR397b* y *osa-MIR1319a*. Se ha visto también que todos los promotores presentan elementos reguladores de respuesta a temperaturas extremas como a calor (AGAAAATTCG) y en los promotores de *osa-MIR390*, *osa-MIR397b* y *osa-MIR535* también de respuesta a frío (CCGAAA).

En resumen, el análisis de los promotores de los miRNAs seleccionados sugiere que su expresión podría estar regulada durante la respuesta de defensa, la respuesta a estrés hídrico y el térmico.

Tabla 11. Elementos reguladores en los promotores de los miRNAs seleccionados. Presencia (+) o ausencia (-) de elementos de respuesta a las hormonas ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA), a elicitores, defensa, sequía y estrés térmico (frío y/o calor), en las en las secuencias promotoras (1500 pb antes del inicio de la transcripción) de los precursores *osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b*, *osa-MIR535* y *osa-MIR1319a*.

miRNA	Elementos reguladores de respuesta a factores relacionados con estrés							
	JA	SA	ET	ABA	Defensa	Elicitores	Sequía	Tº
osa-MIR390	+	−	+	+	−	−	+	+
osa-MIR397a	+	−	−	+	+	+	+	+
osa-MIR397b	−	+	+	+	+	+	+	+
osa-MIR535	+	−	−	+	+	−	+	+
osa-MIR1319a	+	+	−	+	−	+	+	+

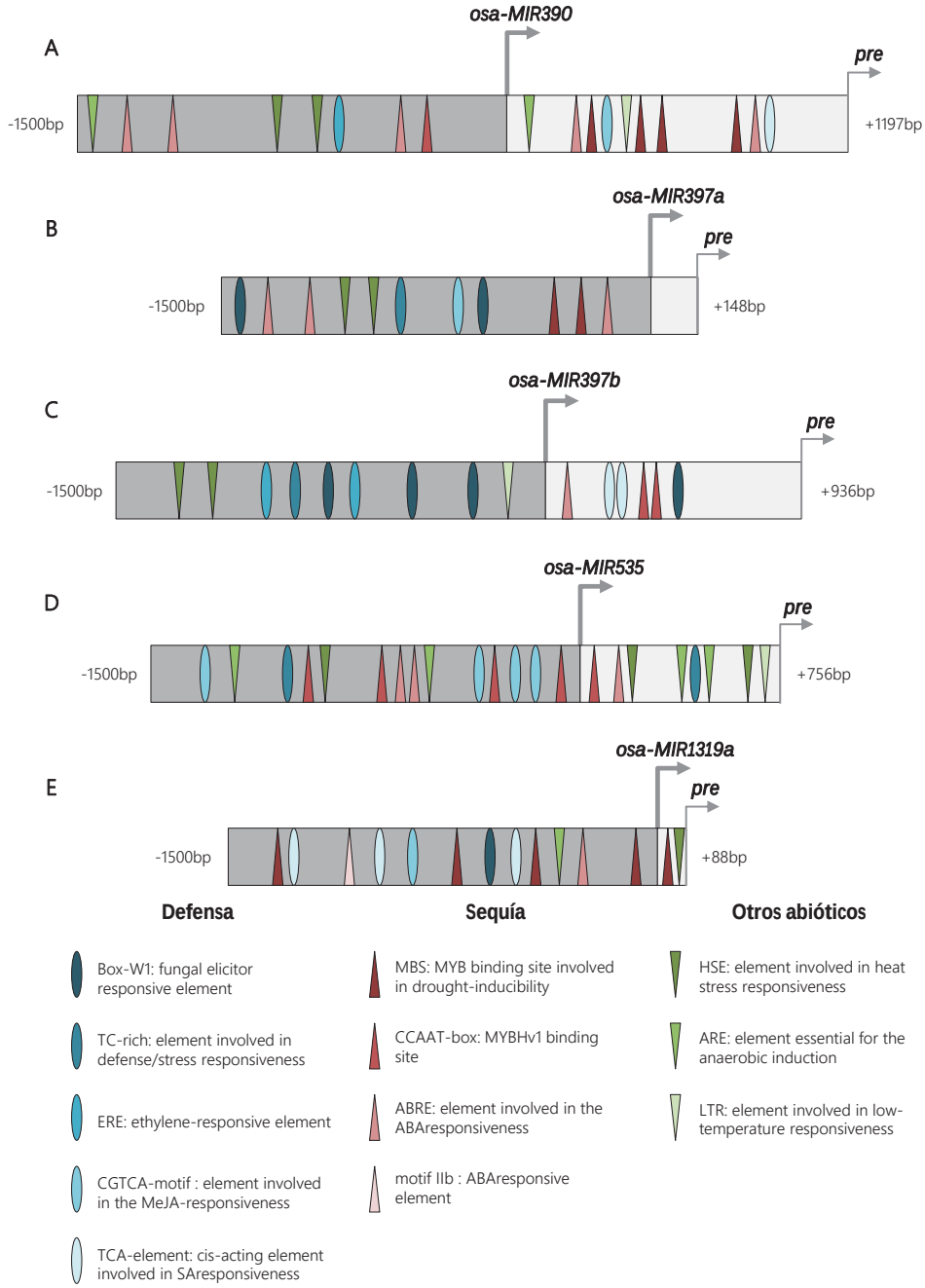

Figura 39. Análisis de los promotores de los miRNAs seleccionados. Se detallan los elementos regulatorios relacionados con defensa, sequía y estreses abióticos, entre otros, presentes en las secuencias de la región promotora de *osa-MIR390* **(A)**, *osa-MIR397a* **(B)**, *osa-MIR397b* **(C)**, *osa-MIR535* **(D)** y *osa-MIR1319a* **(E)**. Las flechas gruesas corresponden al sitio de inicio de la transcripción (pri-miRNA), predicho mediante el análisis de los 1500 pb antes del inicio del pre-miRNA en la herramienta TSS (*Transcription start site*) de la plataforma bioinformática Softberry (http://www.softberry.com/). Las flechas finas indican el inicio del pre-miRNA. Para el análisis de los elementos regulatorios se tomaron los 1500 pb antes del inicio de la transcripción (franjas oscuras) y las secuencias previas al inicio del pre-miRNA (franjas claras). Las secuencias se analizaron en la plataforma bioinformática PlantCARE.

5. Acumulación de los miRNAs seleccionados en respuesta a infección por *M. oryzae*

Los resultados obtenidos mediante el análisis del sRNA-seq muestran una acumulación diferencial de los miRNAs seleccionados en respuesta a elicitores fúngicos. Para comprobar si además de frente a los elicitores, estos miRNAs están regulados durante respuesta de defensa inducida por el propio patógeno, se realizó un análisis de la acumulación de los miRNAs en hojas de arroz inoculadas con *M. oryzae* mediante la técnica de *stemloop* qRT-PCR. Esta metodología permite la retrotranscripción de miRNAs utilizando un cebador específico que forma una estructura de horquilla y aparea con los nucleótidos del extremo 3' del miRNA maduro, y le permite a la enzima retrotranscriptasa sintetizar el cDNA del pequeño RNA para después realizar su cuantificación por qPCR utilizando cebadores específicos del miRNA maduro (Chen *et al.*, 2005). Esta técnica se utilizó de manera general para la cuantificación de la acumulación de miRNAs maduros en este trabajo. La expresión del gen marcador de defensa *OsPBZ1* (*Probenazole inducible 1*) fue utilizada como control del tratamiento. La validación de esta técnica se presenta en el apartado de materiales y métodos.

Todos los miRNAs analizados presentan principalmente una disminución de su acumulación en respuesta a la infección por *M. oryzae*, principalmente entre las 6 y las 12 horas de iniciada la infección (Figura 40). En ese rango es cuando presentan una represión más intensa los miRNAs osa-miR390-5p (0,6 con respecto a las condiciones iniciales), osa-miR535-5p (0,7), osa-miR1319a (0,4) y osa-miR5808 (0,7). Los miembros osa-miR397 presentan sin embargo su represión más intensa después de 48 horas de iniciada la infección (0,7). Esta disminución en los niveles de acumulación de los miRNAs se correlaciona con la inducción del gen marcador de defensa *OsPBZ1*. Aunque la acumulación de todos los miRNAs es bastante dinámica en el tiempo, en general se ve disminuida en respuesta a la infección por el hongo *M. oryzae*. Un comportamiento que se podría corresponder con la represión observada en respuesta al tratamiento con

elicitores según los datos del sRNA-seq, lo que sugiere que estos miRNAs podrían ser reguladores negativos de la respuesta inmune de la planta de arroz.

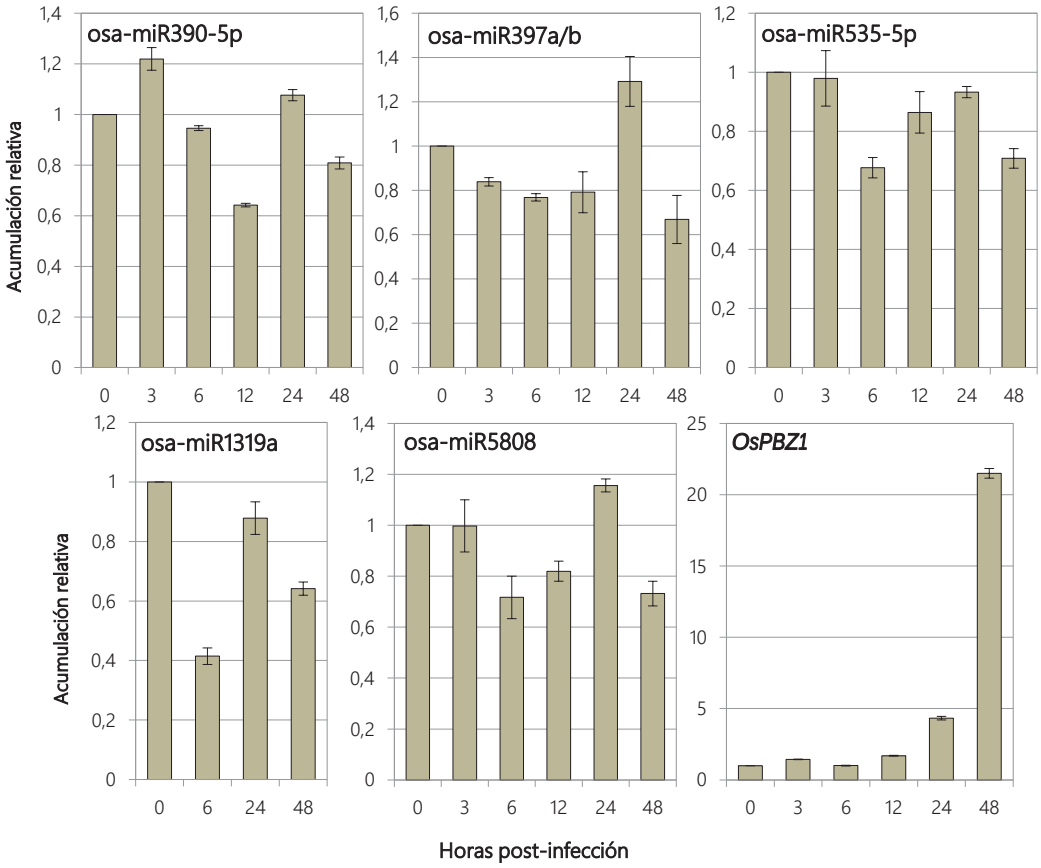

Figura 40. Acumulación de los miRNAs en respuesta a infección por *M. oryzae* en parte aérea de plantas de arroz. Gráficas de los niveles de acumulación de los miRNAs seleccionados, cuantificados por *stemloop* qRT-PCR. Plantas de arroz tratadas con una suspensión de esporas de *M. oryzae* a 10^5 esp/ml o tratadas con agua estéril (control). Las muestras fueron tomadas a los tiempos indicados luego del tratamiento. Se muestran los valores de acumulación media de los miRNAs maduros osa-miR390-5p, osa-miR397a/b (cuantificados indistintamente), osa-miR535-5p, osa-miR1319a y osa-miR5808, y del gen marcador de defensa *OsPBZ1* (LOC_Os12g36880) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). Los tiempos correspondientes a las 3 y 12 horas para osa-miR1319a no fueron analizados. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. Los valores de la acumulación están referenciados al valor obtenido en la muestra control de cada tiempo (valor de referencia del control=1).

6. Generación de líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de los pre-miRNAs seleccionados

Para caracterizar funcionalmente los miRNAs seleccionados se propuso generar líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de los correspondientes precursores.

6.1 Construcción de vectores de expresión en plantas

El DNA codificante para los 7 precursores de miRNA seleccionados se obtuvo mediante amplificación por PCR, a partir de DNA genómico de hojas de arroz (var. Nipponbare). Las secuencias de los precursores fueron tomadas de la base de datos miRBase y cotejadas con las secuencias genómicas de la base de datos *Rice Genome Annotation Project* para el diseño de los cebadores específicos situados aproximadamente 100 pb delante del inicio del precusor y 40 pb después de su final. Estas secuencias colindantes al precursor aseguran que se exprese una unidad transcripcional más larga, como tránscrito primaro (pri-miRNA) y que pueda procesarse por la maquinaria de la planta al pre-miRNA de interés. Se amplificó esta región del genoma por PCR y al mismo tiempo se añadieron las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *BamH*I y *Sma*I en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de amplificación se clonó por T/A en un vector de transición (pGEM-TEasy®) y se confirmó mediante secuenciación la identidad de la secuencia. Los fragmentos de DNA conteniendo las secuencias precursoras se clonaron utilizando los sitios de restricción *BamH*I y *Sma*I en el vector de expresión en plantas pCAMBIA1300 que contenía el promotor del gen *Ubiquitin* del maíz y el terminador del gen *Nos*, resultando en las construcciones que permiten la expresión de los precursores bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo. Los vectores así obtenidos contienen además dentro del T-DNA el gen de resistencia a higromicina (*hptII*) bajo el control del promotor y el teminador 35S del CaMV. La Figura 41 representa un esquema del proceso seguido para la generación de estas construcciones y finalmente los vectores de expresión en plantas. Se obtuvieron 7 vectores portadores de las construcciones para la sobreexpresión de los

pre-miRNAs seleccionados: pC:p*Ubi*:*osa-MIR390*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR397a*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR397b*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR535*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR1319a*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR1847*:t*Nos* y pC:p*Ubi*:*osa-MIR5808*:t*Nos*.

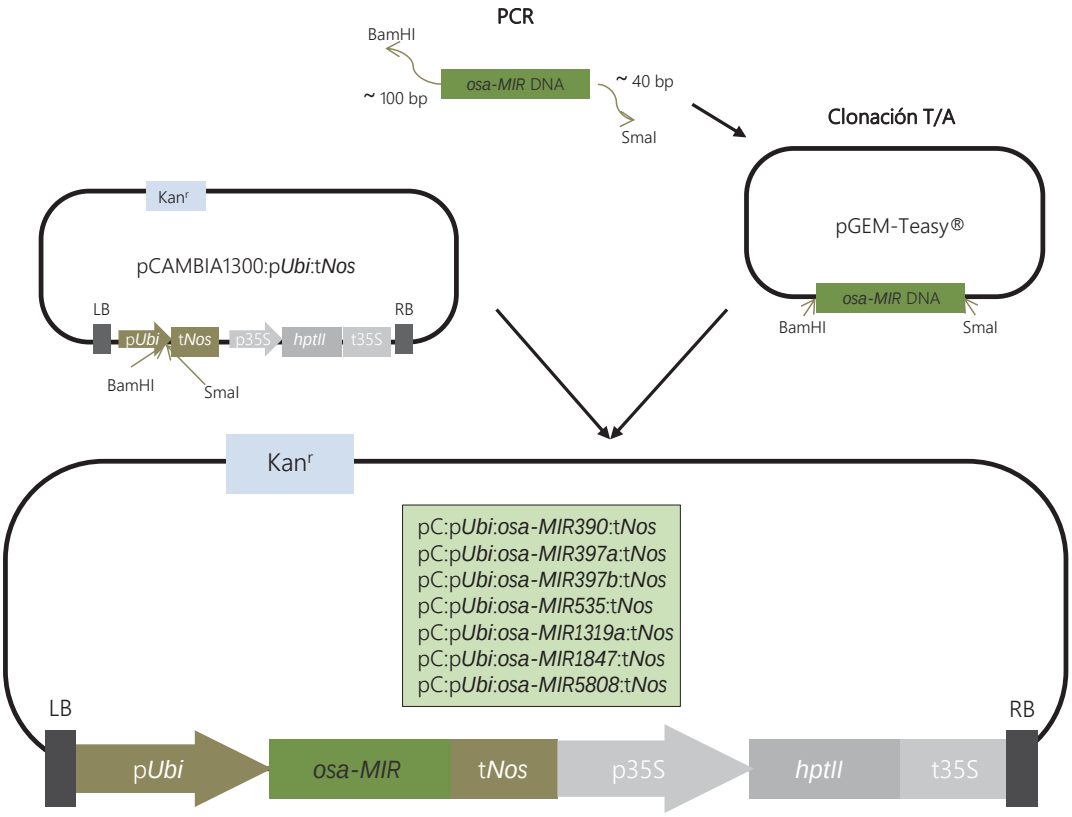

Figura 41. Esquema de la preparación de los vectores para la sobreexpresión de precursores de miRNAs. Amplificación por PCR del DNA genómico de los precursores de los miRNAs seleccionados (*osa-MIR*) aproximadamente 100 pb antes de su inicio y 40 pb después de su final e incorporando los sitios de restricción indicados. Clonación del producto de PCR en el vector pGEM-T mediante el sistema de clonación T/A. Clonación del fragmento de restricción BamHI-SmaI de las construcciones pGEM-T:*MIR390*, pGEM-T:*MIR397a*, pGEM-T:*MIR397b*, pGEM-T:*MIR535*, pGEM-T:*MIR1319a*, pGEM-T:*MIR1847* y pGEM-T:*MIR5808* en el vector pCAMBIA1300:p*Ubi*:t*Nos* para generar los vectores listados en el cuadro interno. En estos vectores, la expresión de los precursores de los miRNAs está dirigida por el promotor *Ubiquitin* de maíz y el terminador *Nos*. LB y RB: bordes izquierdo y derecho del T-DNA, respectivamente. 35S: promotor y terminador del virus del mosaico del coliflor (CaMV); *Nos*: nopalina sintasa; *hptII*: gen de la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina; Kan: gen de resistencia a kanamicina.

6.2 Análisis del procesamiento *in vivo* de los precursores en *Nicotiana benthamiana*

La producción de miRNAs maduros en la planta es el resultado de una compleja serie de procesamientos enzimáticos a partir de un tránscrito primario. La sobreexpresión efectiva de los precursores de estos miRNAs, por consiguiente, depende de que esta maquinaria sea capaz de procesar las construcciones introducidas en las plantas y generar la acumulación de los correspondientes miRNAs. Para comprobar que las construcciones generadas eran funcionales en planta, se realizó un análisis de procesamiento *in vivo* de los precursores, mediante ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Estos análisis se realizaron con plantas de la línea mutante en el gen *RdR6*, codificante de la RNA polimerasa dependiente de RNA implicada en el silenciamiento génico de RNAs exógenos. Así, estas plantas tienen bloqueada la maquinaria de silenciamiento y permiten analizar la expresión transitoria de los precursores de los miRNAs.

La Figura 42A presenta un esquema del proceso seguido para la expresión transitoria de los precursores de los miRNAs en hojas de *N. benthamiana rdr6* mediante agroinfiltración. Las hojas agroinfiltradas y los controles de infiltración fueron recogidos 48 horas después para realizar un análisis *Northern blot* de pequeños RNAs. Los resultados obtenidos en ese análisis se muestran en la Figura 42B, donde se observa la acumulación incrementada de los miRNAs osa-miR390-5p, osa-miR397a, osa-miR397b, osa-miR535-5p, osa-miR1319a, osa-miR1847.1 y osa-miR5808 en las hojas agroinfiltradas con los vectores correspondientes de cada precursor, en comparación con el carril control. Estos resultados indican que los precursores han sido procesados y los miRNAs maduros se acumulan, por lo tanto, las construcciones generadas son funcionales *in vivo*. En algunos casos, como en las hojas transformadas con los vectores de precursores *osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b* y *osa-MIR535*, se detecta una débil banda en los controles de infiltración, correspondiente a los miRNAs endógenos y demostrando la

conservación de estos 4 miRNAs en *N. benthamiana*. Al momento de realización de esta tesis, aún no se han descrito los miRNAs presentes en el genoma de *N. benthamiana* (Bombarely *et al.*, 2012), sin embargo, como ya se ha mencionado en el apartado sobre la conservación de los miRNAs en otras especies, en la literatura sí se ha descrito la presencia de los miRNAs *miR390* y *miR397* en el genoma *N. tabacum* (Tang *et al.*, 2012a). A su vez, los niveles de acumulación de los miRNAs osa-miR390-5p, osa-miR397a, osa-miR397b y osa-miR535-5p fue aparentemente mayor que los observados en osa-miR1319a, osa-miR1847.1 y osa-miR5808, puesto que ha sido necesario el doble de RNA para detectar la presencia de estos miRNAs, sugiriendo una mayor eficiencia de procesamiento en el caso de los miRNAs conservados en *N. benthamiana*. También llama la atención la banda ancha detectada para miR1847.1, lo que podría indicar algún problema en el procesamiento de este precursor.

6.3 Transformación de callos de arroz y caracterización genotípica de las líneas transgénicas obtenidas

Una vez confirmado que las construcciones generadas para la sobreexpresión de los pre-miRNAs son eficientemente expresadas y los productos procesados para producir los miRNAs maduros *in planta*, se utilizaron estos vectores para la transformación de arroz. La transformación se realizó sobre callos embriogénicos de *O. sativa* var. Tainung67, vía transferencia de T-DNA por *A. tumefaciens*. El proceso de transformación se detalla en el apartado de materiales y métodos. Básicamente, se obtienen callos embriogénicos a partir del escutelo de semillas arroz crecidas en medio de inducción *in vitro*, luego se co-cultivan con células de *A. tumefaciens* portadoras del vector de interés, para después de la selección de los callos transformantes inducir a partir de los mismos la regeneración de planta. La selección de transformantes se realiza mediante higromicina cuya resistencia está conferida por el gen *htpII* incluido en la secuencia del T-DNA. De estas transformaciones resultaron varias líneas de transformación para cada construcción. Así, se obtuvieron 18 líneas independientes para

pC:p*Ubi*:*osa-MIR390*:t*Nos*, 12 para pC:p*Ubi*:*osa-MIR397a*:t*Nos*, 19 para pC:p*Ubi*:*osa-MIR397b*:t*Nos*, 14 para pC:p*Ubi*:*osa-MIR535*:t*Nos*, 12 para pC:p*Ubi*:*osa-MIR1319a*:t*Nos*, también 12 para pC:p*Ubi*:*osa-MIR1847*:t*Nos* y 34 para pC:p*Ubi*:*osa-MIR5808*:t*Nos*. Además se transformaron callos con el vector vacío, pero que contiene el gen de selección de resistencia a higromicina dentro del T-DNA, para el cual se regeneraron 7 líneas independientes.

En la Figura 43 se muestra un resumen del análisis genotípico de algunas de las plantas regeneradas a partir de la transformación con las diferentes construcciones. Este análisis fue realizado por PCR utilizando cebadores específicos para el promotor *Ubiquitin* del maíz y para el terminador *Nos*. El tamaño del amplicón en este caso es proporcional al tamaño del precursor clonado y transferido al genoma del arroz. Para los eventos de transformación del vector vacío, se utilizaron cebadores específicos del gen de resistencia a higromicina (*hptII*).

El rango de líneas de transformación positivas para las inserciones del T-DNA encontradas fue entre 71% para el evento del vector vacío (pC:p35S:*hptII*:t35S) y el 100% para los eventos pC:p*Ubi*:*osa-MIR397a*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR1319a*:t*Nos* y pC:p*Ubi*:*osa-MIR1847*:t*Nos*. A pesar de no haberse obtenido un 100% para los eventos pC:p*Ubi*:*osa-MIR390*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR397b*:t*Nos*, pC:p*Ubi*:*osa-MIR535*:t*Nos* y pC:p*Ubi*:*osa-MIR5808*:t*Nos*, los porcentajes de líneas positivas estaban alrededor del 90% (Tabla 12). Sin embargo, se observó que sólo el 33% de líneas positivas para los eventos de transformación para *osa-MIR5808* y *osa-MIR1319a* produjeron semillas, y un rango entre el 58 y el 72% para el resto de eventos.

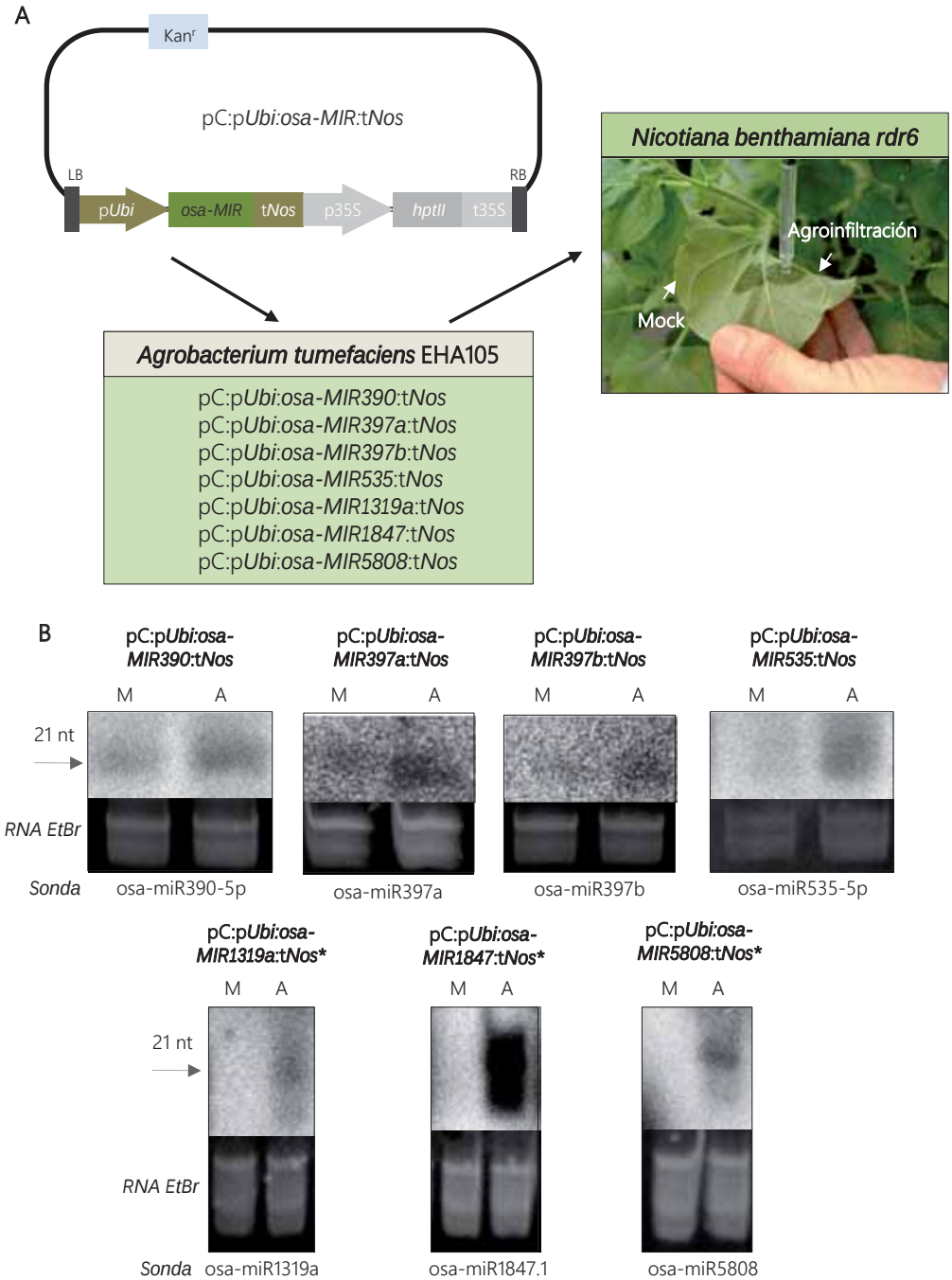

Figura 42. Procesamiento *in vivo* de los precursores de los miRNAs seleccionados. A. Diagrama del procedimiento seguido: transformación de células competentes de *A. tumefaciens* cepa EHA105 con los vectores de expresión listados en el cuadro y agroinfiltración de hojas jóvenes de *N. benthamiana rdr6*. **B.** Análisis *Northern blot* de pequeños RNAs obtenidos de hojas de *N. benthamiana rdr6* agroinfiltradas (A) o infiltradas con la solución control (M). La flecha indica la posición del marcador de peso molecular de RNA de 21 nucleótidos. Para la detección de los miRNAs se utilizaron 10 µg de RNA total, excepto en las marcadas con asterisco (*), para las que se utilizaron 20 µg. Las sondas de DNA sintéticas utilizadas para las hibridaciones de los miRNAs se indican debajo de cada membrana.

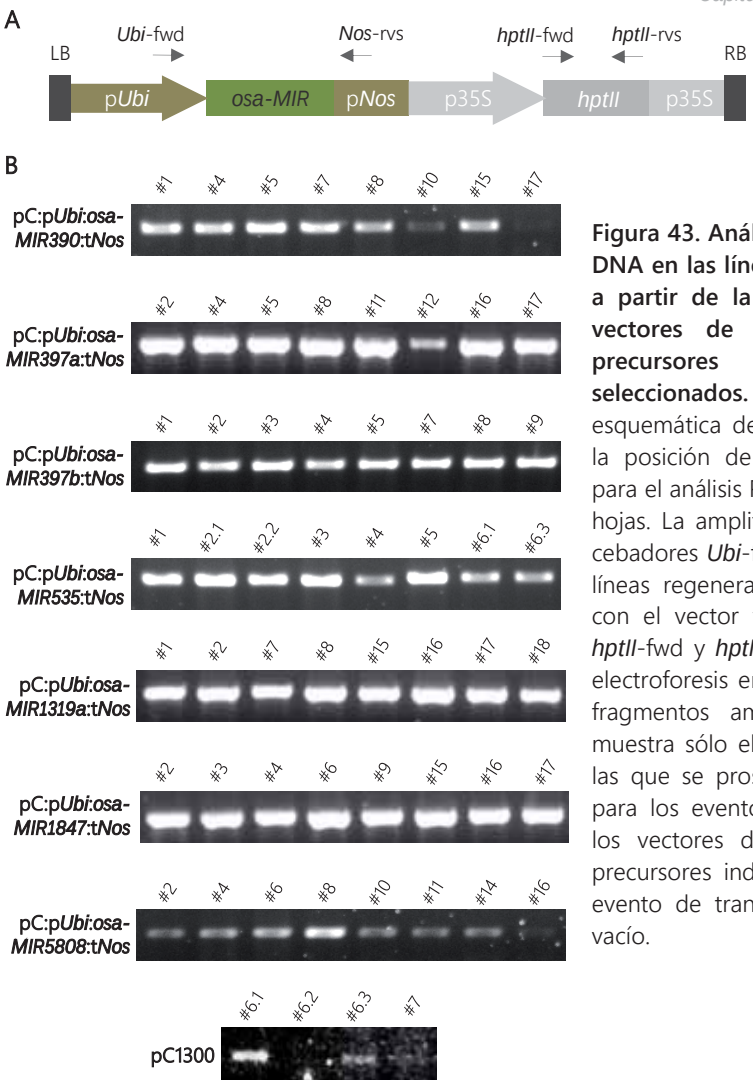

Figura 43. Análisis de la inserción del T-DNA en las líneas de arroz regeneradas a partir de la transformación con los vectores de sobreexpresión de los precursores de los miRNAs seleccionados. A. Representación esquemática del T-DNA donde se indica la posición de los cebadores utilizados para el análisis PCR del DNA genómico de hojas. La amplificación se realizó con los cebadores *Ubi*-fwd y *Nos*-rvs, salvo en las líneas regeneradas de la transformación con el vector vacío que se realizó con *hptII*-fwd y *hptII*-rvs. **B.** Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR. Se muestra sólo el análisis de las líneas con las que se prosiguió el estudio: 8 líneas para los eventos de transformación con los vectores de sobreexpresión de los precursores indicados y 4 líneas para el evento de transformación con el vector vacío.

Tabla 12. Resumen del análisis genotípico y de fertilidad de los eventos de transformación de arroz. Se indica el número de plantas regeneradas para cada evento de transformación (a) el número y el porcentaje de plantas regeneradas que han incorporado el T-DNA en su genoma (transgénicas) (b), el número de líneas transgénicas que produjeron semillas al final de su ciclo biológico (c) y el porcentaje de plantas transgénicas fértiles para cada evento de transformación (d).

Eventos	Plantas regeneradas [a]	T-DNA positivas [b]	Plantas fértiles [c]	Fertilidad [d]
pC1300	7	5 (71%)	3	60%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR390*:t*Nos*	18	16 (89%)	11	69%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR397a*:t*Nos*	12	12 (100%)	7	58%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR397b*:t*Nos*	19	18 (95%)	13	72%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR535*:t*Nos*	14	13 (93%)	8	62%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR1319a*:t*Nos*	12	12 (100%)	4	33%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR1847*:t*Nos*	12	12 (100%)	7	58%
pC:p*Ubi*:*osa-MIR5808*:t*Nos*	34	30 (88%)	10	33%

6.4 Acumulación de los miRNAs en las líneas transgénicas de arroz generadas

Luego de comprobarse que las líneas regeneradas tras la transformación portaban el transgén, se procedió a analizar la acumulación de los correspondientes miRNAs para evaluar la expresión y procesado de los precursores en plantas de arroz y seleccionar las líneas transgénicas para la obtención de homocigotas. La acumulación de los miRNAs maduros se analizó en hojas jóvenes de las líneas transgénicas mediante análisis *Northern blot* de pequeños RNAs. Se analizaron 8 líneas independientes para cada evento de transformación y los resultados se muestran en la Figura 44. Como se puede observar en la mayoría de los eventos, excepto los eventos para *osa-MIR1847* y *osa-MIR5808*, las líneas analizadas muestran mayor acumulación de los correspondientes miRNAs que la variedad silvestre sin transformar, aunque muestran diferencias en los niveles de acumulación. Este resultado indica que los transgenes se expresan y los precursores *osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osa-MIR397b*, *osa-MIR535* y *osa-MIR1319a* se procesan eficientemente en plantas de arroz, acumulando los correspondientes miRNAs maduros. Cabe destacar la acumulación del osa-miR1319a en las plantas transgénicas de arroz, apenas detectable en los ensayos de expresión transitoria de *N. benthamiana*.

A pesar de haberse comprobado su procesamiento eficiente *in vivo* en *N. benthamiana*, en las líneas de arroz portadoras del transgén diseñado para la expresión del precursor *osa-MIR5808* no se logró observar la acumulación diferencial del miRNA. Sin embargo, sí se observan bandas de acumulación de tránscritos de mayor tamaño correspondientes al pri-miRNA y el precursor. El caso del evento para *osa-MIR1847* fue similar, apenas se detecta el miRNA maduro. Solo algunas líneas presentan una banda débil en la posición del miRNA, aunque todas ellas muestran una banda de mayor intensidad que se podrían corresponder con el tránscrito primario o el pre-miRNA. Aunque fue posible observar la acumulación de osa-miR1847.1 en las líneas transgénicas analizadas, los niveles eran más bajos que los detectados con los otros miRNAs en los demás eventos de transformación. Estos resultados prueban la correcta expresión del

precursor pero con un procesamiento ineficiente al miRNA maduro en las plantas de arroz.

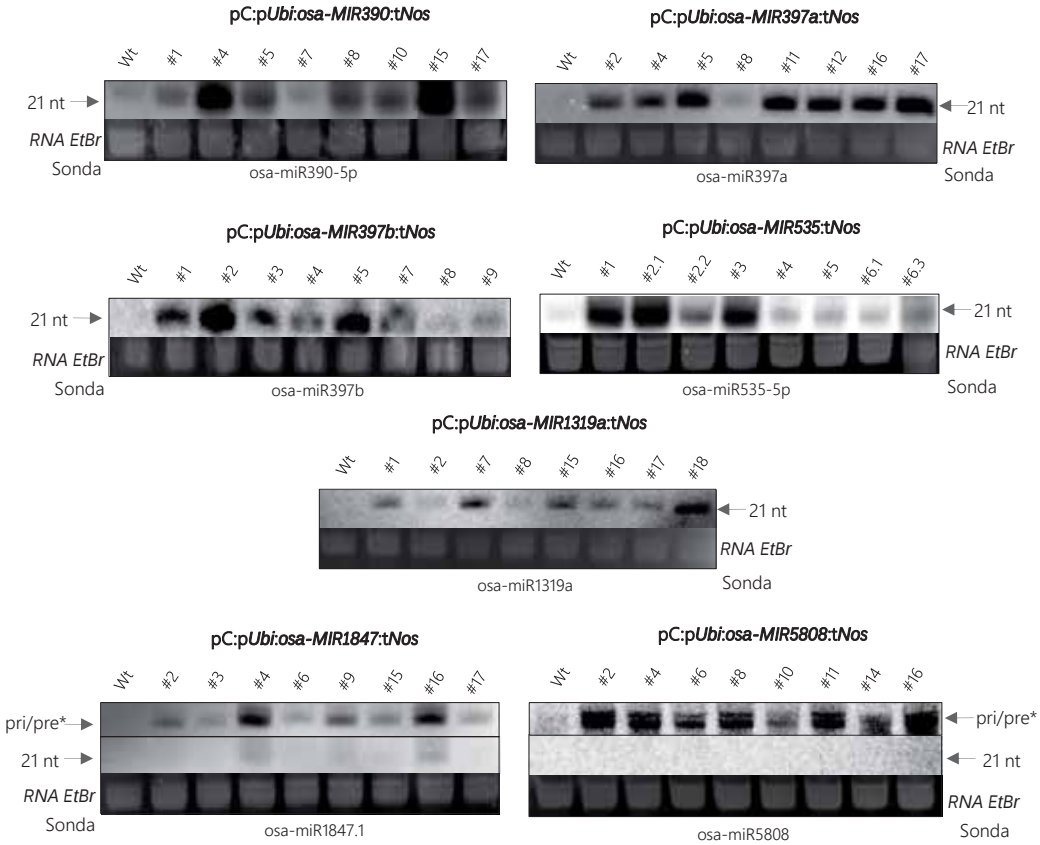

Figura 44. Análisis de la acumulación de los miRNAs en las líneas de arroz transgénicas. Análisis mediante *Northern blot* de pequeños RNAs (15 µg de RNA total) de hojas de las líneas transgénicas portadoras de los transgenes indicados. Como control se ha analizado la variedad silvestre Tainung67 (Wt), correspondiente al fondo genético de las líneas transgénicas. Las membranas se han hibridado con las sondas de DNA sintéticas indicadas debajo de cada membrana. Se indica con una flecha la posición aproximada del marcador de peso molecular de RNA de 21 nucleótidos. En las líneas portadoras de los transgenes p*Ubi*:*osa-MIR1847*:t*Nos* y p*Ubi*:*osa-MIR5808*:t*Nos* se muestra además la hibridación de la membrana en la posición aproximada de los tránscritos primarios y/o precursores que no han sido procesados al miRNA maduro (panel superior).

De esta forma se identificaron líneas independientes de arroz sobreexpresoras para la mayoría de los pre-miRNAs seleccionados. Así, se han obtenido líneas transgénicas con diferentes niveles de sobreexpresión del precursor correspondiente y de acumulación de los miRNAs maduros (Tabla 13) para los eventos *osa-MIR390*-Ox, *osa-MIR397a*-Ox, *osa-MIR397b*-Ox, *osa-MIR535*-Ox, *osa-MIR1319a*-Ox y *osa-MIR1847*-Ox, mientras que las líneas transgénicas del evento *osa-MIR5808*-Ox sobreexpresan el precursor pero no acumulan el miRNA maduro. La producción de semillas de cada línea analizada se detalla en la Tabla 13. Líneas con bajos y con altos niveles de acumulación del correspondiente miRNA han resultado estériles como las líneas *osa-MIR390*-Ox #7 y *osa-MIR397a*-Ox #17, respectivamente. Así también resultaron con alta producción de semillas líneas tanto con baja (*osa-MIR535*-Ox #5) como con alta (*osa-MIR1319a*-Ox #7) acumulación del miRNA. Se puede observar que no existe una relación entre los niveles de acumulación de los miRNAs en las líneas y la cantidad de semillas, y que, en general, se ha obtenido una baja producción de semillas en la generación T0.

Tabla 13. Resumen de los niveles de acumulación de los miRNAs y la producción de semillas de las líneas transgénicas de arroz. Se indica el evento de transformación (a), la línea independiente (b), el nivel de acumulación del miRNA correspondiente, desde un nivel similar al Wt (–) a hasta los valores más altos (+++) (c) y el número de semillas producidas (d).

Evento [a]	Línea [b]	Acumulación miRNA [c]		Semillas [d]
osa-MIR390-Ox	#1	+		70
	#4	+++		0
	#5	++		0
	#7	+		0
	#8	++		50
	#10	++		350
	#15	+++		200
	#17	++		30
osa-MIR397a-Ox	#2	+++		0
	#4	+++		50
	#5	+++		20
	#8	+		50
	#11	+++		50
	#12	+++		40
	#16	+++		0
	#17	+++		0
osa-MIR397b-Ox	#1	++		120
	#2	+++		70
	#3	++		0
	#4	+		10
	#5	+++		5
	#7	++		30
	#8	+		15
	#9	+		10
osa-MIR535-Ox	#1	+++		5
	#2.1	+++		0
	#2.2	++		0
	#3	+++		20
	#4	+		0
	#5	+		300
	#6.1	+		0
	#6.3	++		5
osa-MIR1319a-Ox	#1	++		40
	#2	+		0
	#7	+++		200
	#8	+		50
	#15	+++		30
	#16	++		0
	#17	++		0
	#18	+++		0
		miRNA	pre/pri	
osa-MIR1847-Ox	#2	–	++	0
	#3	–	+	150
	#4	+	+++	150
	#6	–	+	20
	#9	+	++	0
	#15	+	+	0
	#16	+	+++	10
	#17	–	+	0
osa-MIR5808-Ox	#2	–	++	0
	#4	–	++	10
	#6	–	+	30
	#8	–	++	0
	#10	–	+	200
	#11	–	++	0
	#14	–	+++	0
	#16	–	+++	0

7. Caracterización funcional de los miRNAs seleccionados

Las plantas de la generación T0 de líneas transgénicas sobreexpresoras generadas fueron utilizadas como herramientas para realizar el análisis funcional de los miRNAs y el estudio de sus dianas, siempre que hubo disponibilidad de semillas. En aquellos casos en los que la productividad fue escasa se pasó a la siguiente generación para la búsqueda de homocigotas y amplificación del material. A continuación se detallarán los resultados obtenidos para cada miRNA, teniendo en cuenta que descartamos las líneas portadoras de los precursores *osa-MIR1847* y *osa-MIR5808*, puesto que no se ha visto eficiencia en el procesamiento de sus miRNAs maduros.

7.1 Caracterización de *osa-MIR535*

7.1.1 Validación de dianas de *osa-MIR535*

En los análisis de predicción fueron identificadas como dianas para el miRNA osa-miR535-5p cuatro factores de transcripción del tipo SPL (*Squamosa-promoter binding protein-like*). Para validar la regulación post-transcripcional de estas dianas por el miRNA, se analizó la acumulación de los tránscritos *OsSPL4* (LOC_Os02g07780), *OsSPL11* (LOC_Os06g45310) *OsSPL12* (LOC_Os06g49010) y *OsSPL19* (LOC_Os11g30370) en hojas de dos líneas transgénicas independientes de sobreexpresión del precursor *osa-MIR535*. Como se puede ver en la Figura 45, se ha encontrado que *OsSPL12* presenta niveles de acumulación transcripcional más bajos en ambas líneas transgénicas *osa-MIR535*-Ox, comparadas con las líneas control del vector vacío (Ev), mientras que la acumulación de los otros tres tránscritos *SPL* no se ve alterada. La acumulación de *OsSPL12* se ve reducida hasta en un 80% en las líneas sobreexpresoras de *osa-MIR535*, confirmándose que, en las condiciones de este trabajo, el tránscrito codificante para la proteína OsSPL12 podría estar regulado por osa-miR535-5p.

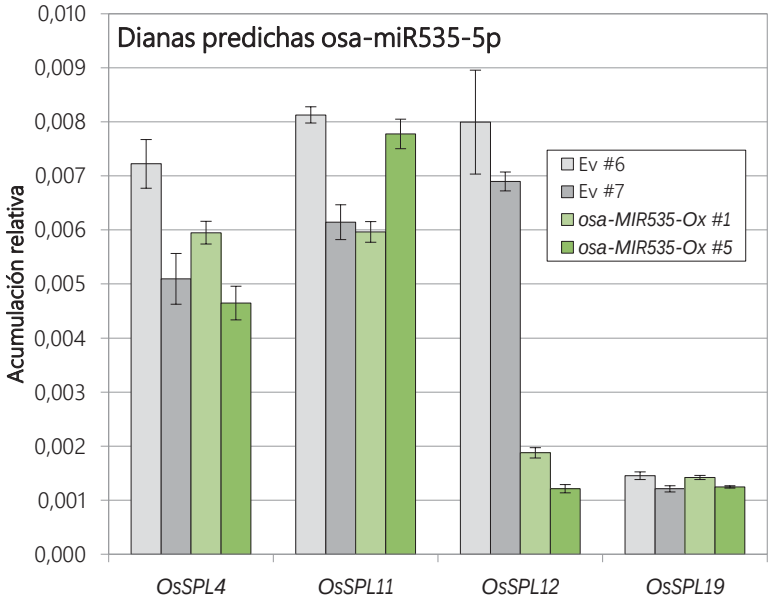

Figura 45. Análisis de acumulación de los tránscritos predichos como dianas para osa-miR535-5p en las líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR535*. Se muestra el valor medio de los niveles de acumulación de los tránscritos de genes *OsSPL* (*Squamosa-promoter binding protein-like*) predichos *in silico* como dianas de osa-miR535-5p en hojas jóvenes de dos líneas transgénicas sobreexpresoras del precursor del miRNA (generación T0). Los niveles de acumulación se cuantificaron mediante qRT-PCR utilizando como gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) y se compararon con dos líneas transgénicas independientes transformadas con el vector vacío (Ev). Los cebadores para amplificar la secuencia del tránscrito incluyen el sitio de corte por el miRNA y corresponden a los siguientes loci: *OsSPL4* (LOC_Os02g07780), *OsSPL11* (LOC_Os06g45310), *OsSPL12* (LOC_Os06g49010) y *OsSPL19* (LOC_Os11g30370). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

7.2 Caracterización de *osa-MIR390* en las respuestas de defensa y sequía

Como se ha presentado anteriormente, la acumulación de osa-miR390-5p está regulada en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos y frente a infección por *M. oyzae*, por lo que podría estar implicado en las respuestas de las plantas de arroz frente a patógenos. Además, el promotor del precursor de este miRNA contiene varios elementos regulatorios asociados a la respuesta de la planta frente a estrés hídrico. Por estos motivos, en este trabajo se ha propuesto caracterizar funcionalmente este miRNA en las respuestas de defensa y sequía de la planta de arroz.

7.2.1 Validación de dianas de *osa-MIR390*

Se analizó la acumulación de tránscritos de 4 quinasas, que han sido predichos como dianas para osa-miR390-5p, en dos líneas independientes sobreexpresoras del precursor correspondiente (*osa-MIR390*-Ox). Las quinasas predichas como dianas para osa-miR390-5p que fueron analizadas son *OsSIK1* (LOC_Os06g03970), *OsWAK43* (LOC_Os04g29960), *OsRLK5* (LOC_Os01g33110) y *OsBAK* (LOC_Os05g34270). Ambas líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* presentaron niveles de acumulación transcripcional muy bajos de *OsSIK1* comparadas con las líneas control del vector vacío (Ev). La acumulación de este tránscrito en las líneas transgénicas se ve disminuida casi totalmente (Figura 46). No se observó disminución de la acumulación de *OsWAK43*, *OsRLK5* ni *OsBAK*, sino al contrario, en las líneas *osa-MIR390*-Ox se vio un aumento de los dos últimos, situación que podría deberse a un mecanismo de autorregulación de las vías de señalización donde cumple funciones la proteína OsSIK1 y podría darse el caso de que estas quinasas la sustituyan en funciones en respuesta a sus bajos niveles de acumulación. Los resultados obtenidos sugieren que el tránscrito del gen *OsSIK1* podría estar regulado por osa-miR390-5p.

7.2.2 Respuesta de *osa-MIR390* y *OsSIK1* frente a infección por *M. oryzae*

Se caracterizó la acumulación de osa-miR390-5p y su potencial diana *OsSIK1* frente a infección por *M. oryzae* y se analizó la correlación entre las respuestas de ambos reguladores. La acumulación del miRNA se determinó por *stemloop* qRT-PCR y la del tránscrito diana por qRT-PCR en hojas de arroz a diferentes tiempos después de ser inoculadas con esporas del hongo.

La cinética de acumulación de osa-miR390-5p y del tránscrito *OsSIK1* mostró un perfil dinámico y bastante similar para ambos (Figura 47). Se detecta una caída en la acumulación de osa-miR390-5p que comienza a las 6 horas y continua hasta las 12 horas después de la inoculación (0,6 en relación a condiciones control), después suben

para volver a caer a las 48 horas. Igualmente, los niveles de acumulación del tránscrito *OsSIK1* se ven reprimidos tanto a las 12 horas (0,6 respecto al control) como a las 48 horas (0,4) post-infección. Esto podría deberse a un desfase temporal en la regulación de *OsSIK1* por parte de osa-miR390-5p.

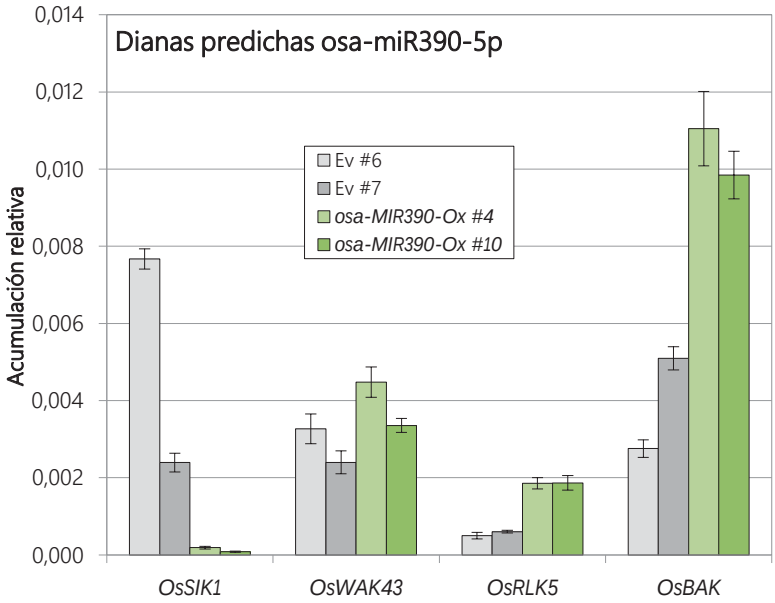

Figura 46. Análisis de acumulación de los tránscritos predichos como dianas para osa-miR390-5p en las líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR390*. Se muestra el valor medio de los niveles de acumulación de los tránscritos codificantes para proteínas quinasas predichos *in silico* como dianas de osa-miR390-5p en hojas jóvenes de dos líneas transgénicas sobreexpresoras del precursor del miRNA (generación T0). Los niveles de acumulación se cuantificaron mediante qRT-PCR utilizando como gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) y se compararon con dos líneas transgénicas independientes transformadas con el vector vacío (Ev). Los cebadores para amplificar la secuencia del tránscrito incluyen el sitio de corte por el miRNA y corresponden a los siguientes loci: *OsSIK1* (LOC_Os06g03970), *OsWAK43* (LOC_Os04g29960), *OsRLK5* (LOC_Os01g33110) y *OsBAK1* (LOC_Os05g34270). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

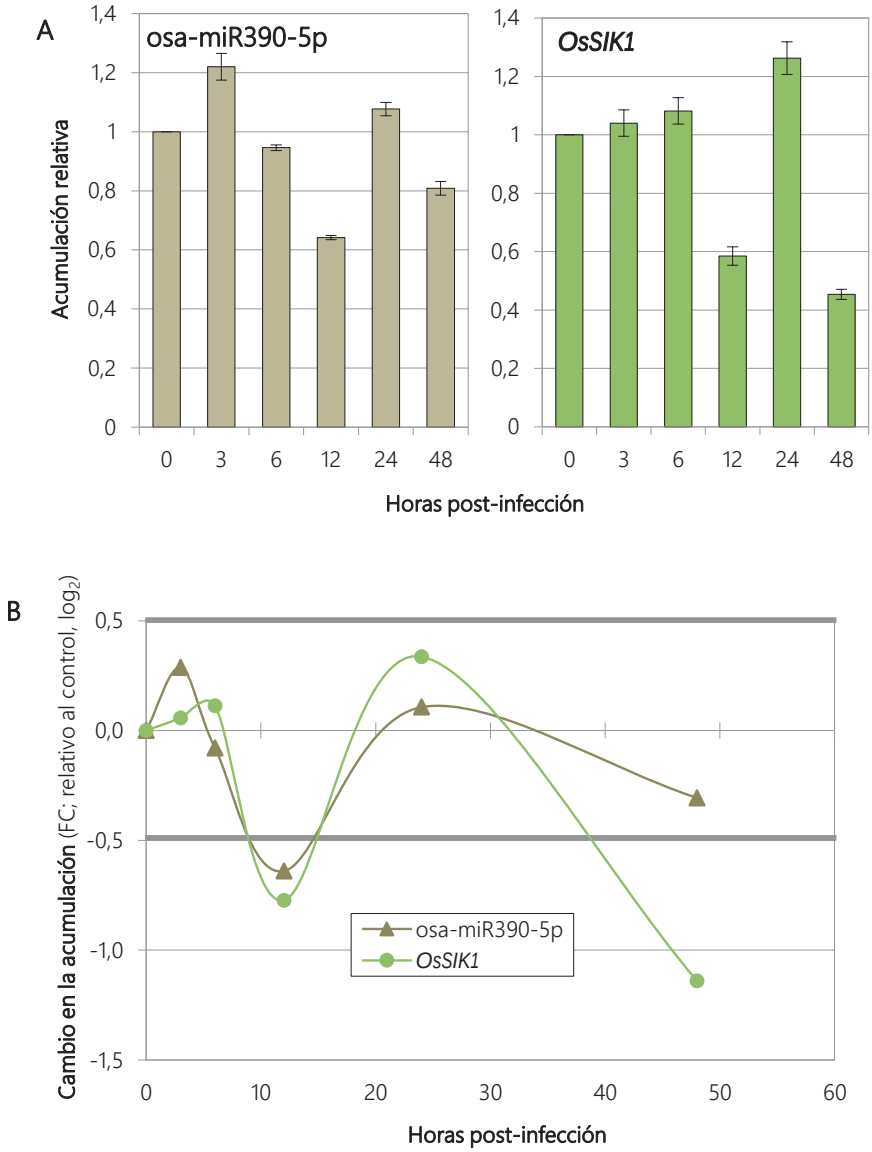

Figura 47. Acumulación de osa-miR390-5p y de tránscritos de su diana *OsSIK1* en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. A. Gráficas de los niveles de acumulación de osa-miR390-5p y del tránscrito *OsSIK1*, cuantificados por *stemloop* qRT-PCR y qRT-PCR, en plantas de arroz inoculadas por aspersión de una suspensión de esporas de *M. oryzae* a 10^5 esp/ml o con agua estéril (control). Las muestras fueron tomadas a los tiempos indicados luego de la inoculación. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR390-5p y *OsSIK1* (LOC_Os06g03970) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. Los valores de la acumulación están referenciados al valor obtenido en la muestra control de cada tiempo (valor de referencia del control=1). **B.** Gráfica de la dinámica temporal de acumulación de osa-miR390-5p y su diana *OsSIK1* en respuesta a infección por *M. oryzae*. El eje de las ordenadas se representa el cambio logarítmico en la acumulación (FC) en condiciones de infección, relativo a la acumulación en el control. En el eje de las abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la inoculación. Las líneas gruesas indican el umbral correspondiente a un cambio sustancial en la acumulación (criterio: FC=±0,5).

7.2.3 Caracterización de líneas de *Arabidopsis thaliana* con acumulación diferencial de miR390 frente a infección

Dado que el miR390 está conservado en Arabidopsis, y que disponíamos de una colección de líneas de imitación de diana (*target mimicry*) de miRNAs generada en el grupo del Dr. D. Weigel (Todesco *et al.*, 2010), se decidió analizar el efecto de la pérdida de la función del miRNA en la resistencia/susceptibilidad a infección por hongos de la planta de Arabidopsis. Las líneas de imitación de diana son transgénicas que sobreexpresan un tránscrito que mimetiza una diana del miRNA en estudio, secuestrando el miRNA para el cual ha sido diseñado, causando una pérdida de función del miRNA maduro. En Arabidopsis se han descrito dos homólogos de *osa-MIR390* (*ath-MIR390a* y *ath-MIR390b*), y disponíamos de una línea "*target mimicry*" (MIM-miR390) en la que ambos miembros se ven afectados. El análisis de la acumulación de ath-miR390 en estas líneas se muestra en la Figura 48A, donde se observa que las plantas MIM-miR390 presentan una menor acumulación del miRNA en comparación con las líneas control.

Se ha evaluado el fenotipo de la línea MIM-miR390 en respuesta a infección por el hongo necrótrofo *Plectosphaerella cucumerina*, en condiciones de crecimiento *in vitro* y en plántulas crecidas en tierra. Las plántulas crecidas *in vitro* no presentan diferencias visibles en el fenotipo frente a la infección comparadas con la línea control (Figura 48B). Bajo observación microscópica se cuantificaron las hojas lesionadas en cada planta y no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de lesiones entre las plantas MIM-miR390 y la línea control, ambas con aproximadamente el 70% de hojas lesionadas por la infección (Figura 48C). Tampoco se observaron diferencias visibles en el fenotipo ante la infección por el hongo en plantas crecidas en tierra (Figura 48D). En las condiciones de este trabajo y según los resultados obtenidos, ath-miR390 no parece estar implicada funcionalmente en las respuestas de defensa de Arabidopsis frente a infección por el hongo necrótrofo *P. cucumerina*.

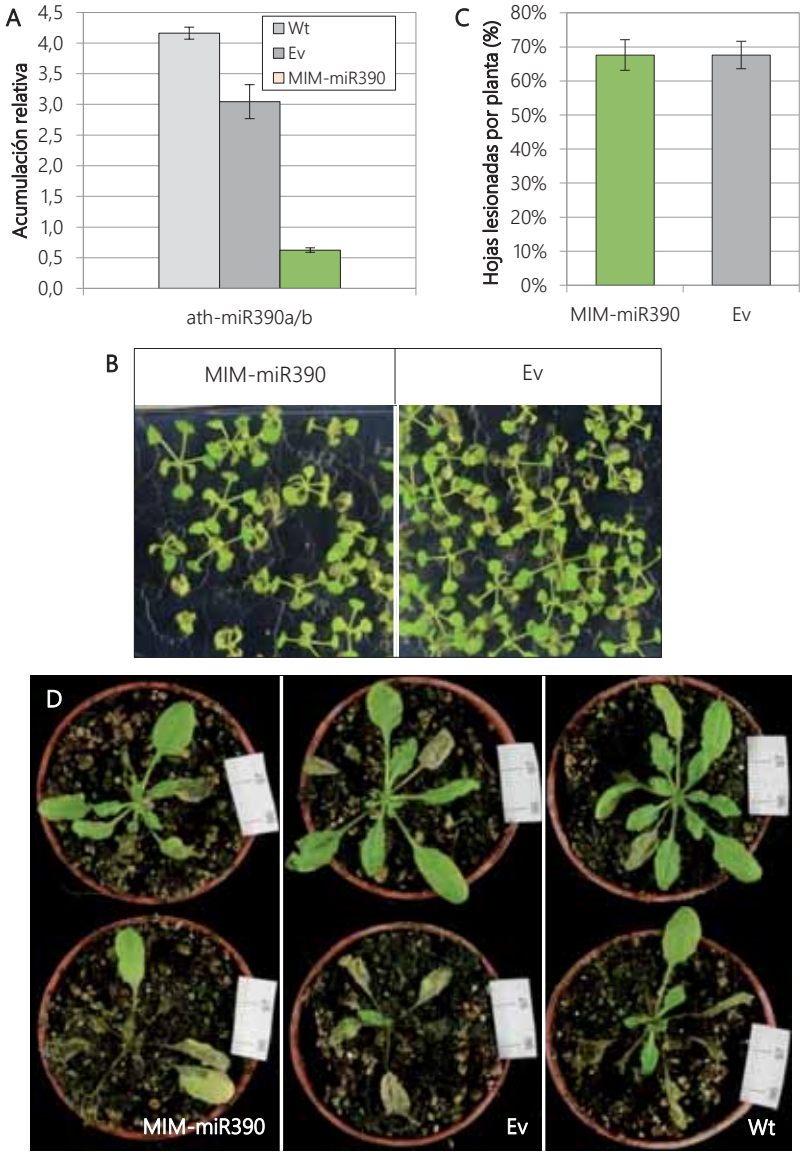

Figura 48. Caracterización de las líneas MIM-miR390 de *A. thaliana* en respuesta a infección por *P. cucumerina*. A. Niveles de acumulación del miR390 en plantas de Arabidopsis MIM-miR390, portadoras de vector vacío (Ev) y silvestres sin transformar (Wt) cuantificados por *stemloop* qRT-PCR. Las muestras corresponden a hojas de plántulas de 21 días crecidas en tierra en condiciones de invernadero. Se muestran los valores de acumulación media de ath-miR390a/b frente al gen de referencia *Tubulin* (At5g62700). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. **B.** Imágenes representativas de la infección causada por *P. cucumerina* a los 7 dpi. El ensayo se realizó con plántulas de 14 días crecidas *in vitro* en medio MS sólido inoculadas por rociado de una suspensión de esporas de *P. cucumerina* (10^5 esp/ml). **C.** Cuantificación del porcentaje de hojas lesionadas a los 7dpi según se indica en B. Se muestra el valor medio y el SEM de un ensayo con al menos 25 plántulas por línea y es representativo de dos réplicas experimentales. **D.** Imágenes representativas de ensayos de infección con plantas de 21 días crecidas en tierra e inoculadas con una suspensión de esporas de *P. cucumerina* (10^5 esp/ml). Las fotos fueron tomadas a los 11 dpi y son representativas de ensayos independientes.

7.2.4 Caracterización de las líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* frente a infección

Para caracterizar funcionalmente a *osa-MIR390* en la respuesta de defensa de las plantas de arroz, se realizaron ensayos de infección con *M. oryzae* en plantas de la generación T1 de las líneas *osa-MIR390*-Ox generadas en este trabajo. Como controles se utilizaron plantas silvestres sin transformar (Wt) y líneas con el mismo fondo genético que han pasado por el proceso de transformación de callos pero que han perdido la inserción del T-DNA, es decir, azigotas para el evento de transformación (Az).

Las plantas de 21 días de las líneas *osa-MIR390*-Ox no presentan diferencias fenotípicas visibles comparadas con plantas de la variedad silvestre, en las condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo (Figura 49A). Luego de la infección por *M. oryzae*, las hojas analizadas de las líneas *osa-MIR390*-Ox presentan más tejido necrosado en comparación con los controles Wt y Az (Figura R49B). La cuantificación del área lesionada mediante análisis de imágenes muestra que el área de lesión en las hojas de las líneas sobreexpresoras de *osa-MIR390* es significativamente mayor que el de la variedad silvestre y las líneas azigotas (Figura 49C). En las condiciones de este trabajo se ha encontrado que plantas con altos niveles de acumulación de osa-miR390 son más sensibles a la infección por *M. oryzae*, resultados que confirman que este miRNA es un regulador negativo de las respuestas de defensa de las plantas de arroz.

7.2.5 Caracterización de las líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* en respuesta a sequía

Se ha evaluado la respuesta de *osa-MIR390* frente a estrés hídrico. Para esto se analizó la acumulación de osa-miR390-5p en hojas de plantas de arroz que habían sido sometidas a desecación. En la Figura 50 se muestran los cambios en la acumulación del miRNA en respuesta a la desecación, observándose una débil inducción después de 30 minutos, pero lo más llamativo es la fuerte represión después de 1 hora de iniciada la

desecación, llegando casi a valores de -0,4 en relación al control. El miRNA osa-miR390-5p está principalmente reprimido en respuesta a estrés hídrico, lo que indica que podría ser un regulador negativo de las respuestas de la planta de arroz frente a sequía, al igual que se había observado durante la respuesta de defensa.

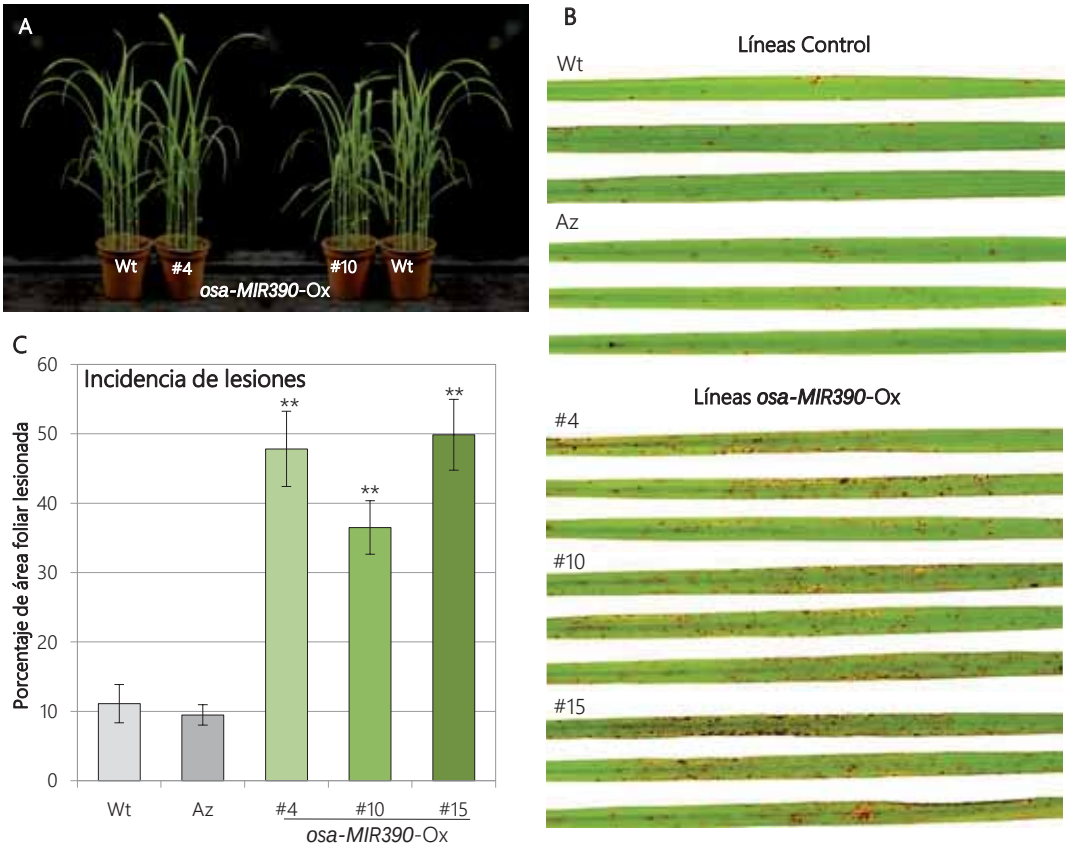

Figura 49. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* en respuesta a infección por *M. oryzae*. A. Plantas de 21 días de las líneas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR390*, generación T1, comparadas con plantas de la variedad silvestre Tainung67 (Wt). **B.** Imágenes representativas de las lesiones causadas por la infección con *M. oryzae* aislado Guy11 en la penúltima hoja emergida a los 7 días post-inoculación por aspersión de una suspensión de esporas a concentración de 10^5 esp/ml. **C.** Promedio del porcentaje del área foliar lesionada debido a la infección por *M. oryzae*. Cuantificación del área de lesión realizada por análisis de imágenes con el programa informático Assess v2.0. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de al menos 6 réplicas biológicas. Los asteriscos corresponden a diferencias significativas según análisis de ANOVA (**=p<0,01). Los datos mostrados son de un ensayo independiente representativo de dos réplicas experimentales.

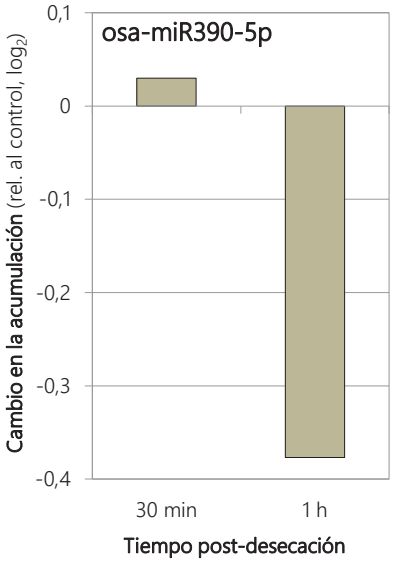

Figura 50. Acumulación de osa-miR390-5p en plantas de arroz en respuesta a estrés hídrico. La gráfica representa el cambio logarítmico de la acumulación de osa-miR390-5p en respuesta al tratamiento de desecación en hojas de la variedad silvestre Nipponbare, realizado bajo campana de flujo laminar, a los 30 minutos y 1 hora después de iniciado el tratamiento. Valores de la acumulación cuantificados por *stemloop* qRT-PCR. El cambio en la acumulación es relativo a la acumulación en condiciones control sin desecar y tomando como gen de referencia el de la *OsUbi1* (LOC_Os06g46770).

Se utilizaron las líneas de sobreexpresión de *osa-MIR390* para analizar su fenotipo en condiciones de sequía. Luego de evaluar los resultados de 2 réplicas experimentales, no se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas de las líneas *osa-MIR390*-Ox y las plantas control de la variedad silvestre y las azigotas (Figura 51). En este trabajo se ha descrito que el tránscrito del gen *OsSIK1* es una diana regulada por el miRNA osa-miR390-5p y en la literatura se encuentran evidencias de que esta quinasa está implicada en la respuesta de las plantas de arroz a estrés hídrico (Ouyang *et al.*, 2010). Se sabe que las plantas de arroz sobreexpresoras de *OsSIK1* son más tolerantes a sequía, y dado que en las líneas *osa-MIR390*-Ox mostraban bajos niveles de acumulación de los tránscritos de ese gen, la hipótesis de partida era que fuesen más sensibles a la falta de agua. En las condiciones de este trabajo no se observaron diferencias entre las líneas *osa-MIR390*-Ox y los controles silvestres o líneas azigotas, mientras que sí se observaron diferencias con otras líneas evaluadas en paralelo (*OsCPK13*-Ox). Aunque no se puede descartar que las condiciones utilizadas en este trabajo no hayan sido las más adecuadas para evaluar el fenotipo de estas líneas frente a sequía, estos resultados apuntan a que la sobreexpresión de *osa-MIR390* en plantas de arroz no afecta su tolerancia o susceptibilidad a sequía.

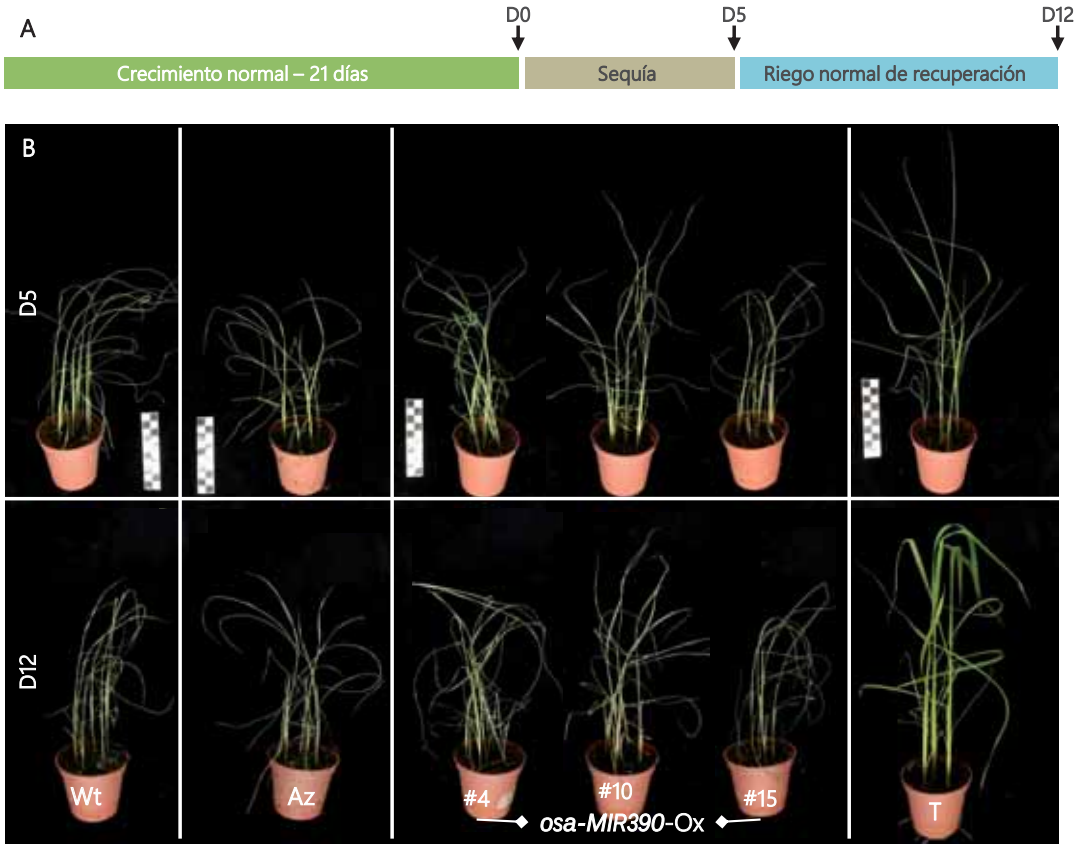

Figura 51. Fenotipo de las líneas *osa-MIR390*-Ox en respuesta a sequía. A. Diagrama del diseño experimental para la caracterización de la tolerancia a sequía. Las plantas se crecieron durante 21 días en invernadero en condiciones de riego normal y continuo. En ese momento (D0) se ha empezado el tratamiento sin riego por 5 días (D5). Después del periodo de sequía han sido recuperadas con tratamiento de riego normal y continuo durante 7 días (D12). **B.** Imágenes representativas de plantas de líneas *osa-MIR390*-Ox, y los controles silvestre Tainung67 (Wt), azigota (Az) y la línea de arroz de sobreexpresión del gen *OsCPK13* tolerante a sequía (T) sometidas a un tratamiento de sequía durante 5 días por falta de riego (D5, paneles superiores) y uno de recuperación con riego normal durante 7 días (D12, paneles inferiores). Las imágenes mostradas son representativas de dos ensayos independientes.

7.3 Caracterización de *osa-MIR397* en las respuestas de defensa y sequía

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una acumulación diferencial de osa-miR397 en respuesta al tratamiento con elicitores y frente a la infección por el hongo *M. oryzae* en la planta de arroz, por lo que se propuso caracterizar la acumulación de sus tránscritos diana durante la respuesta de defensa de la planta de

arroz. Además se decidió caracterizar la participación funcional de este miRNA en la adaptación de la planta de arroz a estrés hídrico, puesto que habíamos identificado elementos reguladores de respuesta a sequía en sus secuencias promotoras.

7.3.1 Validación de dianas de *osa-MIR397*

Como se ha mostrado anteriormente, la predicción de dianas para los miembros osa-miR397 identificó a los tránscritos de varias proteínas lacasas, y además los genes *OsLAC12* y *OsLAC13* ya han sido validados como sus dianas (Li *et al.*, 2011b; Zhang *et al.*, 2013). Según la plataforma Uniprot (http://www.uniprot.org/) en arroz han sido descritas 25 lacasas, sin embargo, el análisis bioinformático de predicción de dianas ha dado como resultado un gen lacasa adicional (LOC_Os01g62490) que se ha denominado *OsLAC26*, siguiendo con la nomenclatura. Las secuencias de los 26 tránscritos de los genes codificantes para proteínas lacasas se utilizaron para construir un árbol filogenético usando el método PhyML (Guindon *et al.*, 2010) en el programa informático SeaView (Gouy *et al.*, 2010) a partir del alineamiento de la región codificante realizado en la plataforma MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/). La Figura 52A muestra el alineamiento de las secuencias, donde se puede ver que el sitio de reconocimiento está bastante conservado en casi todas las lacasas, sin embargo no todas presentan la especificidad de secuencia para ser reguladas por los osa-miR397. El árbol obtenido a partir de este alineamiento se muestra en la Figura 52B, donde se resaltan aquellas lacasas predichas como dianas y las dos validadas en la literatura. El gen *OsLAC26* se ha encontrado particularmente interesante ya que es el que se encuentra más próximo filogenéticamente a los de las lacasas validadas como dianas, por lo que ha sido seleccionada para el análisis de su acumulación en las líneas de sobreexpresión de *osa-MIR397*.

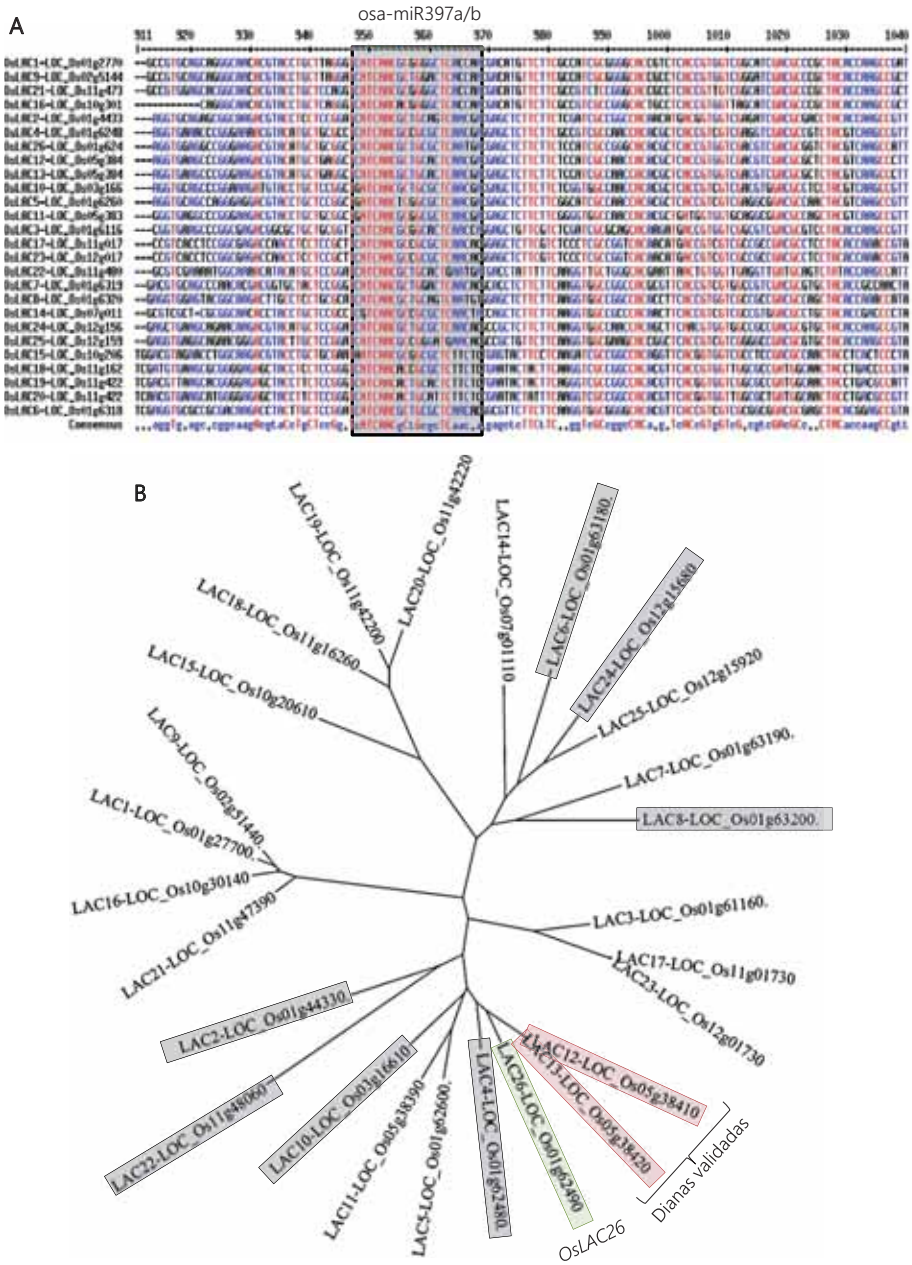

Figura 52. Análisis de las lacasas de arroz. A. Alineamiento de las secuencias correspondientes al mRNA de los genes *OsLAC* conocidos en arroz. Se muestra sólo el fragmento donde se encuentra el sitio conservado de reconocimiento por los miRNAs osa-miR397a y osa-miR397b, y que se indica con un cuadro oscuro. Las 25 lacasas conocidas fueron consultadas en la base de datos Uniprot (http://www.uniprot.org/) y se ha añadido una lacasa predicha como diana para estos miRNAs, indicada como *OsLAC26* (LOC_Os01g62490). Las secuencias nucleotídicas de los tránscritos fueron consultadas en la base de datos *Rice Genome Annotation Project* (http://rice.plantbiology.msu.edu/) y el alineamiento realizado en la plataforma MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/). **B.** Árbol filogenético de las lacasas de arroz construido a partir del alineamiento mostrado en (A), realizado por el método PhyML en el programa bioinformático SeaView v4. Se indican en cuadros rojos las lacasas validadas experimentalmente (*OsLAC12* y *OsLAC13*), en verde la lacasa *OsLAC26* y en gris otras lacasas predichas como dianas para osa-miR397a y/o osa-miR397b.

El análisis de la acumulación de las tres lacasas seleccionadas (*OsLAC12*, *OsLAC13* y *OsLAC26*) en las líneas de sobreexpresión de los dos miembros de la familia osa-miR397, en comparación con las líneas controles portadoras del vector vacío se muestra en la Figura 53. Los tránscritos de *OsLAC12* y *OsLAC13* fueron amplificados y cuantificados indistintamente en los análisis de qRT-PCR de este trabajo. Los datos muestran unos niveles de acumulación claramente reducidos para las tres lacasas en tres líneas independientes de sobreexpresión de *osa-MIR397a* y dos líneas *osa-MIR397b*-Ox, en comparación con las líneas del vector vacío. La acumulación transcripcional de *OsLAC12/OsLAC13* es tan bajo que es casi indetectable en la línea *osa-miR397a*-Ox #4, así como en las dos líneas *osa-miR397b*-Ox analizadas. En el caso de *OsLAC26*, los niveles de acumulación son muy bajos, aunque un poco mayores que las observadas en *OsLAC12/OsLAC13*, lo que podría indicar que los miRNAs osa-miR397 tienen mayor eficiencia en la regulación de estos dos últimos. Este resultado confirma que estas líneas son eficientes en la regulación post-transcripcional de sus dianas. Según los resultados obtenidos, el tránscrito del gen *OsLAC26* es una diana regulada en arroz por los miembros osa-miR397.

7.3.2 Respuesta de *osa-MIR397* y sus dianas frente a infección por *M. oryzae*

Inicialmente se evaluó mediante análisis de *Northern blot*, la acumulación de osa-miR397b en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de plantas de arroz infectadas localmente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 54, donde se observa una menor acumulación del miRNA en condiciones de infección, principalmente a las 12 y 24 horas después de la inoculación. Resulta destacable el aumento considerable de la acumulación de osa-miR397b en condiciones control a lo largo del tiempo. Esto podría deberse a una respuesta a la manipulación durante el ensayo, probablemente inducido por la herida realizada en la hoja, ya que el ensayo se realizó en hojas cortadas. No obstante, mediante este análisis se pudo confirmar la represión de osa-miR397 en respuesta a infección y que además presenta inducción por heridas.

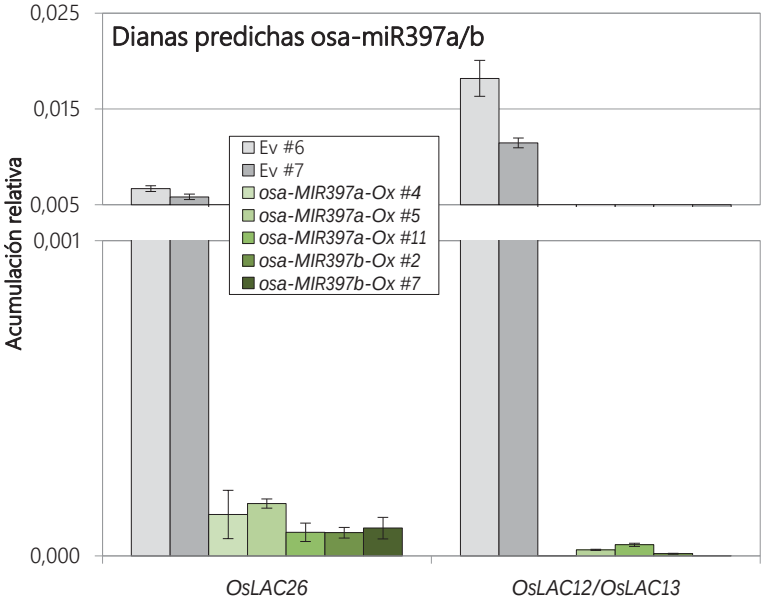

Figura 53. Análisis de acumulación de los tránscritos *OsLAC26* y *OsLAC12/13* en las líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR397a* y *osa-MIR397b*. Se muestra el valor medio de los niveles de acumulación de los tránscritos codificantes para las proteínas lacasas *OsLAC26* (LOC_Os01g62490), *OsLAC12* (LOC_Os05g38410) y *OsLAC13* (LOC_Os05g38420), estos dos últimos cuantificados indistintamente por ser genes parálogos, frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770) determinados mediante qRT-PCR en hojas jóvenes de tres líneas independientes *osa-MIR397a*-Ox, dos líneas independientes *osa-MIR397b*-Ox y dos del vector vacío (Ev), todas de la generación T0. Cuantificación realizada por qRT-PCR utilizando cebadores específicos para amplificar la secuencia del tránscrito que incluye el sitio de corte por el miRNA. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

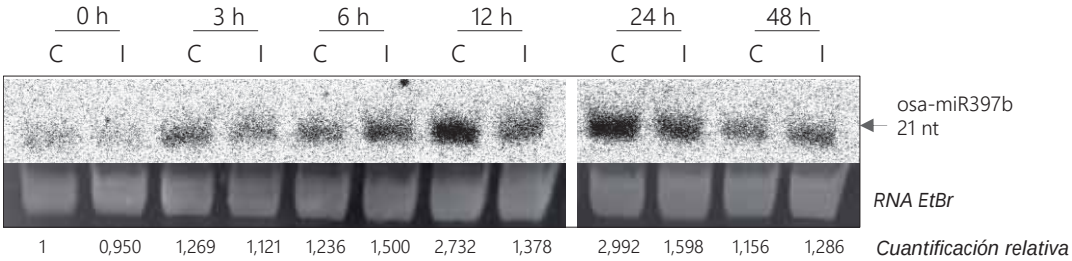

Figura 54. Acumulación de osa-miR397b en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. Análisis *Northern blot* de pequeños RNAs (10 µg de RNA por carril) de hojas de arroz variedad Nipponbare controles (C) o inoculadas (I) localmente con papeles de filtro embebidos en una suspensión de esporas de *M. oryzae* a 10^5 esp/ml a los tiempos indicados. La sonda sintética utilizada para la hibridación fue la de la secuencia de DNA completa de osa-miR397b. Se indica además la cuantificación de la intensidad de las bandas observadas relativas al control de carga de RNA total, realizada en el programa de análisis de imágenes MultiGauge de Fuji™ v2.0. Se ha tomado como referencia la acumulación al tiempo inicial en el control (valor=1). La flecha indica la posición del marcador de peso molecular de RNA de 21 nucleótidos.

La acumulación de osa-miR397 se monitorizó en plantas de arroz infectadas por *M. oryzae* en ensayos de infección de planta entera, y además se analizó el perfil de acumulación de sus dianas (Figura 55A). Los resultados muestran una cinética dinámica tanto para los tránscritos de las lacasas como para osa-miR397. La acumulación de osa-miR397 se ve generalmente reprimida en respuesta a infección en el tiempo, desde las 3 horas hasta después de 48 horas de infección (entre 0,6 y 0,8 relativo al control), excepto a las 24 horas de la infección cuando se ve una leve inducción. Las lacasas *OsLAC26* y las parálogas *OsLAC12/OsLAC13*, en general, también presentan una represión en respuesta al proceso infectivo, la primera especialmente intensa después de 3 horas de la inoculación (0,5 relativo al control) y *OsLAC12/13* una respuesta leve pero muy constante desde las 3 horas hasta las 24 horas después de iniciada la infección. La dinámica de acumulación de estos componentes se grafican en la Figura 55B, y se puede ver que los cambios en general no parecen tener una correlación entre osa-miR397 y sus dianas. Aun así, se pueden establecer relaciones entre esos componentes en momentos muy puntuales después de la infección, como ocurre después de 48 horas, cuando se ve una fuerte represión de osa-miR397 y una inducción de *OsLAC12/13*. Estas dinámicas de acumulación durante la respuesta de defensa de las plantas de arroz podrían indicar que los osa-miR397 regulan la acumulación de sus dianas de forma preferente a distintos tiempos de acuerdo a las funciones específicas de estas lacasas y de acuerdo a las necesidades de la planta.

Según los resultados obtenidos, osa-miR397 está principalmente reprimida, así como sus dianas *OsLAC12*, *OsLAC13* y *OsLAC26*, aunque todos estos componentes presentan dinámicas y correlaciones variables durante las respuestas de defensa de la planta de arroz frente a *M. oryzae*.

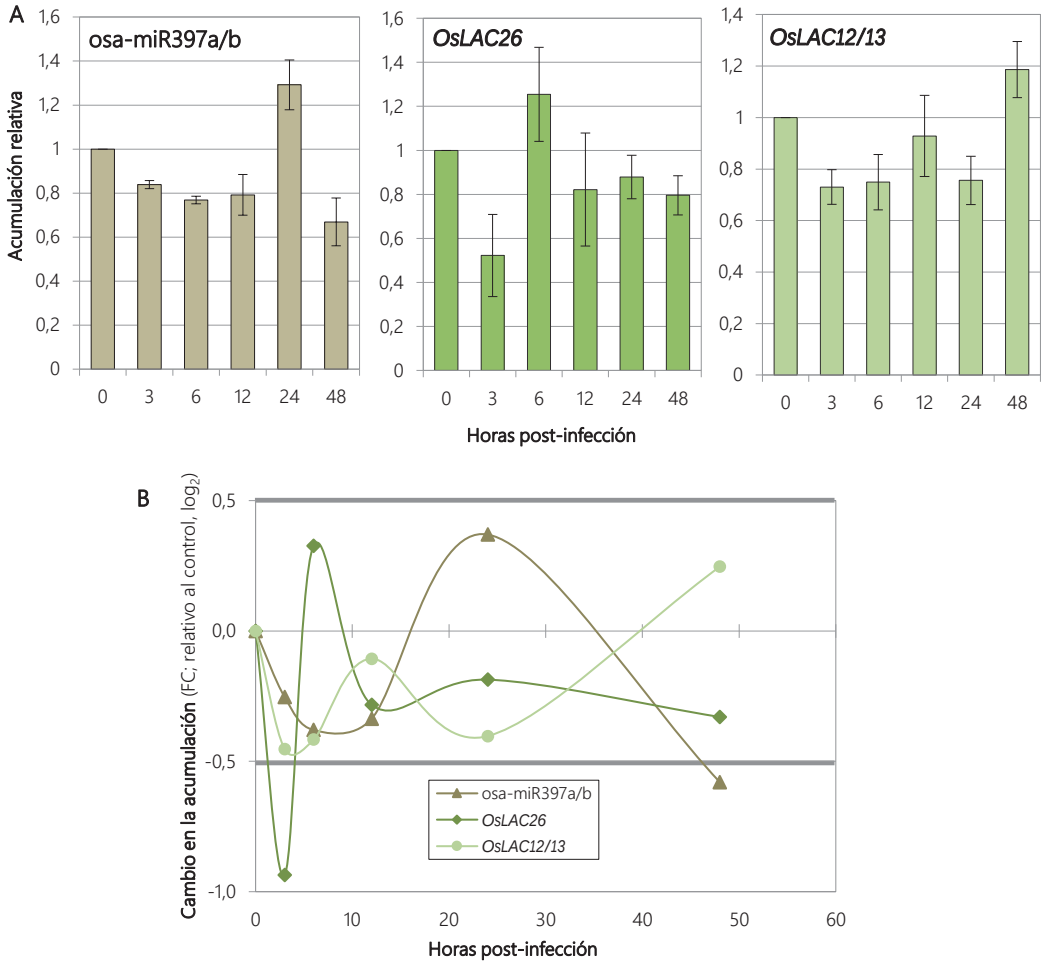

Figura 55. Acumulación de los osa-miR397 y sus tránscritos dianas en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. A. Gráficas de los niveles de acumulación de los osa-miR397 y de los tránscritos *OsLAC12*, *OsLAC13 y OsLAC26*, cuantificados por *stemloop* qRT-PCR y qRT-PCR. Plantas de arroz inoculadas por aspersión de una suspensión de esporas de *M. oryzae* a 10^5 esp/ml o con agua estéril (control). Las muestras fueron tomadas a los tiempos indicados luego de la inoculación. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR397a y osa-miR397b, *OsLAC26* (LOC_Os01g62490), *OsLAC12* (LOC_Os05g38410) y *OsLAC13* (LOC_Os05g38420) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). La acumulación de osa-miR397a y osa-miR397b se cuantificó indistintamente, así como la acumulación de las lacasas parálogas *OsLAC12* y *OsLAC13*. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. Los valores de la acumulación están referenciados al valor obtenido en la muestra control de cada tiempo (valor de referencia del control=1). **B.** Gráfica de la dinámica temporal de acumulación de osa-miR397a/b y acumulación de sus dianas *OsLAC26*, *OsLAC12* y *OsLAC13* en respuesta a infección por *M. oryzae*. El eje de las ordenadas se representa el cambio logarítmico en la acumulación (FC) en condiciones de infección, relativo a la acumulación en el control. En el eje de las abscisas se representa el tiempo (horas) transcurrido después de la inoculación. Las líneas gruesas indican el umbral correspondiente a un cambio sustancial en la acumulación (criterio: FC=±0,5).

7.3.3 Caracterización de líneas de *Arabidopsis thaliana* con acumulación diferencial de miR397 frente a infección

En Arabidopsis están descritos dos *MIR397* (*ath-MIR397a* y *ath-MIR397b*), para los que se contaba con una línea de imitación de diana como las descritas previamente. Así pues, se realizó la caracterización del fenotipo en infección a hongos de la línea MIM-miR397. Primeramente se analizó la acumulación de los miembros ath-miR397 mediante un análisis de *stemloop* qRT-PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 56A y confirman que estas líneas tienen disminuida la acumulación de ath-miR397 en comparación con las líneas control.

El fenotipo de estas líneas frente a infección por el hongo fitopatógeno necrótrofo *P. cucumerina* se evaluó tanto en ensayos *in vitro* como en tierra. En las imágenes de la Figura 56B se muestran los resultados de los ensayos de infección *in vitro*, donde no se aprecian diferencias entre el fenotipo de la línea MIM-miR397 y la portadora del vector vacío. Esta observación se corresponde con la cuantificación de las hojas lesionadas en cada planta, donde no se aprecian diferencias significativas entre las plantas MIM-miR397 y las líneas control, exhibiendo resultados similares de aproximadamente 60% de incidencia de lesiones (Figura 56C). Tampoco se observaron diferencias visibles en los ensayos de infección en plantas crecidas en tierra (Figura 56D). Los resultados obtenidos en las condiciones experimentales de este trabajo muestran que los ath-miR397 podrían no participar en las respuestas de defensa de Arabidopsis frente a infección necrótrofa por *P. cucumerina*.

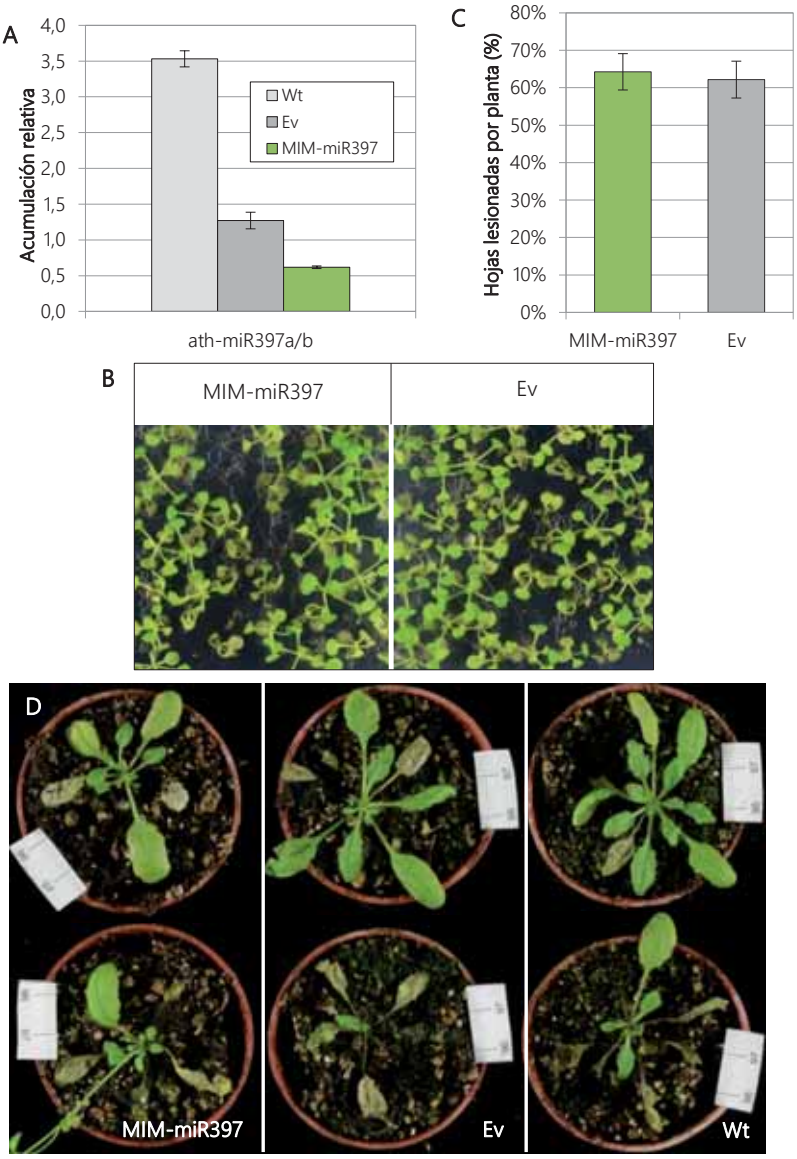

Figura 56. Caracterización de las líneas MIM-miR397 de *A. thaliana* en respuesta a infección por *P. cucumerina*. A. Niveles de acumulación del miR397 en plantas de Arabidopsis MIM-miR397, portadoras de vector vacío (Ev) y silvestres sin transformar (Wt) cuantificados por *stemloop* qRT-PCR. Las muestras corresponden a hojas de plántulas de 21 días crecidas en tierra en condiciones de invernadero. Se muestran los valores de acumulación media de ath-miR397a/b frente al gen de referencia *Tubulin* (At5g62700). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. **B.** Imágenes representativas de la infección causada por *P. cucumerina* a los 7 dpi. El ensayo se realizó con plántulas de 14 días crecidas *in vitro* en medio MS sólido inoculadas por rociado de una suspensión de esporas de *P. cucumerina* (10^5 esp/ml). **C.** Cuantificación del porcentaje de hojas lesionadas a los 7dpi según se indica en B. Se muestra el valor medio y el SEM de un ensayo con al menos 25 plántulas por línea y es representativo de dos réplicas experimentales. **D.** Imágenes representativas de ensayos de infección con plantas de 21 días crecidas en tierra e inoculadas con una suspensión de esporas de *P. cucumerina* (10^5 esp/ml). Las fotos fueron tomadas a los 11 dpi y son representativas de ensayos independientes.

7.3.4 Caracterización genotípica de líneas mutantes insercionales para *osa-MIR397a* y *OsLAC13*

En el transcurso de este trabajo de tesis se pudo contar con líneas de mutantes de arroz de la colección del TRIM (*Taiwan rice insertional mutants*), amablemente cedidas por la Dra. Y-I Hsing, cuyas inserciones de T-DNA se encontraban próximos a los locus de *OsLAC13* (línea M0053518) y de *osa-MIR397a* (línea M0109988) (Hsing *et al.*, 2007). Estas líneas mutantes permitirían el estudio funcional de estos genes, si las inserciones influencian los niveles de expresión del miRNA o de la lacasa.

En la Figura 57A, se muestra una representación del mapa genético de estos mutantes en el sitio de la inserción del T-DNA y en relación con el pre-miRNA y el gen de interés. Varias plantas de estas líneas fueron analizadas mediante análisis de PCR utilizando cebadores específicos para el T-DNA y la región del genoma donde se encuentran las inserciones, identificándose una línea homocigota para cada evento (M0053518.5 y M0109988.3). La acumulación de osa-miR397a y de su tránscrito diana *OsLAC13* se analizó mediante qRT-PCR en hojas de plantas de esas líneas homocigotas en comparación con líneas azigotas y la variedad silvestre. En la Figura 57B se muestran los resultados, donde se puede ver que la línea M0053518.5 (*osa-MIR397a*-Ac) acumula niveles tres veces más altos del miRNA que las líneas control. Esta activación de osa-miR397a se corresponde con los niveles disminuidos de los tránscritos dianas *OsLAC12/13*. La línea M0109988.3 (*OsLAC13*-Kd) a su vez, presenta niveles de acumulación de *OsLAC12/13* más bajos, que llegan sólo a la mitad de lo observado en las líneas control silvestre y del vector vacío. Estas líneas fueron utilizadas como herramientas para la caracterización funcional de *osa-MIR397* y *OsLAC13* frente a infección por *M. oryzae* y frente a sequía.

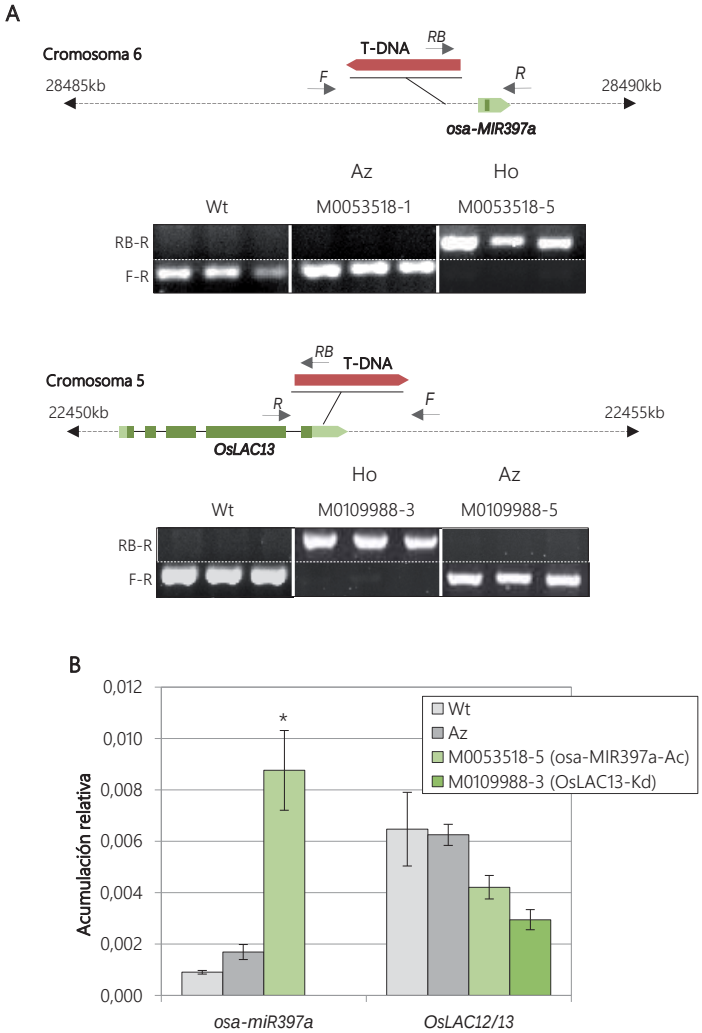

Figura 57. Análisis genotípico de las líneas de arroz mutantes insercionales de la colección TRIM para *osa-MIR397a* y *OsLAC13*. A. Representación gráfica que indica la ubicación en el genoma de la inserción del T-DNA para las líneas mutantes M0053518 y M0109988 del TRIM (*Taiwan rice insertional mutants*), con respecto a los genes adyacentes *osa-MIR397a* y *OsLAC13* (LOC_Os05g38420), respectivamente. Se muestra la caracterización genotípica por PCR de las líneas mutantes homocigotas (Ho) y azigotas (Az) para la inserción de T-DNA, así como el control de la variedad silvestre Tainung67. La posición de hibridación de los cebadores utilizados se indica con flechas. Las líneas discontinuas corresponden a la doble cadena de DNA. Las barras anchas en el gen *OsLAC13* corresponden a las regiones no traducidas-UTRs (claras) y exones (oscuras). Las líneas continuas corresponden a los intrones. Las barras anchas en *osa-MIR397a* corresponden al precursor (claras) y al miRNA maduro (oscura). Localizaciones genómicas consultadas en la base de datos del TRIM. **B.** Gráficas de los niveles de acumulación de osa-miR397a y de los tránscritos *OsLAC12 y OsLAC13* en las líneas mutantes del TRIM, cuantificados por *stemloop* qRT-PCR y qRT-PCR. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR397a, *OsLAC12* (LOC_Os05g38410) y *OsLAC13* (LOC_Os05g38420) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). La acumulación de los genes parálogos *OsLAC12* y *OsLAC13* se cuantificó indistintamente. Las barras representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. El asterisco corresponde a diferencias significativas según análisis de ANOVA (*=p<0,05). Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

7.3.5 Caracterización de las líneas de acumulación diferencial de osa-miR397 y su tránscrito diana *OsLAC13* frente a infección

Según los resultados presentados previamente, osa-miR397 podría estar implicado en las respuestas de defensa de las plantas de arroz. Se propuso entonces caracterizar las líneas de acumulación alterada de los miRNAs osa-miR397a, osa-miR397b y el mensajero del gen *OsLAC13* frente a infección por *M. oryzae*. Los ensayos de infección se realizaron con las líneas homocigotas de los mutantes TRIM *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd, y con las líneas transgénicas *osa-MIR397b*-Ox (generación T1).

Fenotípicamente, las plantas de 21 días de las líneas *osa-MIR397b*-Ox no presentan diferencias visibles en comparación con la línea silvestre en las condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo (Figura 58A). En la Figura 58B se muestran las imágenes representativas de las lesiones desarrolladas en las hojas tras la infección por *M. oryzae*. En dos ensayos independientes se observó un leve aumento de la susceptibilidad en las líneas *osa-MIR397b*-Ox comparadas con las líneas control. Luego del análisis cuantitativo del área foliar lesionada, se pudo comprobar que existen diferencias significativas en el área foliar lesionada en una de las líneas sobreexpresoras de *osa-MIR397b* (#8) llegando hasta un 40% del área foliar lesionada, con respecto a los controles que sólo tuvieron una incidencia de la enfermedad de aproximadamente el 10% (Figura 58C). Se observó además que, a pesar de no presentar diferencias significativas, las otras dos líneas *osa-MIR397b*-Ox (#1.1 y #1.2) también muestran un porcentaje superior de área lesionada comparadas con los controles. Estos resultados muestran que la sobreacumulación de osa-miR397b conlleva un incremento de la susceptibilidad de la planta de arroz frente a la enfermedad de la piriculariosis.

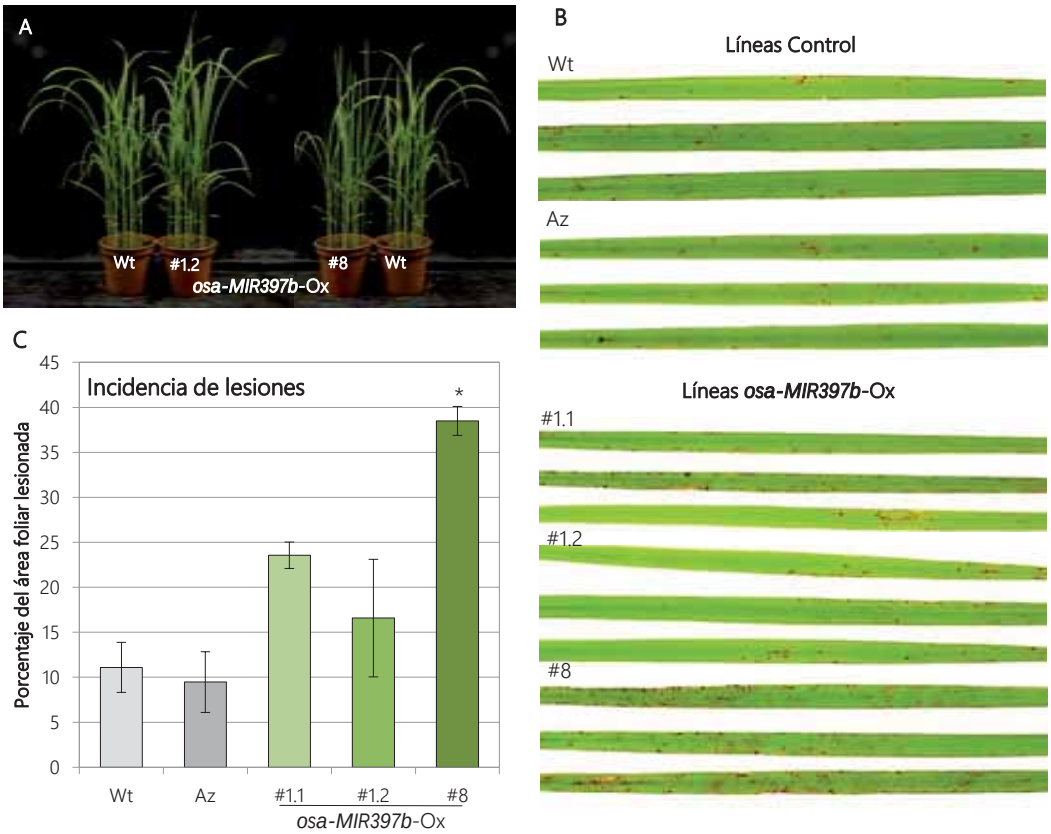

Figura 58. Fenotipo de líneas de sobreexpresión de *osa-MIR397b* en respuesta a infección por *M. oryzae*. A. Apariencia fenotípica de plantas de 21 días de las líneas de arroz sobreexpresoras de *osa-MIR390*, generación T1, comparadas con plantas de la variedad silvestre Tainung67 (Wt). **B.** Imágenes representativas de las lesiones causadas por la infección con *M. oryzae* aislado Guy11 en la penúltima hoja emergida a los 7 días post-inoculación por aspersión de una suspensión de esporas a concentración de 10^5 esp/ml. **C.** Promedio del porcentaje del área foliar lesionada debido a la infección por *M. oryzae*. Cuantificación del área de lesión realizada por análisis de imágenes con el programa informático Assess v2.0. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de al menos 6 réplicas biológicas. El asterisco corresponde a diferencias significativas según análisis de ANOVA (*=p<0,05). Los datos mostrados son de un ensayo independiente representativo de dos réplicas experimentales.

Las líneas homocigotas *osa-MIR397*-Ac y *OsLAC13*-Kd tampoco presentan diferencias fenotípicas visibles comparadas con las líneas azigotas y silvestre (Figura 59A). En la Figura 59B se puede ver una muestra representativa de 3 réplicas biológicas de las hojas de las líneas mutantes *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd infectadas por *M. oryzae*. No se observaron diferencias notorias en el fenotipo de estas líneas frente a la infección, en comparación con la variedad silvestre y la línea azigota. Así también, en el

análisis cuantitativo del área foliar afectada por la infección no se encontraron diferencias significativas en cuanto a incidencia de lesiones entre las líneas mutantes *osa-MIR397a*-Ac, que presentó un 25% de área lesionada, y *OsLAC13*-Kd, un 40%, comparadas con las líneas silvestre (35%) y azigota (30%) (Figura 59C). Estos resultados parecen indicar que podría existir una diferenciación entre ambos miembros osa-miR397 en cuanto a su funcionalidad. En este caso se ha visto que las líneas que acumulan osa-miR397b parecen ser más susceptibles a la infección por *M. oryzae*, mientras que la línea de activación de la expresión de *osa-MIR397a* no presenta un fenotipo de resistencia/susceptibilidad en las mismas condiciones. Tampoco se ha visto que las líneas de pérdida de función de *OsLAC13* tengan un fenotipo que se pueda relacionar con la respuesta de defensa de las plantas de arroz. Se podría decir entonces que el papel que podría cumplir osa-miR397b en las respuestas de defensa de la planta de arroz no viene dado por la regulación post-transcripcional de *OsLAC13*.

7.3.6 Respuesta de los *osa-MIR397* y sus dianas frente a estrés hídrico

Las lacasas son componentes importantes de la señalización regulada por el estrés oxidativo, íntimamente ligado a las rutas de señalización tanto de defensa como de sequía (Cho *et al.*, 2014; Turlapati *et al.*, 2011). En este trabajo se ha analizado la expresión de *osa-MIR397* y sus dianas *OsLAC12*, *OsLAC13* y *OsLAC26* en tejido radicular sometido a desecación. En el análisis cuantitativo de los niveles de acumulación se ha encontrado que tanto el miRNA como sus tránscritos dianas, codificantes de las lacasas mencionadas, están inducidas frente a estrés hídrico respecto al control en las raíces de las plantas de arroz (Figura 60). Esta inducción se detecta entre los 60 minutos y las 3 horas después del inicio del tratamiento, suponiendo un incremento de hasta 3 veces en los niveles de acumulación, y se observa tanto para osa-miR397 como para sus dianas *OsLAC12/13* y *OsLAC26*. Estos resultados muestran una clara activación de *osa-MIR397* en respuesta a sequía, pero que no se correlaciona con una disminución en los niveles de acumulación de los tránscritos de *OsLAC12/13* y *OsLAC26*.

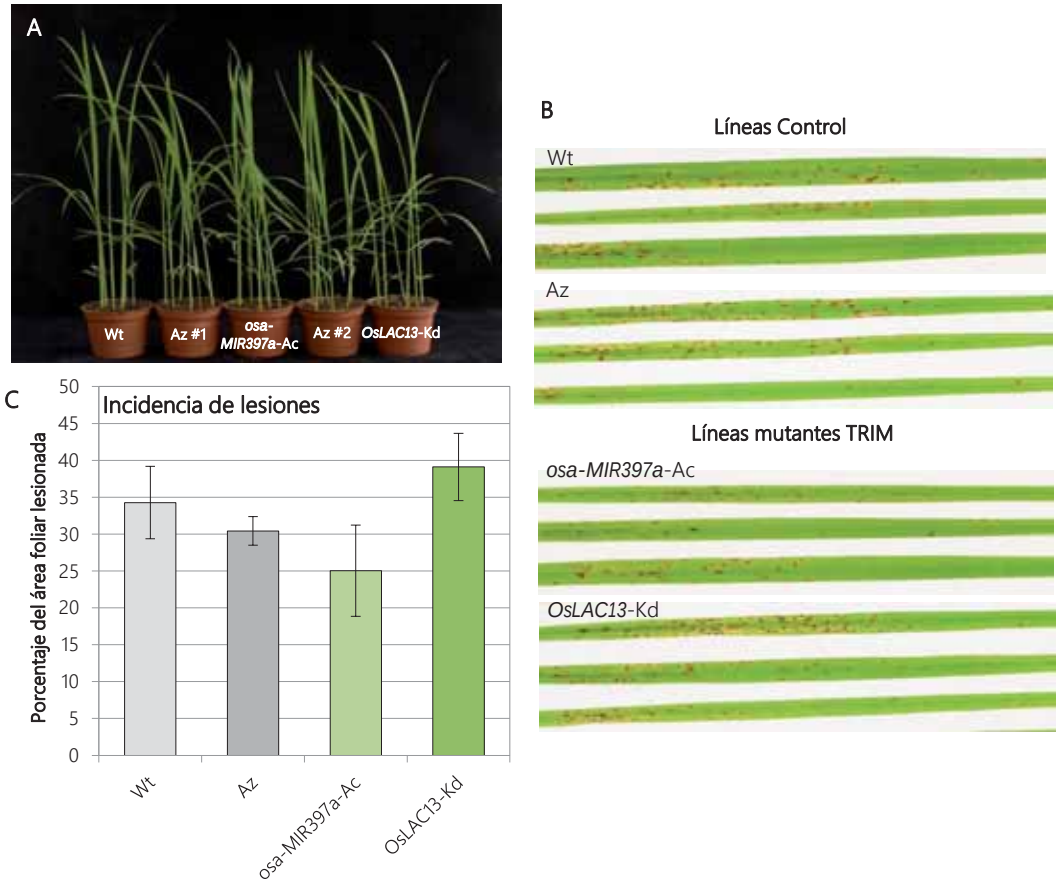

Figura 59. Fenotipo de líneas mutantes en *OsLAC13* y de activación de *osa-MIR397a* en respuesta a infección por *M. oryzae*. A. Apariencia fenotípica plantas de 21 días crecidas en tierra de las líneas *OsLAC13*-Kd y *osa-MIR397a*-Ac, de la variedad silvestre Tainung67 (Wt) y azigotas (Az). **B.** Imágenes representativas de las lesiones causadas por la infección con *M. oryzae* aislado Guy11 la penúltima hoja emergida a los 7 días post-inoculación por aspersión de una suspensión de esporas a concentración de 10^5 esp/ml. **C.** Promedio del porcentaje del área foliar lesionada debido a la infección por *M. oryzae*. Cuantificación del área de lesión realizada por análisis de imágenes con el programa informático Assess v2.0. Las barras representan el error estándar de la media de al menos 6 réplicas biológicas. Los datos mostrados son de un ensayo independiente representativo de dos réplicas experimentales.

7.3.7 Caracterización de las líneas de acumulación diferencial de osa-miR397 y su tránscrito diana *OsLAC13* frente a sequía

Los resultados mencionados previamente muestran que la expresión de *osa-MIR397* y sus dianas *OsLAC12/13* y *OsLAC26* está regulada durante las respuestas de la planta de arroz frente a estrés hídrico, por lo que se caracterizaron las líneas *osa-*

MIR397a-Ac y *OsLAC13*-Kd frente a sequía. En la Figura 61 se muestra la apariencia de las plantas sometidas a un tratamiento de sequía por falta de riego durante 5 días, presentando un claro aspecto de decaimiento, hojas secas y pálidas en todas las líneas analizadas (arriba); en cambio, luego de restaurar el riego normal durante 7 días (abajo), se aprecia la recuperación tanto de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd como del control positivo *OsCPK13*-Ox, pero no de las líneas silvestre y azigotas. Estos resultados muestran una mayor tolerancia a la sequía en las plantas de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd.

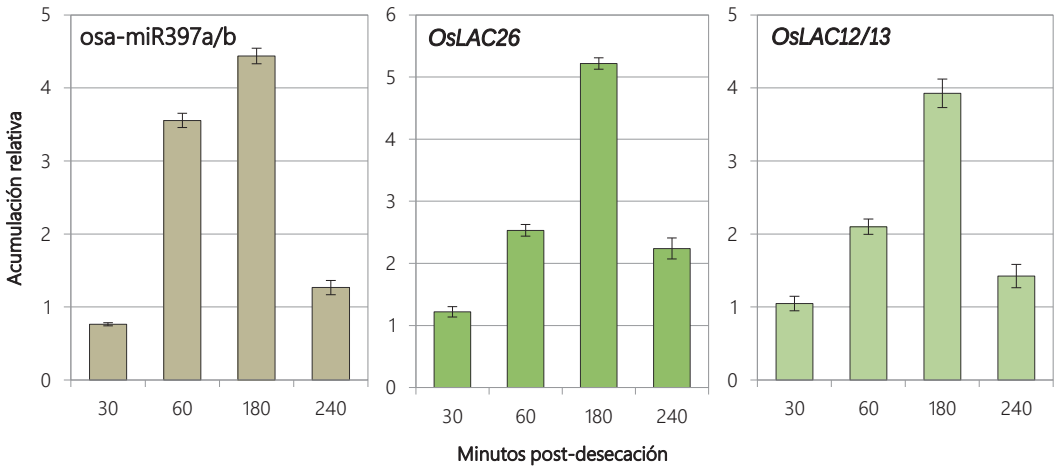

Figura 60. Acumulación de osa-miR397 y los tránscritos de sus dianas *OsLAC26* y *OsLAC12/13* en respuesta a estrés hídrico. Gráficas de los niveles de acumulación de los osa-miR397 y de los tránscritos *OsLAC12*, *OsLAC13 y OsLAC26*, cuantificados por *stemloop* qRT-PCR y qRT-PCR. Plantas de arroz de la variedad silvestre Nipponbare desecadas bajo campana de flujo laminar. Las muestras corresponden a raíces tratadas por desecación o no (control) tomadas a los tiempos indicados luego del inicio del tratamiento. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR397a y osa-miR397b, *OsLAC26* (LOC_Os01g62490), *OsLAC12* (LOC_Os05g38410) y *OsLAC13* (LOC_Os05g38420) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). La acumulación de osa-miR397a y osa-miR397b se cuantificó indistintamente, así como las lacasas parálogas *OsLAC12* y *OsLAC13*. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. Los valores de la acumulación están referenciados al valor obtenido en la muestra control de cada tiempo (valor de referencia del control=1).

Se cuantificaron los resultados de dos réplicas biológicas y se pudo constatar que las plantas de la línea *OsLAC13*-Kd tienen una supervivencia del 100% a sequía, mientras que las plantas de la línea de activación de *osa-MIR397a* llegan al 50% (Figura

62A), en comparación con la supervivencia de la línea silvestre (30%) y las plantas azigotas (35%). Así también se cuantificó la tolerancia al estrés que tenían estas líneas, de acuerdo a una escala fenotípica que se ha establecido en este trabajo, viéndose que las plantas *OsLAC13*-Kd son mucho más tolerantes, por presentar menos síntomas de quemaduras en las hojas, mientras que las plantas *osa-MIR397a*-Ac tienen una leve mejor tolerancia que las líneas control silvestre y azigota (Figura 62B).

Figura 61. Fenotipo de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd en respuesta a sequía. A. Diagrama del diseño experimental para la caracterización de la tolerancia a sequía. Las plantas se crecieron en condiciones normales durante 21 días (D0), momento en el que dejaron de regarse durante 5 días (D5), para después volver a riego normal durante 7 días (D12). **B.** Imágenes representativas de plantas de líneas *osa-MIR397a*-Ac, *OsLAC13*-Kd y los controles silvestre Tainung67 (Wt), azigota (Az) y la línea de arroz de sobreexpresión del gen *OsCPK13* tolerante a sequía (T) a los 5 días sin riego (D5, paneles superiores) y al final del periodo de recuperación (D12, paneles inferiores). Las imágenes mostradas son representativas de dos ensayos independientes.

Uno de los factores que influye en la tolerancia al estrés hídrico es la baja pérdida de agua en condiciones de sequía. Fue calculada la curva de pérdida de agua

en estas líneas por medio de la cuantificación de la pérdida de peso por desecación con el paso del tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre las líneas analizadas (Figura 62C). Según estos resultados, no existe correlación entre la pérdida de agua de las líneas mutantes y su tolerancia a sequía.

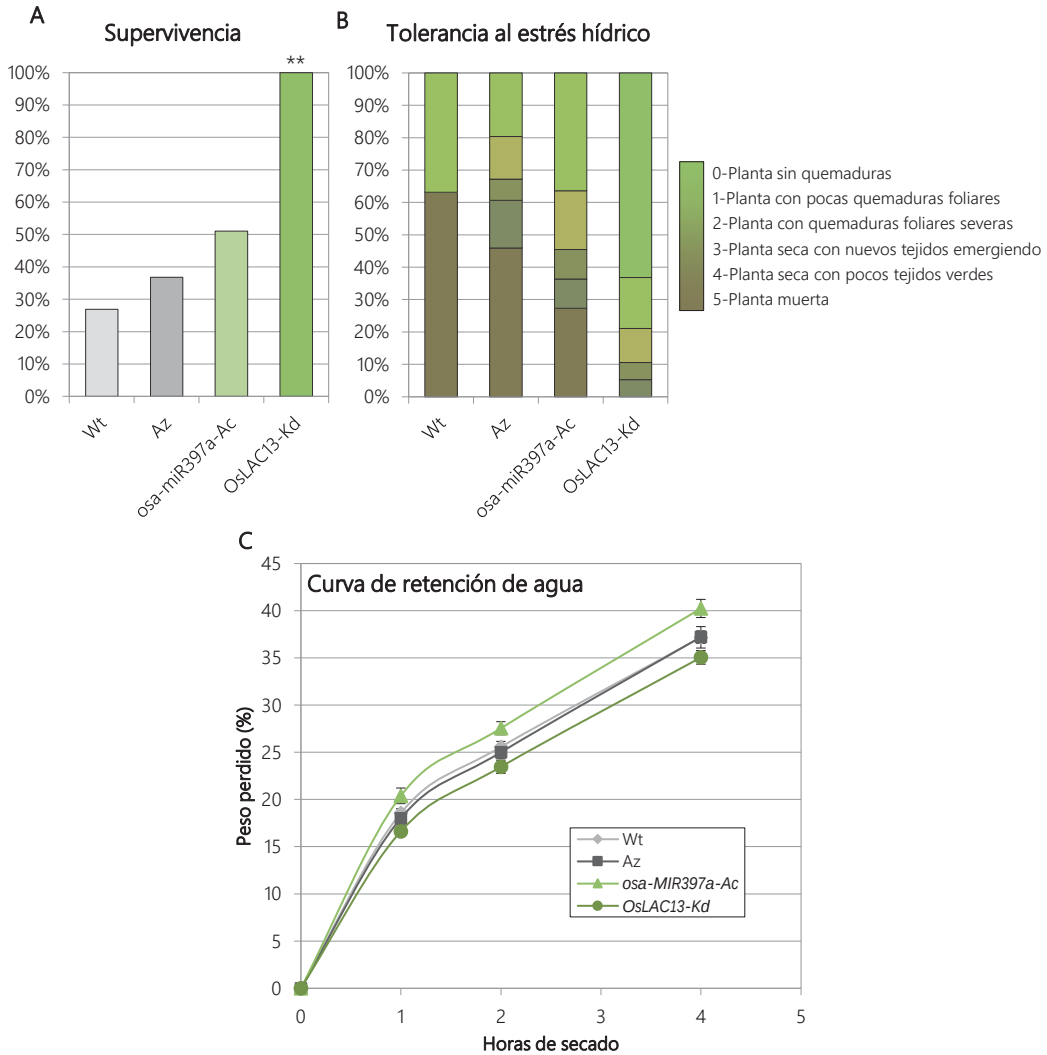

Figura 62. Tolerancia a sequía de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd. A. Gráfica del porcentaje de supervivencia al tratamiento de sequía indicado en la Figura 61, de plantas de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd, azigotas (Az) y de la variedad silvestre Tainung67 (Wt). **B.** Porcentaje de plantas mostrando los síntomas de estrés por sequía en la escala de 0 a 5; donde 0=sin síntomas, y 5= planta muerta. **C.** Cuantificación del porcentaje de la pérdida de peso en el tiempo con respecto al peso inicial en plantas de 7 días crecidas *in vitro* y secadas al aire. Las barras corresponden al SEM. En todos los ensayos se analizaron al menos 10 muestras biológicas por cada línea. Los asteriscos corresponden a diferencias significativas según análisis de ANOVA (**=p<0,01). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de dos réplicas experimentales.

En las condiciones de este trabajo, las plantas de la línea mutante *OsLAC13*-Kd muestran significativamente mayor resistencia a estrés hídrico, al igual que las plantas de la línea *osa-MIR397a*-Ac, a pesar de que el incremento en esta última no es estadísticamente significativo, sugiriendo la participación funcional de osa-miR397a y OsLAC13 en la adaptación de la planta de arroz frente a la sequía.

7.3.8 Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno en las líneas de acumulación diferencial de osa-miR397 y *OsLAC13* en respuesta a estrés hídrico

Uno de los efectos asociados al déficit hídrico en la célula es la producción de ROS que pueden actuar como moléculas señalizadoras, pero que a niveles elevados pueden causar daño celular (Cruz de Carvalho, 2008). Además, en estudios aún no publicados realizados en el grupo de la Dra. Y-I Hsing (Academia Sinica, Taiwán) han identificado que osa-miR397 participa en la respuesta a estrés oxidativo en raíces de arroz y que en esas condiciones tiene como diana a *OsLAC26* (Wu & Hsing, comunicación personal). Estos datos sugieren que las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd, que muestran niveles de acumulación alterados para algunos tránscritos lacasas, podrían presentar alteraciones en la producción y acumulación de ROS, pudiendo correlacionarse con la tolerancia a sequía mostrada por estas plantas de arroz. Por ello se procedió a analizar el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en diferentes tejidos de plántulas de esas líneas y en condiciones de sequía.

La Figura 63 recoge los resultados obtenidos, donde se puede observar que todas las líneas analizadas acumulan niveles similares de peróxido de hidrógeno en condiciones controles, tanto en raíces como en parte aérea. En respuesta a la desecación se observa un claro incremento en el contenido de H_2O_2, alcanzando niveles similares en las hojas de todas las líneas analizadas, pero claramente superiores en las raíces de las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd. Las raíces de la línea *OsLAC13*-Kd alcanzan valores incluso superiores que las de la línea *osa-MIR397a*-Ac, pudiendo

determinar las diferencias fenotípicas observadas entre ambas líneas mutantes. Estos datos indican que una menor acumulación de los mensajeros *OsLAC12/13* resulta en una mayor capacidad para producir ROS en respuesta a desecación. Las proteínas lacasas interfieren en el proceso de formación de ROS (Wang *et al.*, 2013b). Interesantemente, esta mayor producción de ROS se correlaciona con una mayor tolerancia a sequía mostrada por las líneas mutantes *OsLAC13*-Kd y *osa-MIR397a*-Ac.

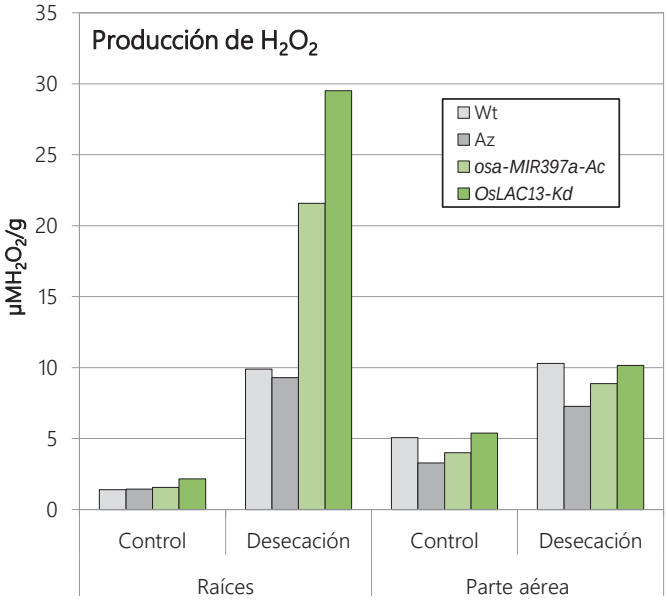

Figura 63. Producción de peróxido de hidrógeno en las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd en condiciones de estrés hídrico. Cuantificación del contenido de H_2O_2 en raíces y hojas de plantas *osa-MIR397a*-Ac, *OsLAC13*-Kd, azigotas (Az) y silvestres (Wt) crecidas *in vitro* durante 7 días y sometidas a un tratamiento de desecación al aire por 3 horas o mantenidas en condiciones control. Los datos corresponden a un único experimento y a grupos de al menos 10 plantas por cada línea.

7.4 Caracterización de *osa-MIR1319a* en las respuestas de defensa y sequía

En los resultados presentados previamente en este trabajo de tesis, se ha visto que osa-miR1319a presenta una disminución de su acumulación frente a tratamientos por elicitores y en infección por *M. oryzae*. Además, se ha visto que la región promotora de su precursor presenta elementos regulatorios relacionados con estrés hídrico, por lo que se propuso realizar la caracterización de este miRNA y sus dianas tanto en defensa como en sequía.

7.4.1 Validación de dianas de *osa-MIR1319a*

El tránscrito del gen *OsLTPL6* (LOC_Os11g02379) ha sido predicho como diana para osa-miR1319a y además se ha encontrado que, efectivamente, el mismo sufre una regulación post-transcripcional degradándose por este miRNA según el análisis de degradoma. En tres líneas *osa-MIR1319a*-Ox se ha analizado la acumulación de *OsLTPL6* y se ha verificado que las mismas presentan muy baja acumulación transcripcional, con una disminución de más del 80%, comparadas con la línea del vector vacío (Figura 64). Estos resultados sugieren que osa-miR1319a regula post-transcripcionalmente la expresión del gen *OsLTPL6*.

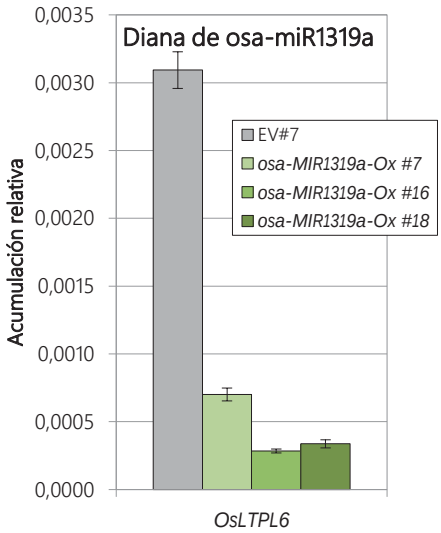

Figura 64. Acumulación del tránscrito *OsLTPL6* en las líneas transgénicas de sobreexpresión de *osa-MIR1319a*. Niveles de acumulación promedio del tránscrito *OsLTPL6* (LOC_Os11g02379), determinados mediante qRT-PCR utilizando como referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770), en hojas jóvenes de tres líneas transgénicas independientes *osa-MIR1319a*-Ox (generación T0) en comparación con una línea transformada con el vector vacío (Ev). Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

7.4.2 Respuesta de *osa-MIR1319a* y *OsLTPL6* frente a infección por *M. oryzae*

Anteriormente se ha presentado el análisis de la respuesta de *osa-MIR1319a* frente a infección por *M. oryzae* y se propuso analizar también la expresión de su diana *OsLTPL6* en las mismas condiciones mediante qRT-PCR. Los resultados muestran cambios en los niveles de acumulación del miRNA y del tránscrito diana (Figura 65), y se puede ver que existe una disminución de osa-miR1319a, especialmente marcada a las 6 horas de la inoculación (0,4 relativo al control no inoculado) y después de 48 horas (0,6).

Su diana *OsLTPL6* presenta un aumento gradual en su expresión conforme avanza la infección por el hongo desde las 6 hasta las 24 horas (entre 1,2 y 1,3 veces más respecto al control) llegando a los valores máximos de acumulación a las 48 horas de iniciada la infección (1,7 veces el control). Se puede establecer una correlación directa entre la disminución de osa-miR1319a y el aumento de la expresión de su diana en respuesta a infección. La inducción de la acumulación de *OsLTPL6*, sugiere que cumple un papel regulador positivo en las respuestas de defensa de la planta de arroz frente a *M. oryzae* y está regulado negativamente por osa-miR1319a.

7.4.3 Caracterización genotípica de líneas mutantes insercionales para *osa-MIR1319a*

Como herramientas para el estudio funcional de osa-MIR1319a se han identificado dos líneas mutantes del TRIM cuyas inserciones de T-DNA se encontraban próximas a la ubicación genómica del gen *MIR* (líneas M0058436 y M0058445), que podrían tener efectos en la acumulación del miRNA en estudio. La Figura 66A representa el mapa genómico de la inserción y las secuencias adyacentes. Se analizaron por PCR varias plantas de las líneas mutantes, utilizando cebadores específicos para el T-DNA y la zona genómica donde se encuentra insertado. Así, se identificó una línea homocigota para uno de los eventos de transformación (M0058436.1). Se analizaron los niveles de acumulación del osa-miR1319a en esta línea mediante *stemloop* qRT-PCR y como se muestra en la Figura 66B, la línea M0058436.1 (*osa-MIR1319a*-Kd) presenta entre el 20 y el 40% de disminución en la acumulación de este miRNA, comparadas con líneas azigotas y la variedad silvestre. Sin embargo, la acumulación de su tránscrito diana *OsLTPL6* sólo presenta un ligero aumento en los niveles de acumulación, principalmente en comparación con la línea azigota (0,008 vs. 0,006). Así, el mutante *osa-MIR1319a*-Kd presenta una leve disminución de la expresión de *osa-MIR1319a*, lo que conlleva un ligero aumento en los niveles de acumulación del tránscrito diana *OsLPT6*. Esta línea se

utilizó para caracterizar el papel de este miRNA y su diana en la defensa de la planta de arroz frente a *M. oryzae* y frente a sequía.

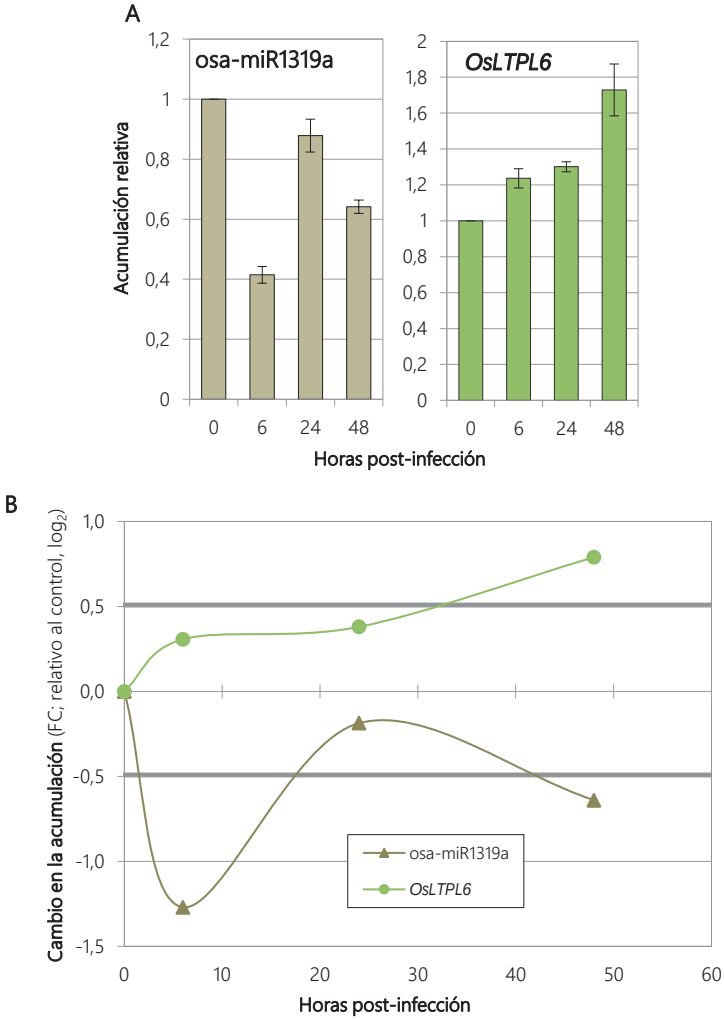

Figura 65. Acumulación de osa-miR1319a y de tránscritos de su diana *OsLTPL6* en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de arroz. A. Gráficas de los niveles de acumulación de osa-miR1319a y del tránscrito ***OsLTPL6***, cuantificados por ***stemloop*** qRT-PCR. Plantas de arroz inoculadas por aspersión de una suspensión de esporas de ***M. oryzae*** a 10^5 esp/ml o con agua estéril (control). Las muestras fueron tomadas a los tiempos indicados luego de la inoculación. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR1319a y ***OsLTPL6*** (LOC_Os11g02379) frente al gen de referencia ***OsUbi1*** (LOC_Os06g46770). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales. Los valores de la acumulación están referenciados al valor obtenido en la muestra control de cada tiempo (valor de referencia del control=1). **B.** Gráfica de la dinámica temporal de acumulación de osa-miR1319a y su diana ***OsLTPL6*** en respuesta a infección por ***M. oryzae***. El eje de las ordenadas se representa el cambio logarítmico en la acumulación (FC) en condiciones de infección, relativo a la acumulación en el control. En el eje de las abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la inoculación. Las líneas gruesas indican el umbral correspondiente a un cambio sustancial en la acumulación (criterio: FC=±0,5).

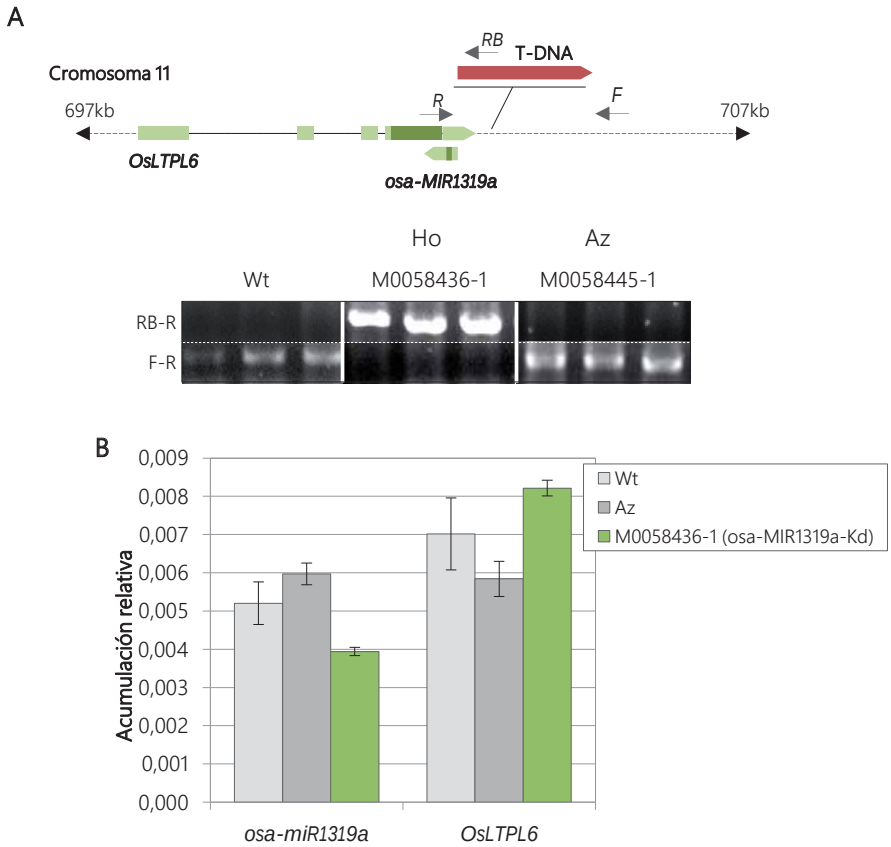

Figura 66. Análisis genotípico de las líneas de arroz mutantes insercionales de la colección TRIM para *osa-MIR1319a*. A. Representación gráfica que indica la ubicación en el genoma de la inserción del T-DNA para las líneas mutantes M0058436 y M0058445 con respecto a los genes adyacentes ***osa-MIR1319a*** y ***OsLTPL6*** (LOC_Os11g02379). Las inserciones de T-DNA en ambos mutantes se encuentran casi en la misma posición en el genoma. Se muestra la caracterización genotípica por PCR de las líneas mutantes homocigotas (Ho) y azigotas (Az) para la inserción de T-DNA, así como el control de la variedad silvestre Tainung67. La posición de hibridación de los cebadores utilizados se indica con flechas. Las líneas discontinuas corresponden a la doble cadena de DNA. Las barras anchas en el gen ***OsLTPL6*** corresponden a las regiones no traducidas-UTRs (claras) y exones (oscuras). Las líneas continuas corresponden a los intrones. Las barras anchas en ***osa-MIR1319a*** corresponden al precursor (claras) y al miRNA maduro (oscura). Localizaciones genómicas consultadas en la base de datos del TRIM. **B.** Gráficas de los niveles de acumulación de osa-miR1319a y del gen ***OsLTPL6*** en las líneas mutantes del TRIM, cuantificados por ***stemloop*** qRT-PCR y qRT-PCR. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR1319a y ***OsLTPL6*** (LOC_Os11g02379) frente al gen de referencia ***OsUbi1*** (LOC_Os06g46770). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

7.4.4 Caracterización de la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a frente a infección

Se propuso analizar el fenotipo de las líneas *osa-MIR1319a*-Ox frente a infección por *M. oryzae*, pero para el tiempo de finalización de esta tesis aún no se contaban con semillas suficientes para realizar análisis con las mismas. Se ha realizado entonces la caracterización de la línea *osa-MIR1319a*-Kd en respuesta a infección por *M. oryzae*. Crecidas en las mismas condiciones, las plantas de 21 días de la línea *osa-MIR1319a*-Kd no presentan diferencias fenotípicas visibles comparadas con las líneas azigotas y silvestre (Figura 67A). Las mismas se inocularon con esporas de *M. oryzae* aislado Guy11 que expresa constitutivamente la proteína fluorescente GFP, y se siguió visualmente el progreso de la enfermedad durante 7 días. Las plantas de las líneas mutantes desarrollaron menos lesiones y más pequeñas que las plantas controles azigotas y silvestres (Figura 67B). La cuantificación del área de lesión mediante análisis de imágenes que se presenta en la Figura 67C, mostró una diferencia significativamente menor en las hojas de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd (10-15% de área foliar lesionada) en comparación con los controles (30-35%).

La visualización bajo fluorescencia mostró que la mayoría de lesiones observadas en la variedad silvestre y en la línea azigota tenían la forma típica romboidal y eran fluorescentes, indicador del crecimiento del hongo (Figura 67D, panel izquierdo y central). Sin embargo, en el panel derecho de la Figura 67D se puede ver que en las hojas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd esas lesiones típicas no ocurrían con frecuencia, observándose algunas pequeñas lesiones fluorescentes (a) y otras un poco mayores no fluorescentes (b).

Estos resultados muestran que las plantas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd son más resistentes a la colonización del tejido foliar por *M. oryzae*, y sugieren que osa-miR1319a y su diana *OsLTPL6* probablemente están funcionalmente implicados en las respuestas de defensa de la planta de arroz frente a *M. oryzae*.

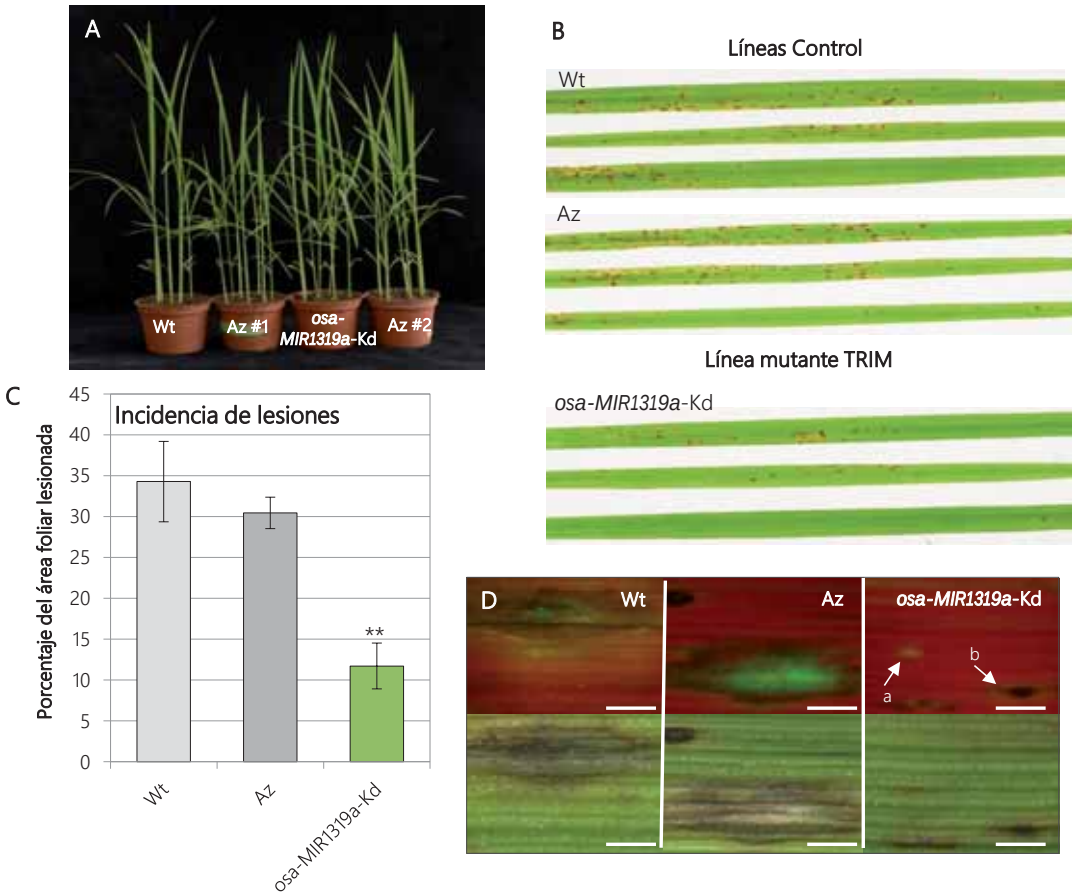

Figura 67. Fenotipo de líneas mutantes *osa-MIR1319a*-Kd en respuesta a infección por *M. oryzae*. A. Apariencia fenotípica de plantas de 21 días de las líneas de arroz mutantes en *osa-MIR1319a*, comparadas con plantas de la variedad silvestre Tainung67 (Wt) y con plantas azigotas (Az). **B.** Imágenes representativas de las lesiones desarrolladas en hojas infectadas con *M. oryzae* aislado Guy11 transformado con GFP en las penúltimas hojas emergidas a los 7 días post-inoculación por aspersión de una suspensión de esporas a concentración de 10^5 esp/ml. **C.** Promedio del porcentaje del área foliar lesionada debido a la infección por *M. oryzae*. Cuantificación del área de lesión realizada por análisis de imágenes con el programa informático Assess v2.0. Las barras de error representan el SEM de al menos 6 réplicas biológicas. Los asteriscos corresponden a diferencias significativas según análisis de ANOVA (*=p<0,05). Los datos mostrados son representativos de dos ensayos independientes. **D.** Imágenes tomadas con lupa esteroscópica de fluorescencia del detalle de las lesiones representativas. Los paneles superiores corresponden al canal de la GFP (verde) que muestra el crecimiento del hongo fluorescente y la autofluorescencia del tejido foliar (rojo). Los paneles inferiores corresponden a las imágenes de campo claro. Las flechas incidan sitios donde hay crecimiento del hongo (a) y lesiones donde se ha detenido ese crecimiento (b) en hojas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd. Las barras de escala corresponden a 500 µm.

7.4.5 Análisis de la expresión de genes relacionados con defensa en la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a

Se analizó la expresión de genes de defensa en la línea resistente *osa-MIR1319a*-Kd. Los genes marcadores de defensa analizados fueron el gen *OsPBZ1* (*Probenazole inducible 1*); el marcador de patogénesis *OsPR10* (*Pathogenesis-related protein 10*); la fenil-alanin-liasa *OsPAL1*, implicada en la ruta de señalización del SA; y la peroxidasa *OsPOX22.3*, relacionada con el estrés oxidativo. En la Figura 68 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que la expresión de todos los genes analizados está inducida en las plantas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd en comparación con plantas de la línea silvestre. Ya en condiciones basales sin infectar se observa que la línea mutante tiene una expresión incrementada de *OsPOX22.3*, *OsPBZ1* y *OsPR10*, estos dos últimos llegan a niveles cercanos a los observados en la silvestre en condiciones de infección, mientras que la expresión de *OsPAL1* es incluso mayor que en la variedad silvestre infectada. Las diferencias en la expresión de estos genes entre las plantas *osa-MIR1319a*-Kd y la variedad silvestre son mayores en condiciones de infección, especialmente *OsPBZ1* y *OsPR10*, que alcanzan casi el doble de acumulación. Estos datos indican que las plantas mutantes *osa-MIR1319a*-Kd tienen activada de manera constitutiva la respuesta de defensa, y que además se ve potenciada en respuesta a infección por *M. oryzae*, pudiendo ser determinante en el fenotipo de resistencia observado en estas plantas.

7.4.6 Respuesta de *osa-MIR1319a* y *OsLTPL6* frente a estrés hídrico

Como se ha visto en el análisis de promotores *in silico*, la secuencia promotora de *osa-MIR1319a* posee elementos de regulación por estrés hídrico, por lo que se analizó la acumulación de osa-miR1319a y de su tránscrito diana *OsLTPL6* en respuesta a desecación. En la Figura 69 se muestra que tanto el miRNA como el tránscrito de su diana se inducen en condiciones de desecación. La acumulación de osa-miR1319a se

detecta ya a los 30 minutos de iniciarse la desecación, alcanzando niveles de casi el doble de acumulación frente a las condiciones basales a la hora de tratamiento. La respuesta de *OsLTPL6* es aún más intensa, observándose que a los 30 minutos aumenta su acumulación al triple y hasta se cuadruplica después de una hora del tratamiento. Los resultados muestran que tanto osa-miR1319a como su diana *OsLTPL6* se acumulan en respuesta a estrés hídrico.

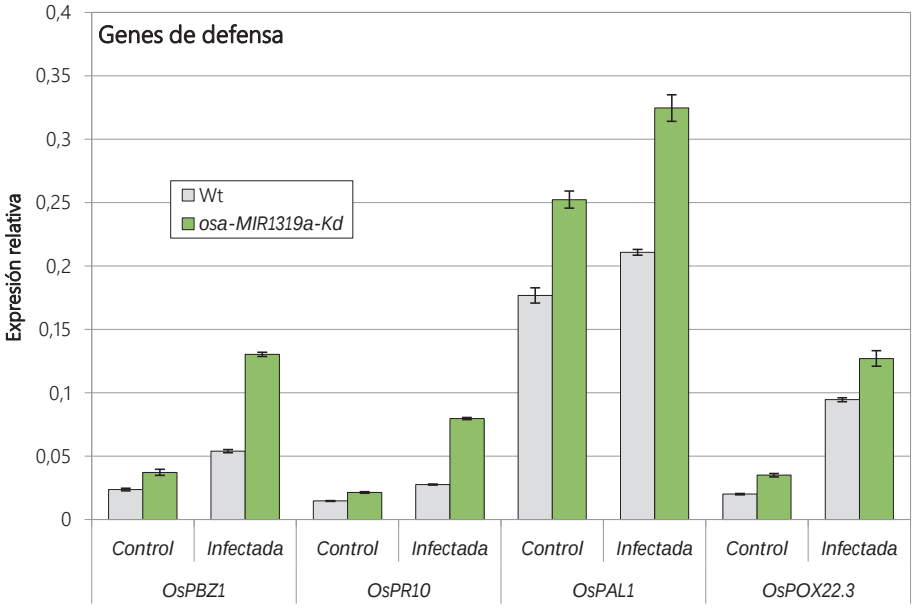

Figura 68. Expresión de genes de defensa en respuesta a infección por *M. oryzae* en hojas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd. Gráficas de los niveles de expresión de los genes *OsPBZ1*, *OsPR10*, *OsPAL1 y OsPOX22.3*, cuantificados por qRT-PCR. Plantas de arroz variedad Tainung67 (Wt) y de la línea *osa-MIR1319a*-Kd inoculadas por aspersión de una suspensión de esporas de *M. oryzae* a 10^5 esp/ml (Infectada) o con agua estéril (control). Las muestras de las hojas fueron tomadas 16 horas después de la inoculación. Se muestran los valores de expresión media de *OsPBZ1* (LOC_Os12g36880), *OsPR10* (LOC_Os03g18850), *OsPAL1* (LOC_Os02g41650) *y OsPOX22.3* (LOC_Os07g01370) frente al gen de referencia *OsUbi1* (LOC_Os06g46770). Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas. Los datos son representativos de 2 réplicas experimentales.

7.4.7 Caracterización de las líneas de acumulación diferencial de osa-miR1319a frente a sequía

Se ha caracterizado el fenotipo de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd frente a sequía. Plantas de la línea silvestre, azigota y de la línea *osa-MIR1319a*-Kd se sometieron a un

régimen de sequía durante 5 días después de haber sido crecidas con riego normal en tierra por 21 días, y a continuación se reanudó el riego para su recuperación por 7 días. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 70, donde se puede observar que las plantas de la línea *osa-MIR1319a*-Kd sobreviven y presentan tejido verde comparable a la línea tolerante a sequía *OsCPK13*-Ox luego del tratamiento de recuperación, a diferencia de la variedad silvestre y la línea azigota. La supervivencia de plantas *osa-MIR1319a*-Kd en estas condiciones es de hasta un 70%, mientras que los controles no llegan al 40% (Figura 71A). Estas plantas tienen además una mejor tolerancia a sequía respecto a las líneas control (Wt y Az), ya que presentan un menor daño en los tejidos de la parte aérea (Figura 71B), pero no tienen diferencias significativas en la pérdida de agua en condiciones de desecación, en comparación con las líneas azigotas y silvestre (Figura 71C). Los resultados muestran que la línea *osa-MIR1319a*-Kd es más tolerante a condiciones de estrés hídrico, y tiene un alto porcentaje de supervivencia luego del periodo de sequía, sugiriendo que osa-miR1319a y OsLTPL6 tienen un papel en la adaptación de la planta de arroz frente a este estrés.

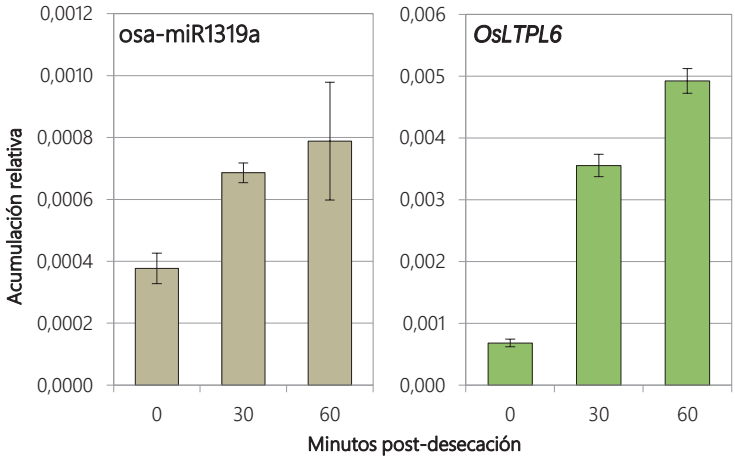

Figura 69. Acumulación de osa-miR1319a y del tránscrito diana *OsLTPL6* en respuesta a estrés hídrico. Se muestran los niveles de acumulación promedio del osa-miR1319a y del tránscrito *OsLTP6* (LOC_Os11g02379), cuantificados por *stemloop* qRT-PCR, usando *OsUbi1* como gen de referencia. Plantas de arroz (cv. Nipponbare) de 7 días crecidas *in vitro* fueron desecadas bajo campana de flujo laminar a los tiempos indicados luego del inicio del tratamiento. Se muestran los valores de acumulación media de osa-miR1319a y *OsLTPL6*. Las barras de error corresponden la desviación estándar (SD) de tres réplicas técnicas de un grupo de 10 plantas. Los datos corresponden a un único experimento.

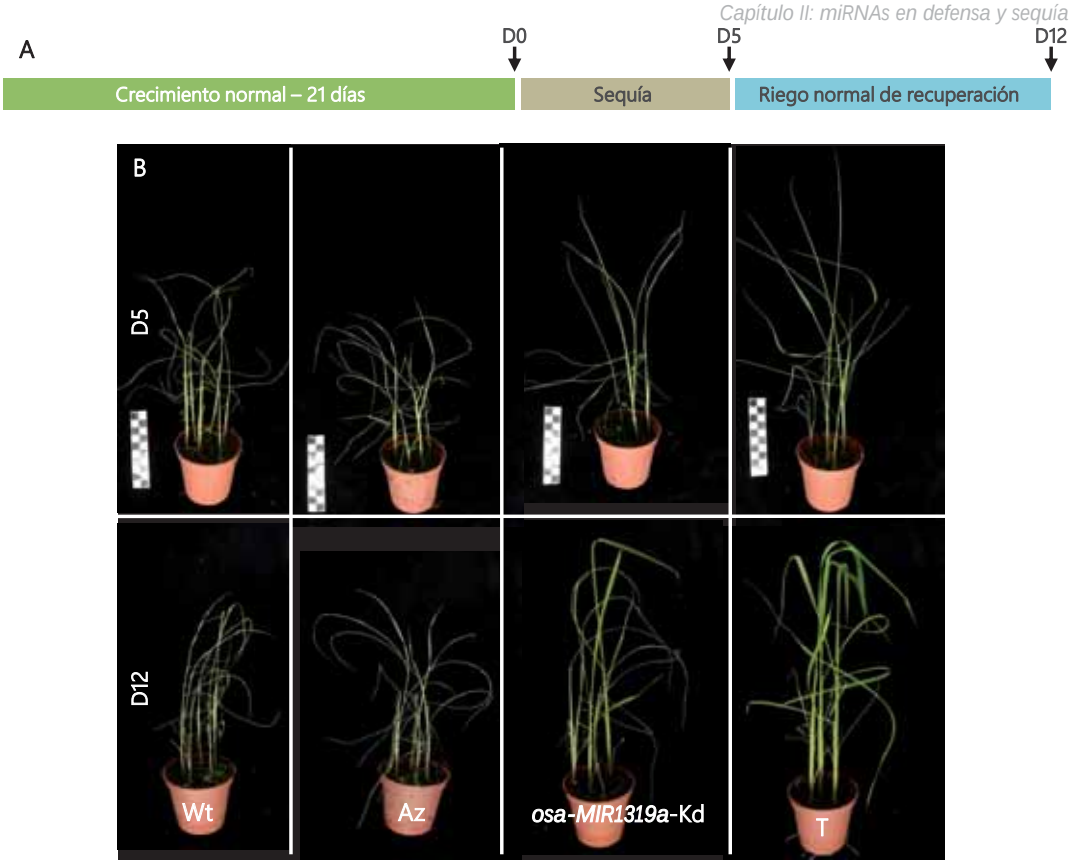

Figura 70. Fenotipo de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd en respuesta a sequía. A. Diagrama del diseño experimental para la caracterización de la tolerancia a sequía. Las plantas se crecieron en condiciones normales durante 21 días (D0), momento en el que dejaron de regarse durante 5 días (D5), para después volver a riego normal durante 7 días (D12). **B.** Imágenes representativas de plantas de líneas *osa-MIR1319a*-Kd y los controles silvestre Tainung67 (Wt), azigota (Az) y la línea de arroz de sobreexpresión del gen *OsCPK13* tolerante a sequía (T) sometidas a un tratamiento de sequía durante 5 días por falta de riego (D5, paneles superiores) y uno de recuperación con riego normal durante 7 días (D12, paneles inferiores). Las imágenes mostradas son representativas de dos ensayos independientes.

7.4.8 Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno en la línea de acumulación diferencial de osa-miR1319a en respuesta a estrés hídrico

Puesto que se ha visto que la línea *osa-MIR1319a*-Kd tiene alterados los niveles de expresión de la peroxidasa *OsPOX22.3*, se propuso analizar el contenido de peróxido de hidrógeno en estas plantas en condiciones de sequía. Se cuantificó el contenido de H_2O_2 en plantas de 7 días de la línea *osa-MIR1319a*-Kd y líneas controles sometidos a desecación. Los resultados se muestran en la Figura 72, y se puede ver que el contenido

de H_2O_2 aumenta tanto en la parte aérea como en raíces cuando la planta se somete a desecación. No se observan diferencias notorias en la producción de esta molécula ROS en la línea *osa-MIR1319a*-Kd en condiciones control ni en estrés hídrico en la parte aérea, en comparación con las líneas controles azigotas y variedad silvestre. Sin embargo, las raíces de la línea *osa-MIR1319a*-Kd producen sólo la mitad de contenido de H_2O_2 en condiciones de sequía con respecto a las líneas controles, no observándose diferencias en condiciones sin desecar. Estudios adicionales son necesarios para entender los mecanismos moleculares específicos que podrían estar implicados en otorgar el fenotipo de tolerancia a sequía a la línea *osa-MIR1319a*-Kd.

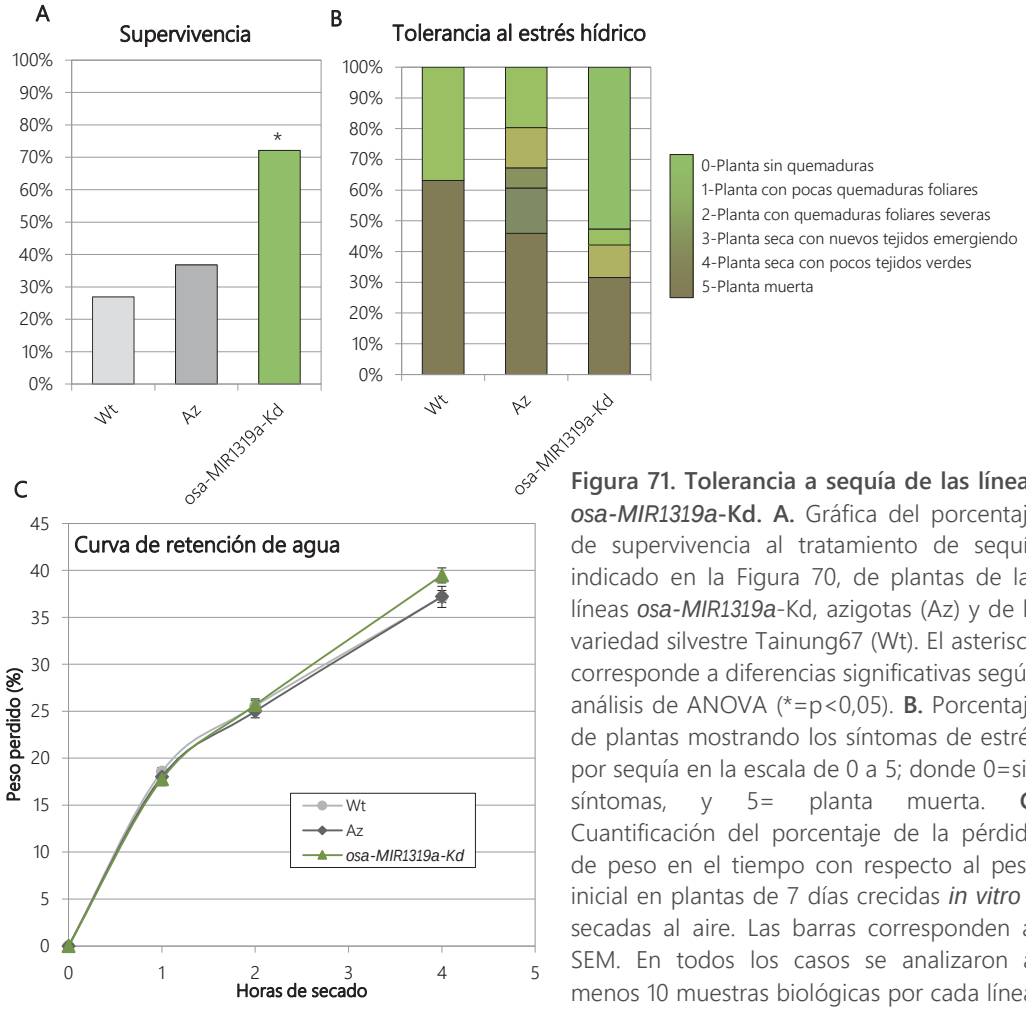

Figura 71. Tolerancia a sequía de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd. A. Gráfica del porcentaje de supervivencia al tratamiento de sequía indicado en la Figura 70, de plantas de las líneas *osa-MIR1319a*-Kd, azigotas (Az) y de la variedad silvestre Tainung67 (Wt). El asterisco corresponde a diferencias significativas según análisis de ANOVA (*=p<0,05). **B.** Porcentaje de plantas mostrando los síntomas de estrés por sequía en la escala de 0 a 5; donde 0=sin síntomas, y 5= planta muerta. **C.** Cuantificación del porcentaje de la pérdida de peso en el tiempo con respecto al peso inicial en plantas de 7 días crecidas *in vitro* y secadas al aire. Las barras corresponden al SEM. En todos los casos se analizaron al menos 10 muestras biológicas por cada línea. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de dos réplicas experimentales.

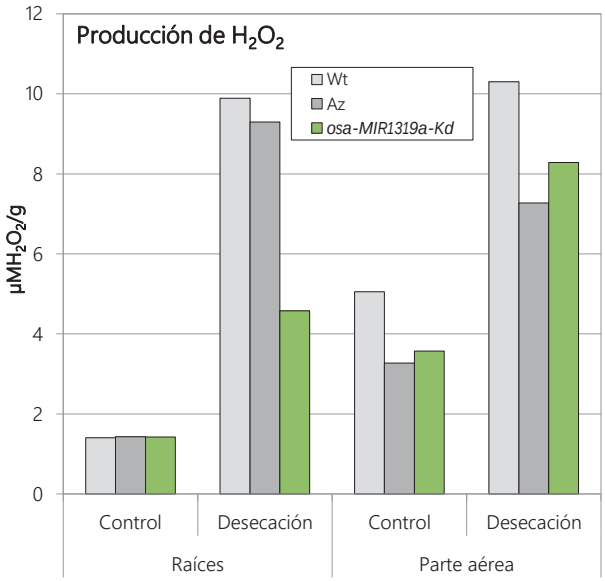

Figura 72. Producción de peróxido de hidrógeno en la línea *osa-MIR1319a*-Kd en condiciones de estrés hídrico. Cuantificación del contenido de H_2O_2 en raíces y hojas de plantas *osa-MIR1319a*-Kd, azigotas (Az) y silvestres (Wt) crecidas *in vitro* durante 7 días y sometidas a un tratamiento de desecación al aire por 3 horas o mantenidas en condiciones control. Los datos corresponden a un único experimento y a grupos de al menos 10 plantas por cada línea.

Discusión

Los miRNAs cumplen funciones muy importantes en las interacciones planta-patógeno y la identificación de aquellos diferencialmente expresados tras el reconocimiento del patógeno es el primer paso para caracterizarlos en sus funciones. En el segundo capítulo de este trabajo se han seleccionado 10 miRNAs de arroz potencialmente implicados en la regulación negativa de la respuesta basal (PTI) y se han caracterizado funcionalmente algunos de esos miRNAs en las respuestas de defensa frente a *M. oryzae* y frente a sequía. En la búsqueda de proteínas que puedan ser reguladoras positivas de las respuestas de defensa, se ha establecido una vía de detección inversa, mediante la caracterización de miRNAs regulados negativamente frente a elicitores fúngicos y la identificación de sus dianas. Se ha descrito previamente que existe una mayor cantidad de miRNAs reguladores negativos de la respuesta de defensa en arroz que aquellos que la regulan positivamente (Li *et al.*, 2013a), por lo que se podría suponer que los miRNAs reguladores negativos tienen un papel relevante en el proceso defensivo. Entre estos miRNAs también se han buscado dianas que pudieran estar implicados en las respuestas a estrés abiótico, principalmente hídrico, para intentar establecer relaciones entre las vías de respuestas a los estreses bióticos y abióticos. Los miRNAs fueron seleccionados por su represión temprana frente a elicitores de *M. oryzae*, ya que una respuesta rápida indicaría una regulación directa en respuesta al reconocimiento de los PAMPs. En todos los miRNAs se ha observado una respuesta dinámica de la expresión en la respuesta, varios de ellos mostrando inducción en tiempos tardíos, que podría ser una consecuencia, además del reconocimiento de los PAMPs, de la interacción con otros factores como: autorregulación de la vía de señalización, condiciones de luz, temperatura o humedad.

Se ha visto en este trabajo que los miRNAs que forman parte de un mismo precursor siguen un mismo patrón de expresión en el tiempo, excepto los osa-miR1847, que después de 2 horas del tratamiento se observa inducción de osa-miR1847.1 y

represión de osa-miR1847.2. Esta diferencia podría deberse al mecanismo llamado "*arm switching*" o "cambio de brazo" que se refiere a la selección específica de uno de los miRNA maduros que forman el dúplex, para ser cargado en el complejo RISC (Griffiths-Jones *et al.*, 2011). La expresión de uno u otro miRNA maduro del mismo precursor puede ser específico de cada tejido, estado de desarrollo o diferentes respuestas frente a condiciones del ambiente, teniendo un impacto en la regulación diferencial de las dianas (Griffiths-Jones *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2014). El fenómeno de "*arm switching*", descubierto recientemente, se ha descrito en miRNAs de algunas especies vegetales, incluida el arroz (Hu *et al.*, 2014). Así también puede darse la expresión de los denominados "isomiRs" o variantes de los miRNAs (Guo *et al.*, 2014), que en el caso específico de *osa-MIR1847* y según la base de datos del miRBase, estos isomiRs fueron detectados a lo largo de todo el precursor en varios análisis de secuenciación masiva. Esta situación también podría ser la explicación de haberse visto bandas de varios tamaños en los análisis por *Northern blot* para *osa-MIR1847*. Los eventos de transformación correspondientes a la sobreexpresión de los precursores *osa-MIR1847* y *osa-MIR5808* no resultaron eficientes en la acumulación del miRNA maduro en arroz, aunque se ha visto la acumulación *in vivo* en *N. benthamiana*. Según los resultados de sRNA-seq de este trabajo, la expresión de ambos en condiciones normales en la planta de arroz es muy baja (<100 lecturas), por lo que podría ser que la maquinaria enzimática de biogénesis no sea suficiente para lograr una acumulación diferencial en las plantas transgénicas. Sin embargo, el caso de *osa-MIR1319a* es similar y aun así se ha visto una acumulación incrementada en plantas de arroz transgénicas.

Es interesante el hecho de que el precursor *osa-MIR1847* sea producto de un intrón del gen de resistencia a patógenos *OsRPM1*, por lo que cabría esperar que la expresión de este precursor esté mediada por la expresión del gen de resistencia durante la respuesta de defensa. Este miRNA está reprimido en la respuesta PTI, mientras que *OsRPM1* se induce en la respuesta ETI por ser una proteína de interacción con efectores (Tornero *et al.*, 2002). Cabría entonces la posibilidad de que *osa-MIR1847* pueda también

ser inducido en la respuesta ETI. Lo que sugiere que tendría un papel diferencial en la respuesta PTI y en la respuesta ETI.

El pre-miRNA *osa-MIR5808* es producto de una zona no traducida de *OsZOS9-16*, un FT del tipo dedo de Zn de la subfamilia C_2H_2, los cuales han sido relacionados con respuestas frente a estrés (Kam *et al.*, 2008; Kottapalli *et al.*, 2007), aunque la función específica de este gen en concreto es desconocida. En la literatura se ha visto que osa-miR1847.1 tiene como diana al tránscrito codificante para una proteína que contiene un dominio ACT (Li *et al.*, 2010), de las que se sabe que son elementos reguladores funcionales en el metabolismo, transporte de solutos y transducción de señales mediante la interacción con factores de transcripción del tipo bHLH, principalmente (Chipman & Shaanan, 2001; Feller *et al.*, 2006; Grant, 2006; Kong *et al.*, 2012), existiendo la posibilidad de que cumpla funciones en la defensa de la planta.

Identificación y validación de dianas de los miRNAs seleccionados

Desde el desarrollo por German *et al.* (2009) del método PARE (*Parallel analysis of RNA ends*) para la detección de tránscritos degradados por miRNAs (degradoma), esta estrategia ha sido ampliamente utilizada y aceptada en las publicaciones para la validación de dianas de miRNAs de plantas (Hackenberg *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010a; Meng *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2013; Qiao-Ying *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012b). Así también, la sobreexpresión de miRNAs en arroz y otras plantas se ha utilizado como herramienta para la detección de dianas y su estudio funcional (Campo *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2010, 2011; Hu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013a; Lu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2009). En este trabajo se validó, por análisis de degradoma, la interacción entre algunos de los miRNAs seleccionados y sus dianas en la respuesta inmune PTI de las plantas de arroz. Algunas dianas también se han validado funcionalmente mediante sobreexpresión de los miRNAs en plantas de arroz y el análisis de la acumulación de sus tránscritos. El análisis de secuenciación de degradoma confirmó que, en la respuesta inmune de las plantas de arroz el miRNA osa-miR390-3p corta el

mRNA de un gen relacionado con el transporte de iones (LOC_Os06g42850); osa-miR390-5p degrada tránscritos de la quinasa *OsCK1.3*; osa-miR397b tiene como dianas los mRNAs del gen *OsCAMK13* y del gen codificante para un FT del tipo dedo de zinc; osa-miR1319a tiene como diana al tránscrito del gen *OsLTPL6*; y osa-miR1847.2 degrada el mRNA de un gen *AGO*. Los genes detectados como dianas para estos miRNAs podrían estar implicados en mecanismos moleculares de la respuesta PTI como la señalización mediada por fosforilación reversible de proteínas (quinasas), flujo de iones en la célula, regulación transcripcional (FT) y post-transcripcional (AGO). Si bien estos miRNAs fueron seleccionados por su represión en las respuestas PTI de la planta de arroz, los niveles de regulación post-transcripcional de sus dianas en esas condiciones podrían ser suficientes como para detectar esa interacción en el análisis de secuenciación masiva del degradoma. El análisis de acumulación de tránscritos para la validación de dianas utilizando las líneas sobreexpresoras de miRNAs mostró que los niveles de acumulación de los tránscritos *OsSIK1*, *OsLAC26*, *OsSPL12* y *OsLTPL6* disminuyen en las líneas sobreexpresoras de *osa-MIR390*, *osa-MIR397a/b*, *osa-MIR535* y *osa-MIR1319a*, respectivamente. Estos resultados confirman que dichos tránscritos son dianas para los miRNAs osa-miR390-5p (*OsSIK1*), osa-miR397a/b (*OsLAC26*), osa-miR535-5p (*OsSPL12*) y osa-miR1319a (*OsLTPL6*).

Los resultados obtenidos dan cuenta de que osa-miR390-5p tiene como dianas a los tránscritos codificantes para quinasas *OsCK1.3* y *OsSIK1*, coincidiendo con lo descrito previamente por Sunkar *et al.* (2005) quienes habían encontrado que este miRNA tiene como dianas los tránscritos de tres genes quinasas, además de los *TAS* que han sido descritos tanto en Arabidopsis como en arroz (Cho *et al.*, 2012; Krasnikova *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2010). Entre las posibles dianas analizadas se ha encontrado que la acumulación de los tránscritos *OsRLK5* y *OsBAK* está claramente inducida en las líneas *osa-MIR390*-Ox. Una posible explicación, como mencionan Li *et al.* (2013a), es que podrían o bien ser dianas de osa-miR390-5p por inhibición traduccional o estar bajo el efecto de una autorregulación de sus productos, como también se ha visto para miR172 en Arabidopsis (Schwab *et al.*, 2005). La regulación post-transcripcional de genes quinasas

pone a osa-miR390-5p en el punto crítico para el control de la señalización de las respuestas, siendo las quinasas componentes fundamentales en las cascadas de detección y traducción de señales por fosforilación pudiendo cumplir funciones en diferentes procesos fisiológicos como en las respuestas frente a estrés. En efecto, la proteína OsSIK1 ha sido previamente descrita y caracterizada como reguladora positiva de las respuestas de la planta de arroz en sequía y salinidad, siendo las plantas sobreexpresoras tolerantes a estos estreses abióticos (Ouyang *et al.*, 2010).

Los análisis realizados han puesto en evidencia que ambos osa-miR397 regulan la acumulación de tránscritos del gen lacasa *OsLAC26* y que osa-miR397b es responsable de la regulación de *OsCAMK13* y un factor de transcripción, siendo el primer registro de dianas que no sean lacasas descritas para algún miembro osa-miR397. Previamente han sido caracterizados en arroz dos genes lacasas (*OsLAC12* y *OsLAC13*) como dianas tanto para osa-miR397a como para osa-miR397b, y se ha validado funcionalmente esa interacción en el desarrollo reproductivo (Zhang *et al.*, 2013). Así también, esa interacción entre miembros de la familia miR397 y genes lacasas se ha documentado en la biosíntesis de lignina y el desarrollo reproductivo de Arabidopsis (Wang *et al.*, 2014) y en el contenido de lignina en *Populus trichocarpa* (Lu *et al.*, 2013). Otro tránscrito de un gen lacasa (*OsLAC22*) también ha sido encontrado como posible diana para los osa-miR397 por análisis de degradoma (Li *et al.*, 2010a). Las lacasas son glicoproteínas oxidasas que contienen varios átomos de cobre capaces de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos y aminos mediante la reducción de oxígeno, por lo que pueden estar relacionadas con la regulación de la formación de ROS, y son funcionales principalmente en la formación de lignina (Cai *et al.*, 2006; Gavnholt & Larsen, 2002; Mayer & Staples, 2002; Turlapati *et al.*, 2011). En plántulas de arroz tratadas con H_2O_2 se ha visto una inducción de osa-miR397 (Li *et al.*, 2011b) y en estudios aún no publicados del grupo de investigación de la Dra. Y-I Hsing de la Academia Sinica en Taiwán, con quienes se ha colaborado, se vio que la lacasa *OsLAC26* es regulada específicamente por osa-miR397 en respuesta a H_2O_2 en raíces. Estos datos establecen la relación entre el ROS y las

interacciones entre las lacasas y los miembros osa-miR397, indicando que podrían cumplir funciones en las respuestas a estrés a través de la regulación de la formación de ROS.

La interacción entre osa-miR1319a y su diana *OsLTPL6* es coincidente tanto en la respuesta PTI como en las líneas de expresión diferencial de *osa-MIR1319a*. Se ha visto además que estos dos componentes reguladores de la respuesta de defensa están muy cercanos en el genoma, aunque la regulación de su expresión es independiente. Esta situación tan particular podría ser producto de la evolución conjunta de *osa-MIR1319a* y su diana, estableciendo y asegurando un mecanismo de autorregulación de los procesos fisiológicos en las que están implicados. Existen evidencias en la literatura de una co-evolución entre los miRNAs de plantas y sus dianas, como se ha descrito en Arabidopsis, sugiriendo que en arroz podría ocurrir lo mismo (Ehrenreich & Purugganan, 2008; Zhang & Wing, 2013), sin embargo, la evolución conjunta en tándem no fue aún caracterizada. Las LTPs (*Lipid-transfer proteins*) de plantas son pequeñas proteínas muy abundantes, capaces de unirse a lípidos *in vitro*, aunque esta función no se da *in vivo*, por su localización extracelular. Las LTPs fueron descritas funcionalmente en muchos procesos fisiológicos, especialmente en la respuesta de defensa, pero también en el desarrollo, señalización y estrés abiótico (Kader, 1996; Ng *et al.*, 2012). Sin embargo, su función biológica específica no está del todo clara aún (Yeats & Rose, 2008). El hecho de que las LTPs participen en tan amplio rango de procesos hace suponer que la interacción entre osa-miR1319a y su diana *OsLTPL6* podría ser funcional en las respuestas de defensa de la planta de arroz.

Se ha validado que el tránscrito del gen *OsSPL12* es diana regulada post-transcripcionalmente de osa-miR535-5p. Las proteínas SPLs (*Squamosa promoter binding-like*) son factores de transcripción específicos de plantas, que regulan procesos del crecimiento y desarrollo de la planta, principalmente la transición entre los estadíos, desarrollo de flores y frutos, arquitectura de la planta, señalización por GA, entre otros. Estos FT han sido descritos como dianas de la familia miR156, controlando principalmente

la acumulación de las SPLs en la transición de la floración (Chen *et al.*, 2010; Galvao *et al.*, 2012; Jorgensen & Preston, 2014; Salinas *et al.*, 2012; Shalom *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009b; Yu *et al.*, 2012). Varias SPLs y su interacción con sus miRNAs reguladores fueron también relacionadas con estrés, principalmente frente a temperaturas extremas en Arabidopsis y arroz (Kim *et al.*, 2012; Sailaja *et al.*, 2014; Stief *et al.*, 2014). En arroz se ha descrito además una vía de señalización de respuesta a estrés hídrico mediada por OsSPL9, la cual controla la expresión de *osa-MIR408*, responsable de la tolerancia a sequía en la variedad N22 de arroz *indica* (Mutum *et al.*, 2013). Los genes *OsSPL10/11/12* se encuentran muy cercanos en el genoma y están descritos como dianas para los miembros osa-mir156. Se ha visto además que los genes *OsSPL10* y *OsSPL11* se encuentran cercanos a osa-miR156j y osa-miR156h, estableciéndose así un "*cluster*" o grupo entre estos genes *SPL* y sus reguladores (Xie *et al.*, 2006). La separación de *OsSPL12* podría indicar que este gen posee una regulación mediada por osa-miR535-5p, alternativa a la vía de osa-miR156, que no poseen los demás *SPL*. En arroz se ha visto que *OsSPL12* se expresa principalmente en la fase reproductiva en las panículas, localización que se corresponde con la acumulación durante el llenado de granos de su regulador osa-miR535 (Peng *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2006), por lo que es posible que esta interacción esté regulando procesos fisiológicos en el desarrollo de semillas. Peng *et al.* (2013) también han encontrado que *OsSPL12* se expresa en la fase vegetativa en tallos, vainas y en menor medida en hojas, al igual que se han visto en los resultados de esta tesis para la acumulación de osa-miR535-5p en la parte aérea de la planta joven, por lo que su interacción también podría regular procesos fisiológicos en estos tejidos.

Caracterización de los miRNAs seleccionados en la respuesta de defensa

En este capítulo de la tesis se ha mostrado principalmente que existe una correlación entre la represión de los miRNAs seleccionados en respuesta a elicitores fúngicos y en respuesta a infección por *M. oryzae*. En todos los casos se han visto respuestas dinámicas de los miRNAs y sus dianas, lo que podría ser debido a que los

miRNAs proveen una regulación fina y cuantitativa de la expresión de sus dianas en distintos procesos fisiológicos, otorgando a la planta la capacidad de resistir al estrés al cual se ve sometida en un momento preciso. La represión de estos miRNAs en respuesta a elicitores establece su implicancia en la regulación en las respuestas PTI, como se ha descrito previamente para otros miRNAs. En Arabidopsis específicamente, uno de los más estudiados y caracterizados es el miR393, que tiene como dianas a proteínas AFB de dominio F-Box en las respuestas de defensa PTI y es un regulador de la vía de señalización mediada por auxinas (Navarro *et al.*, 2006; Staiger *et al.*, 2013). Así también se ha visto que la sobreexpresión de miR160a resulta en una alta deposición de calosa en tratamientos con elicitores bacterianos, promoviendo la respuesta PTI (Li *et al.*, 2010b). Al contrario de los miRNAs estudiados en esta tesis, miR393 y miR160 son reguladores positivos de la respuesta de defensa, aunque también se han descrito los reguladores negativos miR398 y miR773, que inhiben la deposición de calosa y su sobreexpresión promueve el crecimiento bacteriano (Li *et al.*, 2010b; Yang & Huang, 2014). En arroz se ha identificado a osa-miR7695 por su inducción en la respuesta PTI y se lo ha caracterizado como un regulador positivo de la respuesta de defensa frente a *M. oryzae*, mediante la regulación de un tránscrito alternativo del gen relacionado con transporte de metales *OsNRAMP6* (Campo *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito que los miRNAs osa-miR160 y osa-miR398b son reguladores positivos de la respuesta de defensa de las plantas de arroz y su sobreexpresión otorga resistencia a la infección por *M. oryzae* mediante la inhibición del crecimiento del hongo debido a la acumulación de H_2O_2 (Li *et al.*, 2013a). Así también, Li *et al.* (2013a) han descrito que osa-miR535-3p es un regulador negativo de la respuesta de defensa frente a *M. oryzae*, coincidentemente con los resultados presentados en esta tesis. En la literatura se han identificado otros tantos miRNAs regulados en la respuesta de defensa de arroz y otras especies (Campo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013a; Tang *et al.*, 2012a; Zhu *et al.*, 2013).

Este trabajo ha demostrado que la sobreexpresión de *osa-MIR390* y *osa-MIR397b* en plantas de arroz, resulta en un incremento de la susceptibilidad frente a la infección

por *M. oryzae*, así como que la pérdida de función de *osa-MIR1319a* otorga un fenotipo de resistencia frente a este patógeno truncando el proceso de colonización de los tejidos foliares. Estas observaciones confirman que osa-miR390-5p, osa-miR397b y osa-miR1319a, son reguladores negativos de la respuesta de defensa de las plantas de arroz mediante la regulación post-transcripcional de alguna o varias de sus dianas reguladoras positivas de la respuesta de defensa. A pesar de ser sistemas diferentes, en este trabajo se intentó probar que los miRNAs identificados en arroz podrían también ser funcionales en la respuesta de defensa de Arabidopsis, sin embargo, la pérdida de función de los ath-miR390 y ath-miR397 no otorga un fenotipo visible en la respuesta de defensa frente al hongo *P. cucumerina*, que a diferencia del hemibiótrofo *M. oryzae*, presenta crecimiento exclusivamente necrótrofo. Estas evidencias podrían indicar que estos miRNAs tienen funciones distintas en las diferentes especies vegetales o que pueden cumplir funciones en la respuesta de defensa frente a patógenos biotróficos. Deberían realizarse más estudios para contrastar estas hipótesis. Los trabajos publicados por Wang *et al.* (2014) y por Zhang *et al.* (2013) sobre los miembros miR397 de Arabidopsis y arroz, son coincidentes en las funciones de estos miRNAs en el desarrollo reproductivo mediante la regulación post-transcripcional de sus dianas las lacasas *AtLAC4* y *OsLAC12/13*, respectivamente. Esto pone en manifiesto que estos miRNAs cumplen funciones similares en ambas especies, aunque la coincidencia en sus funciones en cuanto a las respuestas de defensa queda aún por determinar. Estos resultados podrían ser el inicio para intentar diferenciar la funcionalidad de estos miRNAs en las vías de señalización de la respuesta en diferentes especies y frente a diferentes tipos de patógenos.

Las líneas *osa-MIR390*-Ox presentan un fenotipo de hipersusceptibilidad frente a *M. oryzae*, pudiendo deberse a la regulación post-transcripcional de su diana *OsSIK1*, la que ya ha sido descrita como un regulador positivo en las respuestas a estrés abiótico (Ouyang *et al.*, 2010). Estas evidencias ponen en consideración que la quinasa OsSIK1 podría mediar positivamente la señalización de las respuestas de las plantas de arroz a diferentes tipos de estreses tanto abióticos como bióticos. Esta situación de regulación

positiva en varias respuestas no es muy común, ya que generalmente la planta se encuentra en un equilibrio fisiológico cuando es sometida a diferentes tipos de estrés, teniendo a menudo consecuencias negativas en otros procesos, como el desarrollo, metabolismo y en otras respuestas a estrés. En ese contexto, en arroz se ha reportado la interacción negativa entre las respuestas a estrés biótico y abiótico, como lo observado en el primer capítulo de este trabajo con OsCPK13 que es un regulador negativo de la respuesta de defensa y regulador positivo de la respuesta a sequía, ocurriendo una situación similar con OsCPK12 con respecto a la defensa y la salinidad (Asano *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha visto que algunas proteínas quinasas tienen la particularidad de cumplir funciones en la regulación positiva en varias respuestas, como OsCPK4, la cual es responsable de otorgar tolerancia a estrés abiótico (sequía y salinidad) y resistencia a *M. oryzae* (Campo *et al.*, 2014; Bundó & Coca, 2015). Estos resultados sugieren que OsSIK1 podría ser un buen candidato para su estudio en las respuestas de defensa frente a *M. oryzae*.

La sobreacumulación de osa-miR397b otorga un ligero aumento de la susceptibilidad frente a *M. oryzae*, sin embargo, no se encontró un fenotipo en la respuesta de defensa asociado a la acumulación de osa-miR397a ni a la pérdida de función de *OsLAC13*. Una posible explicación podría ser que ambos miembros osa-miR397 regulen diferentes dianas en una relación espacio-temporal distinto, condiciones fisiológicas, respuestas a estrés, o bien podrían ser más afines a unos u otros tránscritos dianas. Estas diferencias fenotípicas entre la sobreexpresión de uno u otro miembro miR397 no se han visto en los resultados en Arabidopsis presentados por Wang *et al.* (2014) ni en los trabajos en arroz realizados por Zang *et al.* (2013). No obstante, en este último trabajo demuestran que existen diferencias en la eficiencia de degradación por osa-miR397a y osa-miR397b de sus dianas comunes. Se ha visto en la predicción de dianas que osa-miR397b tiene, además de las lacasas y otras en común con osa-miR397a, posibles dianas como el tránscrito *avr9* de respuesta a elicitores y un tránscrito codificante para una proteína de choque térmico, las que podrían hacer la diferencia en su

funcionalidad en respuestas a estrés biótico. No se han descrito aún proteínas lacasas que estén implicadas en las respuestas de defensa de las plantas, aunque su rol en el estrés oxidativo podría ser un punto de enfoque para su estudio frente a estrés. No obstante, se ha especulado que: por los patrones de expresión en tejidos no lignificados, por los cambios en la composición de los monómeros de lignina en respuesta a estrés, y por la presencia de cajas del tipo W (WRKY) en la región promotora de varios genes lacasas, estas proteínas podrían tener un papel en la respuesta de defensa (Cho *et al.*, 2014; Turlapati *et al.*, 2011). En el caso de los resultados observados en esta tesis, se ha confirmado que osa-miR397b es un regulador negativo funcional en la respuesta de defensa de la planta de arroz, aunque queda aún por determinar cuál es la vía reguladora en la que cumple sus funciones y si esta vía está dada por la regulación de alguna de sus dianas lacasas.

En este trabajo se ha demostrado que la resistencia a *M. oryzae* observada en las líneas *osa-MIR1319a*-Kd podría ser debida a la inhibición del proceso de colonización del hongo mediante la inducción basal de genes relacionados con la patogénesis como *OsPBZ1*, *OsPR10*, *OsPAL1* y *OsPOX22.3*, cuya inducción se incrementa aún más en condiciones de infección. La acumulación de *OsPOX22.3* además podría ser un indicativo de que en estas líneas existe una desregulación en la producción de ROS en respuesta a estrés. En este contexto se ha establecido además una relación directa entre la acumulación de tránscritos de *OsLTPL6* y la disminución de su regulador osa-miR1319a en condiciones de infección, interacción que se ha visto directamente relacionada con la resistencia de las plantas de arroz frente a *M. oryzae*. Las LTPs de plantas fueron ampliamente estudiadas por su implicancia en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos, pudiendo actuar directamente como antimicrobianos inhibiendo el crecimiento o siendo funcionales en la señalización de la respuesta, incluso a través de la señalización sistémica o SAR (García-Olmedo *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Sarowar *et al.*, 2009; Segura *et al.*, 1993; Vignols *et al.*, 1997; Zottich *et al.*, 2014). En arroz específicamente se ha visto una inducción de genes *LTP* en respuesta a la interacción con

micorrizas en raíces (Campos-Soriano *et al.*, 2012) y se ha demostrado que LTP110 actúa como antimicrobiano inhibiendo la germinación de esporas de *M. oryzae* y ralentizando el crecimiento de *X. oryzae* (Ge *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2012). Cabe mencionar que los genes analizados corresponden principalmente a la ruta de señalización por SA y que no se descarta que pudieran existir alteraciones también en otras vías de respuesta como la del ET o la del JA, de respuesta a patógenos necrótrofos. En trabajos previos se ha establecido una relación entre las distintas vías de señalización por hormonas y varios miRNAs (Curaba *et al.*, 2014), pudiendo también osa-miR1319a formar parte de esta red. Estas evidencias sugieren que la acumulación de OsLTPL6 podría ser funcional en la inhibición de la colonización de los tejidos por *M. oryzae* o bien formar parte de la señalización que guía la expresión de los genes de defensa.

Caracterización de los miRNAs seleccionados frente a estrés hídrico

Los miRNAs estudiados en esta tesis fueron seleccionados por su posible implicancia en la respuesta de defensa, aunque también se buscaba establecer una conexión entre esas respuestas frente a estrés biótico y posibles respuestas a estrés abiótico, especialmente hídrico. Los promotores de varios de los miRNAs seleccionados poseen elementos reguladores de respuesta a sequía, lo que se corresponde con la expresión diferencial de algunos de esos miRNAs en respuesta a desecación, confirmándose la represión de osa-miR390-5p y la inducción de osa-miR397a/b y osa-miR1319a. Estas evidencias indicarían *a priori*, que estos dos últimos podrían ser reguladores positivos de la respuesta frente a estrés hídrico y osa-miR390-5p actuar como regulador negativo. Los resultados obtenidos confirman que osa-miR397a es un regulador positivo de la tolerancia a sequía probablemente mediante la regulación de *OsLAC13*, ya que una acumulación de este miRNA otorga un ligero incremento de la resistencia, y que la pérdida de función de su diana *OsLAC13* aumenta esa tolerancia significativamente. Se ha visto, sin embargo, que la sobreexpresión de *osa-MIR390* no confiere a las plantas de arroz un fenotipo visible frente a condiciones de sequía y que la

pérdida de función de *osa-MIR1319a*, al contrario de lo que cabría esperar, otorga resistencia a esas condiciones. En trabajos previos se ha visto que la sobreexpresión de *osa-MIR393* en plantas de arroz otorga menos tolerancia a sequía, siendo un regulador negativo de las respuestas (Xia *et al.*, 2012). Por otra parte se ha demostrado que miR169 es un regulador positivo, ya que se ha visto que la sobreexpresión de este miRNA de tomate confiere resistencia a sequía (Zhang *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los encontrados en la literatura sobre el papel de varios miRNAs en la respuesta frente a sequía, probablemente mediante la regulación de sus dianas.

En los trabajos realizados no se ha logrado observar correspondencia entre la sobreexpresión de *osa-MIR390* y un fenotipo claro en respuesta a sequía. Las líneas *osa-MIR390*-Ox, como se ha visto, tienen una pérdida de función de la quinasa que otorga tolerancia a estrés hídrico *OsSIK1* (Ouyang *et al.*, 2010), por lo que un fenotipo esperable sería que estas plantas sean más susceptibles a condiciones de sequía, lo que en este trabajo no se pudo observar. En los trabajos publicados por Saijo *et al.* (2000) no se han utilizado las líneas de pérdida de función de la quinasa de tolerancia a sequía/salinidad/frío *OsCPK13* en los análisis fenotípicos frente a falta de agua pero sí frente a frío, observándose el fenotipo contrario a la sobreexpresión. Esta situación hace suponer que probablemente no han logrado poner a punto las condiciones para observar el fenotipo de susceptibilidad en sequía. Sin embargo, podrían realizarse más esfuerzos en la búsqueda de las condiciones experimentales óptimas para analizar fenotipos susceptibles a sequía y analizar las líneas *osa-MIR390* para establecer la relación entre osa-miR390-5p y su diana *OsSIK1* en respuesta a sequía.

La acumulación de osa-miR397a y principalmente la pérdida de función de *OsLAC13* otorga a la planta de arroz un fenotipo de resistencia a condiciones de sequía, probablemente debido a una mayor acumulación de H_2O_2 en las raíces en respuesta a la desecación. Previamente se han identificado motivos de unión a factores de transcripción relacionados con estrés abiótico en los promotores de miRNAs de arroz, principalmente

de unión a FTs del tipo MYB de respuesta a deshidratación en los miembros osa-miR397 (Rama Devi *et al.*, 2013), datos coincidentes con los encontrados en los análisis de promotores de esta tesis. En cebada se ha descrito que la expresión heteróloga del factor de transcripción del tipo AP2/EREBP de trigo *TaDREB3*, que confiere tolerancia a sequía, afecta la expresión de varios miRNAs entre los que se encuentra miR397 (Hackenberg *et al.*, 2012). Así también, en varias especies vegetales, incluido el arroz, se han estudiado miRNAs por su respuesta a diferentes condiciones hídricas, encontrándose a menudo la acumulación diferencial de miR397 (Ferreira *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012b; Zhou *et al.*, 2010). Se ha visto que este miRNA tiene una respuesta a varios factores abióticos además de la desecación, como el frío, salinidad y tratamientos con H_2O_2 y ABA, la hormona reguladora de las respuestas a estrés hídrico (Li *et al.*, 2011b; Rama Devi *et al.*, 2013; Sunkar & Zhu, 2004; Zhou *et al.*, 2010). Las plantas producen ROS en condiciones de estrés hídrico y existen enzimas detoxificadoras y antioxidantes que regulan el contenido de estas moléculas y mantienen el estado redox de la célula (Cruz de Carvalho, 2008). Entre estas enzimas se podrían encontrar las lacasas por su papel antioxidante en la reducción de oxígeno. En plantas de arroz sobreexpresoras del gen *OsCPK4*, tolerantes a sequía y salinidad, se ha visto inducida una lacasa y se la relaciona con la capacidad de reducir la peroxidación de lípidos de membrana, protegiendo a los tejidos del daño causado por la acumulación de ROS en respuesta al estrés (Campo *et al.*, 2014). Esta situación es la contraria a la encontrada en este trabajo en las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd, sin embargo, la tolerancia a sequía también podría deberse a la autorregulación, posiblemente acumulando otras lacasas o moléculas detoxificadoras de ROS en respuesta al bajo contenido de OsLAC13. La acumulación de H_2O_2 en las raíces en condiciones de desecación en las líneas *osa-MIR397a*-Ac y *OsLAC13*-Kd, podría estar relacionada con la incapacidad que tienen esas plantas de detoxificar las grandes cantidades de ROS, producidas a falta de OsLAC13, enzima que podría ser funcional en ese proceso de detoxificación. Por esto, se sugiere que OsLAC13 podría cumplir funciones en la detoxificación de ROS en las raíces en respuesta a estrés. Un

incremento de H_2O_2 podría también actuar como molécula señalizadora, desencadenando las respuestas de aclimatación frente al estrés, o mediando la respuesta de la vía del ABA, induciendo el cierre de estomas a través de la activación de canales de Ca^{+2} (Cruz de Carvalho, 2008; Mittler & Blumwald, 2015). Estas hipótesis son sólo especulativas, y deberían realizarse más estudios para entender precisamente el mecanismo de la resistencia a sequía en estas líneas.

En este trabajo se ha demostrado que tanto *osa-MIR1319a* como su diana *OsLTPL6* se inducen en respuesta a desecación. Las líneas de pérdida de función de *osa-MIR1319a* tienen un fenotipo de tolerancia a sequía, probablemente mediante la baja acumulación de la proteína OsLTPL6 y una reducción en la formación de H_2O_2 en raíces bajo condiciones de estrés. Estos resultados indican que osa-miR1319a es un regulador negativo de las respuestas frente a estrés hídrico, mientras que OsLTPL6 funciona como un regulador positivo. Las LTPs han sido descritas en una gran variedad de estreses, como ya se ha mencionado previamente, y se ha demostrado que se inducen en tratamientos por ABA y desecación. La inducción de genes *LTP* en respuesta a estrés hídrico podría justificarse por su implicancia en la deposición de cutina que protege a la planta evitando su desecación (Kader, 1996). Por ejemplo, en trigo se ha visto que las *TaLTP1* y *TaLTP2* se inducen en respuesta a estrés hídrico y salinidad (Li *et al.*, 2006) y en *Lotus japonicus* que *LjLTP10* está regulada en respuesta a sequía (Tapia *et al.*, 2013). En arroz específicamente se ha visto que la sobreexpresión de genes *LTP* como *OsChI1* y *OsDIL1* otorga a las plantas un fenotipo de tolerancia a sequía (Cho *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2013) y este trabajo sugiere que la desregulación post-transcripcional de *OsLTPL6* puede mediar la tolerancia a desecación en la planta de arroz. Esta tolerancia podría estar relacionada con la baja producción de H_2O_2 en sus raíces cuando son sometidas a desecación, que podría prevenir la peroxidación de lípidos de la membrana protegiendo a los tejidos del daño oxidativo. La peroxidación de lípidos por exceso de ROS se ha asociado a diferentes estreses abióticos y perturba la permeabilidad de las membranas (Perez & Brown, 2014). El mantenimiento de la integridad de las membranas celulares es un determinante de la

tolerancia a sequía en plantas (Farooq *et al.*, 2012).Se ha descrito previamente que la línea *osa-MIR1319a*-Kd tiene ligeramente inducida la expresión de la peroxidasa *OsPOX22.3*, y que su expresión aumenta aún más en condiciones de estrés, por lo que la baja producción de H_2O_2 en esta línea podría deberse a un aumento de la expresión de peroxidasas en respuesta a estrés hídrico. La tolerancia mediada por una reducción en la acumulación de osa-miR1319a y por consiguiente la acumulación de la proteína OsLTPL6, impide que las raíces acumulen altas cantidades de ROS, posiblemente protegiéndolas del daño oxidativo, aunque los mecanismos específicos quedan aún por establecerse.

La manipulación de la regulación post-transcripcional de genes es una aproximación fina para modificar componentes implicados en las respuestas de las plantas frente a distintos tipos de estrés. En este trabajo se han encontrado miRNAs que son reguladores negativos funcionales de la respuesta de defensa de las plantas de arroz frente a *M. oryzae* (*osa-MIR390*, *osa-MIR397b* y *osa-MIR1319a*) y cuyas dianas podrían tener un papel en la regulación positiva en esas respuestas (*OsSIK1*, lacasas, *OsLTPL6*). Además, se ha encontrado que *OsLAC13* participa negativamente en la tolerancia a estrés hídrico y que esa respuesta podría estar regulada por *osa-MIR397a*. Se ha establecido así una posible diferenciación funcional entre los miembros *osa-MIR397* de arroz. Interesantemente se ha llegado a confirmar que *osa-MIR1319a* es un regulador negativo además de la respuesta a sequía, mediante la interacción con su diana *OsLTPL6*. Así, la estrategia basada en la disminución de osa-miR1319a sería una excelente diana para mejorar la resistencia a patógenos y tolerancia a sequía.

Conclusiones

Conclusiones

1. El gen *OsCPK13* se expresa de manera constitutiva y a niveles similares tanto en raíces como en la parte aérea de la planta de arroz, siendo en los tejidos jóvenes y los haces vasculares donde su promotor presenta mayor actividad. Su expresión se induce en respuesta a elicitores fúngicos y por alta fertilización fosfatada.

2. La proteína OsCPK13 se localiza en la membrana plasmática, cuando se produce de manera transitoria como fusión a proteínas fluorescentes en células epiteliales de hojas de tabaco.

3. La proteína OsCPK13 se acumula tardíamente durante la respuesta de defensa frente al hongo patógeno de arroz *M. oryzae*.

4. La sobreexpresión de *OsCPK13* en plantas de arroz confiere una mayor susceptibilidad a la infección por *M. oryzae*. Este fenotipo está asociado a la acumulación constitutiva de altos niveles de ROS.

5. No se han detectado cambios fenotípicos asociados al silenciamiento de la expresión del gen *OsCPK13*.

6. La sobreexpresión de *OsCPK13* influye en la estructura radicular de las plantas de arroz, provocando el desarrollo de un mayor número de raíces secundarias y el acortamiento de la raíz principal.

7. La sobreexpresión de *OsCPK13* causa también defectos severos en el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas y genera lesiones necróticas espontáneas en las hojas de plantas adultas, como consecuencia de acumular cantidades tóxicas de

fósforo en las hojas. Los defectos fenotípicos son aliviados cuando las plantas crecen en un medio deficiente en contenido de fosfatos.

8. La sobreexpresión de *OsCPK13* provoca alteraciones en la expresión de genes relacionados con la homeostasis de fosfatos, como la inducción de *OsPHO2* y el transportador *OsPT2* y la represión de la fosfatasa *OsPAP10*. La acumulación excesiva de fósforo en las hojas está asociada con los altos niveles de expresión del transportador de fosfatos *OsPT2*, responsable de la translocación del nutriente a la parte aérea desde las raíces.

9. Se han seleccionado 10 miRNAs de arroz potencialmente implicados en la regulación negativa de las respuestas de defensa, se han clonado y se han generado líneas transgénicas de arroz sobreexpresoras de los precursores *osa-MIR390*, *osa-MIR397a*, *osaMIR397b*, *osaMIR535*, *osa-MIR1319a*, *osa-MIR1847* y *osa-MIR5808*.

10. Se ha observado una represión de osa-miR390-5p, mientras que los miRNAs osa-miR397a/b y osa-miR1319a presentan una inducción de su expresión, en condiciones de estrés hídrico.

11. Se ha identificado como diana de osa-miR535-5p al tránscrito del gen *OsSPL12* y se ha validado su interacción en plantas transgénicas sobreexpresoras de *osa-MIR535*.

12. El tránscrito del gen *OsSIK1* ha sido identificado y validado como diana de osa-miR390-5p. La sobreexpresión de su precursor *osa-MIR390* en plantas de arroz confiere una mayor susceptibilidad a la infección por *M. oryzae*, pero ningún fenotipo aparente frente a sequía.

13. No se han detectado cambios fenotípicos asociados al silenciamiento de la expresión de ath-miR390 ni en ath-miR397 en plantas de Arabidopsis.

14. Se ha identificado y validado funcionalmente al mRNA del gen *OsLAC26* como de diana de osa-miR397a y osa-miR397b.

15. La acumulación de osa-miR397b en las plantas de arroz provoca un leve aumento en la susceptibilidad frente a *M. oryzae*, mientras que la acumulación de osa-miR397a y la pérdida de función de *OsLAC13* no supone una respuesta fenotípica en condiciones de infección pero sí presentan una mayor tolerancia y supervivencia a condiciones de sequía, fenotipo relacionado a una acumulación de H_2O_2 en el tejido radicular sometido a estrés hídrico.

16. Se ha establecido la interacción entre el tránscrito del gen *OsLTPL6* y el miRNA osa-miR1319a por degradoma y se ha validado como diana para ese miRNA mediante análisis de líneas sobreexpresoras y mutantes de *osa-MIR1319a*.

17. La acumulación de OsLTPL6 como consecuencia de una baja expresión de su regulador *osa-MIR1319a* en plantas de arroz provoca una inducción constitutiva de genes de defensa y confiere mayor resistencia a infección por *M. oryzae*, impidiendo el proceso de colonización de los tejidos foliares. Otorga además tolerancia a sequía, aumentando la supervivencia de las plantas sometidas al estrés.

Materiales y métodos

Materiales

1. Bacterias

Cepas de *Escherichia coli*

- DH5αF' (Hanahan, 1983): cepa no expresiva de uso general en las clonaciones y en propagación de plásmidos.
- DB3.1: cepa para la propagación de vectores Gateway® de Invitrogen™ que poseen el gen *ccdB*. Contiene la mutación gyrA462 que provee resistencia a los efectos tóxicos de ccdB.

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

- EHA105 (Hood *et al.*, 1993): cepa utilizada en la transformación estable de callos de *O. sativa* y para infiltración de hojas de *N. benthamiana*.

Cepa de *Dickeya dadantii*

- AC4150: utilizada para ensayos de infección en plantas de arroz.

2. Hongos

- *Fusarium verticillioides* (cedida por el Servei de Protecciò del Vegetals, Generalitat de Catalunya): aislado de plantas de arroz del Delta del Ebro.
- *Plectosphaerella cucumerina*
- *Magnaporthe oryzae* aislado Guy11-GFP (cedido por la Dra. A. Sesma, CBGP, Madrid, España): produce de forma constitutiva la proteína fluorescente GFP.
- *M. oryzae* aislado FR13 (cedido por Dr. D. Tharreau, CIRAD, Montpellier, Francia).

3. Material vegetal

Variedades y líneas de arroz que fueron utilizadas:

- *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare
- *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Tainung67
- *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Maratelli
- *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Saber
- *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Ariete

- Líneas transgénicas *OsCPK13*-Ox: *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare sobreexpresora del gen *OsCPK13* bajo el control del promotor del gen *Ubiquitin* de maíz y del terminador *Nos*.
- Líneas transgénicas *OsCPK13*-Kd: *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare expresora de un miRNA artificial que tiene como diana al tránscrito del gen *OsCPK13* bajo el control del promotor del gen *Ubiquitin* de maíz y del terminador *Nos*.
- Líneas transgénicas Ev: *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare transformada con un vector binario de expresión con el promotor del gen *Ubiquitin* de maíz y el terminador *Nos* o transformada con el vector de expresión en plantas que contiene sólo el gen de selección *hptII* dentro del T-DNA.
- Líneas transgénicas p*OsCPK13*:*GUS*:T-*Nos*: *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Ariete expresora del gen marcador *GUS* bajo el control del promotor del gen *OsCPK13* y del terminador *Nos*.
- Líneas transgénicas TRIM (Academia Sinica, Taiwán): Mutantes de T-DNA insercionales generadas sobre el fondo genético de *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Tainung67.

Líneas de *Arabidopsis thaliana*:

- *A. thaliana* ecotipo Columbia 0
- Línea transgénica Ev: *A. thaliana* ecotipo Columbia 0 transformada con el vector de transformación sin inserciones dentro del T-DNA.
- Línea transgénica MIM-miR390: *A. thaliana* ecotipo Columbia 0 expresora de una construcción que mimetiza una diana para miR390. Cedida por el Dr. I. Rubio-Somoza, *Max Planck Institute for Developmental Biology*, Alemania.
- Línea transgénica MIM-miR397: *A. thaliana* ecotipo Columbia 0 expresora de una construcción que mimetiza una diana para miR397. Cedida por el Dr. I. Rubio-Somoza, *Max Planck Institute for Developmental Biology*, Alemania.

La línea de *Nicotiana benthamiana* fue:

- Línea *RdR6*: mutante en el gen *RdR6*, componente de la maquinaria de silenciamiento génico de RNAs exógenos. Cedida por el Dr. D. Baulcombe, *University of Cambridge*, Reino Unido.

4. Oligonucleótidos

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron diseñados en el programa bioinformático *en línea* Primer3 v4.0 (http://primer3.ut.ee/) y las secuencias analizadas en la base de datos del NCBI BLAST (*Basic local alignment search tool* - http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Los mismos fueron sintetizados por las casas comerciales IDT y/o Sigma y se listan en las Tablas 14, 15 y 16.

5. Plásmidos, vectores y construcciones

Los plásmidos, vectores y construcciones utilizados y/o generados en este trabajo se muestran en la Tabla 17.

6. Anticuerpos

El anticuerpo específico utilizado en este trabajo fue el preparado contra la región N-terminal de la proteína OsCPK13 y es proveniente de conejos. Ha sido utilizado en experimentos de inmunotransferencia de proteínas y detección de la proteína mencionada a una dilución de 1:1000.

Tabla 14. Cebadores relacionados con clonaciones y genotipados

Nombre	Ta (ºC)	Secuencia (5'-3')	Utilización y características relevantes
Directo	53	GTAAAACGACGGCCAGT	Confirmación y secuenciación de insertos en pGEM-T
Reverso	47	CAGGAAACAGCTATGAC	
hptII-fwd	57	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGA	Amplificación del gen de resistencia a higromicina *hptII*
hptII-rvs	57	CTTCTACACAGCCATCGGTCC	
attR1_fwd	51	ATCACAAGTTTGTACAAAAAAGC	Confirmación y secuenciación de insertos en vectores Gateway® con secuencias attR
attR2_rvs	53	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTG	
OsCPK13-BamHI-fwd	62	CGGGATCCCGTTTGATGGGCAACGCATGCG	Amplificación del cDNA *OsCPK13* a partir del ATG y sin codón de parada, añadiendo secuencias BamHI y XhoI a los extremos 5' y 3', respectivamente
OsCPK13NoStop-XhoI-rvs	63	TACTCGAGGCACCAGGTGCGTCCCTCAT	
osa-MIR390-BamHI-fwd	54	GCGGATCCTGAAGGATCTCATGGCCTTT	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR390*, añadiendo secuencias BamHI y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR390-SmaI-fwd	58	GCCCCGGGCAGAGGTGTGCGTGGAGAC	
osa-MIR397a-BglII-fwd	56	GCAGATCTACACACGAAAGTTGCAGCAG	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR397a*, añadiendo secuencias BglII y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR397a-SmaI-fwd	55	GCCCCGGGCCATAACTGAGTTGCTGCATTG	
osa-MIR397b-BamHI-fwd	57	GCGGATCCGAAGCTGCCTAGCCAAGTGA	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR397b*, añadiendo secuencias BamHI y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR397b-SmaI-fwd	54	GCCCCGGGTGGATTGTGTGTGCATCTGA	
osa-MIR535-BamHI-fwd	56	GCGGATCCTCAGAGGGAGCTGATCTTGTC	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR535*, añadiendo secuencias BamHI y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR535-SmaI-fwd	55	GCCCCGGGCATGCGAGCGAGAGCATA	
osa-MIR1319a-BamHI-fwd	56	GCGGATCCAGGTACCGGACGTGCTAAAA	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR1319a*, añadiendo secuencias BamHI y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR1319a-SmaI-fwd	58	GCCCCGGGGGGAGTAGATAGGGTGGCTCA	
osa-MIR1847-BamHI-fwd	57	GCGGATCCTATGGGTGCTGACTGCTGAG	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR1847*, añadiendo secuencias BamHI y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR1847-SmaI-fwd	55	GCCCCGGGGAAGTGCTTCTATGCTCCTCAAA	
osa-MIR5808-BglII-fwd	59	GCAGATCTACCACGACTCCTCCTCCAC	Amplificación del gDNA conteniendo la secuencia de *osa-MIR5808*, añadiendo secuencias BglII y SmaI a los extremos 5' y 3', respectivamente
osa-MIR5808-SmaI-fwd	54	GCCCCGGGGAAGAGATTCACTCTGGTCCAA	
RB-fwd	54	ACTCATGGCGATCTCTTACC	Genotipado de mutantes TRIM

M0053518-fwd	54	CTGCTGCAACTTTCGTGT	Genotipado del mutante TRIM M0053518
M0053518-rvs	53	GGGTGAGCAGTACAAAGAAA	
M0109988-fwd	54	ATTTGCATCGCTTCACACAG	Genotipado del mutante TRIM M0109988
M0109988-rvs	54	CACGACTCCACTATCACACA	
M0058436/45-fwd	54	ACTCGCATTTCTCATATACCCA	Genotipado de los mutantes TRIM M0058436 y M0058445
M0058436/45-rvs	54	TTGGTTCGTTGCTGATGAGA	

Tabla 15. Sondas y cebadores de stemloop-RT

Nombre	Secuencia (5'-3')	Utilización y características relevantes
osa-miR390-5p-Sonda	GGCGCTATCCCTCCTGAGCTT	Detección de osa-miR390-5p por análisis *Northern blot*
osa-miR397a-Sonda	CATCAACGCTGCACTCAATGA	Detección de osa-miR397a por análisis *Northern blot*
osa-miR397b-Sonda	CATCAACGCTGCACTCAATAA	Detección de osa-miR397b por análisis *Northern blot*
osa-miR535-5p-Sonda	GCGTGCTCTCTCTCGTTGTCA	Detección de osa-miR535-5p por análisis *Northern blot*
osa-miR1319a-Sonda	TATAATATATTACAGATGCCGGTT	Detección de osa-miR1319a por análisis *Northern blot*
osa-miR1847.1-Sonda	GTGCCACAACTGCAAACTGCA	Detección de osa-miR1847.1 por análisis *Northern blot*
osa-miR5808-Sonda	TCCAACGATCAGAAACGATTTAGT	Detección de osa-miR5808 por análisis *Northern blot*
SLosa-miR390-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACGGCGCT	*Stemloop* RT de osa-miR390-5p
SLosa-miR397a/b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCATCAA	*Stemloop* RT de osa-miR397a/b
SLosa-miR535-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACGCGTGC	*Stemloop* RT de osa-miR535-5p
SLosa-miR1319a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTATAAT	*Stemloop* RT de osa-miR1319a
SLosa-miR5808	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTCCAAC	*Stemloop* RT de osa-miR5808
SLath-miR390a/b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACGGCGCT	*Stemloop* RT de ath-miR390a/b
SLath-miR397a/b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCATCAA	*Stemloop* RT de ath-miR397a/b

Tabla 16. Cebadores para qRT-PCR

Nombre	Ta (ºC)	Secuencia (5'-3')	Utilización y características relevantes
OsUbi1-fwd	56	TTCCCCAATGGAGCTATGGTT	qRT-PCR del mRNA del gen de referencia de arroz *OsUbi1*
OsUbi1-rvs	58	AAACGGGACACGACCAAGG	
OsEF1α-fwd	63	GTGCTCGACAAGCTCAAGGCCG	RT-PCR del mRNA del gen de referencia de arroz *OsEF1α*, diseñado para distinguir la presencia de gDNA en el cDNA sintetizado
OsEF1α-rvs	62	GTCTGATGGCCTCTTGGGCTCG	
ATTUB-fwd	57	TGTTCAGGCGAGTGAGTGAG	qRT-PCR del mRNA del gen de referencia para arabidopsis *ATTUB*
ATTUB-rvs	57	ATGTTGCTCTCCGCTTCTGT	
OsCPK13-fwd	59	ATGCGGCGGTTCCCTTAGAT	qRT-PCR del mRNA *OsCPK13*, diseñados en la región correspondiente a N-terminal de la proteína
OsCPK13-rvs	56	TTGTTGTTGTCGTCGGTGTC	
OsPOX22.3-fwd	59	CTCTCTCAGGAGCACACACGAT	qRT-PCR del mRNA *OsPOX22.3*
OsPOX22.3-rvs	57	CCCTGAAATTCTGGCACTGC	
OsPR1a-fwd	56	GGAAGTACGGCGAGAACATC	qRT-PCR del mRNA *OsPR1a*
OsPR1a-rvs	56	GGCGAGTAGTTGCAGGTG	
OsPR5-fwd	59	GACGACCAGACGAGCACCTT	qRT-PCR del mRNA *OsPR5*
OsPR5-rvs	58	GTCCCTCATGGGCAGAAGAC	
OsJAmyb-fwd	53	CATGTGCATGGTGATGATGA	qRT-PCR del mRNA *OsJAmyb*
OsJAmyb-rvs	53	CGGACAAACCCTCAGAAAAA	
OsEREBP-fwd	56	AAGATCCGTGGCAAGAAAGC	qRT-PCR del mRNA *OsEREBP*
OsEREBP-rvs	58	GCTTCTGAGCAACAGCTGGTT	
OsAOC-fwd	56	GCAGGAGATGTTCGTGTACG	qRT-PCR del mRNA *OsAOC*
OsAOC-rvs	66	GTTGCGCTCCGGCACGTGCT	
OsPBZ1-fwd	59	GCGATGGCTCCTGTGTGG	qRT-PCR del mRNA *OsPBZ1*
OsPBZ1-rvs	60	CTCCGGCGACAGTGAGCT	
OsPR10-fwd	57	TCAGGCAGTTCAACTTCACCTC	qRT-PCR del mRNA *OsPR10*
OsPR10-rvs	57	CTTAGCCTTGGTGATCTCGTCC	
OsPAL1-fwd	57	ATTGAGCACGGCTTCTTCGA	qRT-PCR del mRNA *OsPAL1*
OsPAL1-rvs	58	CACCATGGCAAGACCTTCCT	
OsPHR1-fwd	60	AGGACAGTGAGGCTGCCTTG	qRT-PCR del mRNA *OsPHR1*
OsPHR1-rvs	58	GGACTCGGTTGCTGCAGTTT	
OsPHO2-fwd	55	CACAAGCCACCAAAGCATTTC	qRT-PCR del mRNA *OsPHO2*
OsPHO2-rvs	57	AGATCGCCGCCGAGATAAG	

OsPT2-fwd	58	GACGAGACCGCCCAAGAAG	qRT-PCR del mRNA *OsPT2*
OsPT2-rvs	59	TTTTCAGTCACTCACGGTCGAGAC	
OsPT6-fwd	58	CCGCCCCTGCAAACTGTA	qRT-PCR del mRNA *OsPT6*
OsPT6-rvs	56	CAACTGGCGGTTTCTTCGAT	
OsPAP10-fwd	61	ATACTGGCAGCCGACGGATGA	qRT-PCR del mRNA *OsPAP10*
OsPAP10-rvs	61	GAGGGAGCTGGAGCGGAGAA	
OsPHR2-fwd	58	TCTCTCCAAGATGTGGACCCA	qRT-PCR del mRNA *OsPHR2*
OsPHR2-rvs	55	CCGTGAAAAGGCAAAAACGAT	
OsSPL4-fwd	60	TTCCATTTTGCAGGTCCGGA	qRT-PCR del mRNA *OsSPL4*, el amplicón incluye el sitio de
OsSPL4-rvs	60	GCCTGTGAATTGGATGACGC	apareamiento con osa-miR535-5p
OsSPL11-fwd	60	GCTCTTGCCAATAAAAGGTGCA	qRT-PCR del mRNA *OsSPL11*, el amplicón incluye el sitio de
OsSPL11-rvs	60	AAGATGTTTGGTGTCCGGGG	apareamiento con osa-miR535-5p
OsSPL12-fwd	56	CTGCAACCCCAGGATTTATT	qRT-PCR del mRNA *OsSPL12*, el amplicón incluye el sitio de
OsSPL12-rvs	60	CAGCTCATTCCCAAGACGAGT	apareamiento con osa-miR535-5p
OsSPL19-fwd	60	CCAACATTACCACAACCCGC	qRT-PCR del mRNA *OsSPL19*, el amplicón incluye el sitio de
OsSPL19-rvs	57	TCTGCTGAAAGAAGAGGGG	apareamiento con osa-miR535-5p
OsSIK1-fwd	57	CAGAAGTTGGAGAGTCTGACT	qRT-PCR del mRNA *OsSIK1*, el amplicón incluye el sitio de
OsSIK1-rvs	59	TGTCCAAGTTGATGATGTGACC	apareamiento con osa-miR390-5p
OsWAK43-fwd	57	CCAAAGGAACACCAGGGTAT	qRT-PCR del mRNA *OsWAK43*, el amplicón incluye el sitio de
OsWAK43-rvs	60	TCCTATCTTTTGACAGCGGCT	apareamiento con osa-miR390-5p
OsRLK5-fwd	60	GGCCGGCTTTCACCAAATTT	qRT-PCR del mRNA *OsRLK5*, el amplicón incluye el sitio de
OsRLK5-rvs	59	AGTGGACAGACTGAGCTTTACA	apareamiento con osa-miR390-5p
OsBAK-fwd	60	TATGCACGTACTCTGGTGGC	qRT-PCR del mRNA *OsBAK*, el amplicón incluye el sitio se
OsBAK-rvs	60	TCTCCGGTGCAGTTGAAACA	apareamiento con osa-miR390-5p
OsLAC12/13-fwd	60	CGGGAAGACGTACATGCTGA	qRT-PCR de los mRNAs de *OsLAC12* y *OsLAC13*, el amplicón incluye el
OsLAC12/13-rvs	60	GTGGTTGGCGATGGAGAAGA	sitio de apareamiento con osa-miR397a/b
OsLAC26-fwd	60	GCTCTACAACTGCTCTGCCA	qRT-PCR del mRNA *OsLAC26*, el amplicón incluye el sitio de
OsLAC26-rvs	60	GGCGATGGAGAAGAAGAGCT	apareamiento con osa-miR397a/b
OsLTPL6-fwd	54	ACTGTTGTGGATGGAAGAGG	qRT-PCR del mRNA *OsLTPL6*, diseñados en el fragmento de
OsLTPL6-rvs	57	CCACCCTATCTACTCCCATCCT	degradación 5', fuera del sitio de apareamiento con osa-miR1319a
osa-miR390-5p-fwd	62	CGCGGAAGCTCAGGAGGGAT	Stemloop qRT-PCR de osa-miR390-5p
osa-miR397a/b-fwd	62	CGGCGTCATTGAGTGCAGCG	Stemloop qRT-PCR de osa-miR397a/b
osa-miR535-5p-fwd	61	CGCGGGTGACAACGAGAGAGA	Stemloop qRT-PCR de osa-miR535-5p
osa-miR1319a-fwd	61	CGCGGGAACCGGCATCTGTAATAT	Stemloop qRT-PCR de osa-miR1319a
osa-miR5808-fwd	62	CGCGGGTGACAACGAGAGAGA	Stemloop qRT-PCR de osa-miR5808
ath-miR390a/b-fwd	62	CGCGGAAGCTCAGGAGGGAT	Stemloop qRT-PCR de ath-miR390a/b
ath-miR397a/b-fwd	62	CGGCGTCATTGAGTGCAGCG	Stemloop qRT-PCR de ath-miR397a/b
SLuniv-qRT-rvs	62	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT	qRT-PCR de miRNAs obtenidos por Stemloop RT

Tabla 17. Plásmidos, vectores y construcciones

Nombre	Representación	Utilización y características relevantes
pGEM-TEasy®		Clonación de productos de PCR por el sistema de clonaje T/A . Amp^R. Promega™.
pENTR3C®		Clonación de fragmentos de DNA mediante restricción. Contiene sitios de recombinación attR del sistema Gateway®. Cm^R, *ccdB*, Kan^R. Invitrogen™.
pCAMBIA1300®	pC:p35S:*hptII*:t35S	Clonación de fragmentos de DNA obtenidos por restricción. Vector binario de expresión en plantas utilizado para transformación mediante *A. tumefaciens*. Kan^R, Hyg^R. CAMBIA™.
pGWB541	pGW:p35S:*CFP*:tNos	Clonación de fragmentos de DNA mediante recombinación por el sistema Gateway®. Posee los sitios de recombinación homóloga attL. Permite realizar fusiones con la proteína fluorescente CFP en la C-terminal de la proteína de interés. Cm^R, *ccdB*, Spc^R, Hyg^R. Cedido por el Dr. Nakagawa, Center for Integrated Research in Science, Japón.
pGWB544	pGW:p35S:*YFP*:tNos	Clonación de fragmentos de DNA mediante recombinación por el sistema Gateway®. Posee los sitios de recombinación homóloga attL. Permite realizar fusiones con la proteína fluorescente YFP en la C-terminal de la proteína de interés. Cm^R, *ccdB*, Spc^R, Hyg^R. Cedido por el Dr. Nakagawa, Center for Integrated Research in Science, Japón.
pCAMBIAUbiNos	pC:p*Ubi*:t*Nos*	Clonación de los precursores de los miRNAs bajo el control del promotor *Ubi* y el terminador *Nos*.
pGWBOsCPK13CFP	pGW:p35S:*OsCPK13-CFP*:t*Nos*	Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* para expresión transitoria de la proteína fusión OsCPK13-CFP.
pGWBOsCPK13YFP	pGW:p35S:*OsCPK13-YFP*:t*Nos*	Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* para expresión transitoria de la proteína fusión OsCPK13-YFP.
pGEMTCPK13	pG:*OsCPK13*	Secuencia codificante completa para la proteína OsCPK13 sin el codón de parada y con los sitios BamHI y XhoI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pENTRCPK13	pE:*OsCPK13*	Secuencia codificante completa para la proteína OsCPK13 sin el codón de parada clonada por los sitios BamHI y XhoI en el plásmido pENTR3C®.
pGEMTMIR390	pG:*osa-MIR390*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR390* con los sitios BamHI y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pGEMTMIR397a	pG:*osa-MIR397a*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR397a* con los sitios BglII y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pGEMTMIR397b	pG:*osa-MIR397b*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR397b* con los sitios BamHI y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.

pGEMTMIR535	pG:*osa-MIR535*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR535* con los sitios BamHI y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pGEMTMIR1319a	pG:*osa-MIR1319a*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR1319a* con los sitios BamHI y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pGEMTMIR1847	pG:*osa-MIR1847*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR1847* con los sitios BamHI y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pGEMTMIR5808	pG:*osa-MIR5808*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR5808* con los sitios BglII y SmaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, clonada en el plásmido pGEM-Teasy®.
pCAMBIAMIR390	pC:p*Ubi*:*osa-MIR390*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR390* clonada por los sitios BamHI y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.
pCAMBIAMIR397a	pC:p*Ubi*:*osa-MIR397a*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR397a* clonada por los sitios BglII y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.
pCAMBIAMIR397b	pC:p*Ubi*:*osa-MIR397b*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR397b* clonada por los sitios BamHI y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.
pCAMBIAMIR535	pC:p*Ubi*:*osa-MIR535*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR535* clonada por los sitios BamHI y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.
pCAMBIAMIR1319a	pC:p*Ubi*:*osa-MIR1319a*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR1319a* clonada por los sitios BamHI y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.
pCAMBIAMIR1847	pC:p*Ubi*:*osa-MIR1847*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR1847* clonada por los sitios BamHI y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.
pCAMBIAMIR5808	pC:p*Ubi*:*osa-MIR5808*:t*Nos*	Secuencia completa del precursor *osa-MIR5808* clonada por los sitios BglII y SmaI en el plásmido pCAMBIAUbiNos.

7. Medios de cultivo

Bacterias

Medio LB: utilizado para el crecimiento de *E. coli*

Triptona:	10 g/l
Extracto de levadura:	5 g/l
NaCl:	10 g/l
Agar (para medio sólido):	15 g/l
pH (ajustado con NaOH):	7,5
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio SOB: medio utilizado para la recuperación de células transformadas

Triptona:	2%
Extracto de levadura:	0,5%
NaCl:	10 mM
KCl:	2,5 mM
$MgCl_2$:	10 mM
$MgSO_4$:	10 mM
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio YEB: utilizado para el crecimiento de *A. tumefaciens*

Extracto de carne:	5 g/l
Extracto de levadura:	1 g/l
Peptona:	5 g/l
Sacarosa:	5 g/l
$MgSO_4$:	0,48 g/l
Agar (para medio sólido):	15 g/l
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio MI: utilizado para la infiltración de células de *A. tumefaciens*

$MgCl_2$:	10 µM
MES:	10 µM
Acetosiringona	0,15 µM

Antibióticos: suplemento de los medios de crecimiento de bacterias

Cloranfenicol:	30 µg/l
Kanamicina:	50 µg/l
Carbenicilina:	100 µg/l
Rifampicina:	100 µg/l
Espectinomicina:	100 µg/l

Hongos

Medios PDA y PDB: utilizado para el crecimiento de *F. verticillioides*

Potato dextrose broth (Difco):	24 g/l
Agar (para medio sólido):	15 g/l
Cloranfenicol:	30 mg/l
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio CMA: utilizado para el crecimiento de *M. oryzae*

Glucosa:	10 g/l
Peptona:	2 g/l
Extracto de levadura:	1 g/l
Casaminoácidos:	1 g/l
$NaNO_3$:	6 g/l
KCl:	0,52 g/l
$MgSO_4.7H_2O$:	0,52 g/l
KH_2PO_4:	1,52 g/l
$ZnSO_4.7H_2O$:	22 mg/l
H_3BO_3:	11 mg/l
$MnCl_2.4H_2O$:	5 mg/l
$FeSO_4.7H_2O$:	5 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	1,7 mg/l
$CuSO_4.2H_2O$:	1,6 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	1,5 mg/l
Na_2EDTA:	50 mg/l
Biotina:	0,1 mg/l
Piridoxina:	0,1 mg/l
Tiamina:	0,1 mg/l
Riboflavina:	0,1 mg/l
Ácido p-aminobenzóico:	0,1 mg/l
Ácido nicotínico:	0,1 mg/l
Agar (para medio sólido):	15 g/l
pH (ajustado con NaOH):	6,5
Cloranfenicol:	30 mg/l
Autoclavado durante 20 minutos	

Plantas

Medio Agar-kinetina: utilizado en ensayos de infección de hoja cortada de arroz

Agar:	10 g/l
Kinetina:	2 mg/l
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio MS (Murashige & Skoog, 1962): utilizado para el crecimiento *in vitro*

Una solución de:	
NH_4NO_3:	1,65 g/l
KCl:	170 mg/l
KNO_3:	1,9 g/l
$CaCl_2.2H_2O$:	440 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	370 mg/l
$MnSO_4.7H_2O$:	6,2 mg/l
H_3BO_3:	22,3 mg/l
KI:	0,83 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	0,25 mg/l
$CuSO_4.5H_2O$:	0,025 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	0,025 mg/l
Ácido nicotínico:	0,5 mg/l
Piridoxina HCl:	0,5 mg/l
Tiamina HCl:	0,1 mg/l
Mio-inositol:	100 mg/l
Glicina:	2 mg/l
O en su lugar:	
MS (Duchefa):	4,4g/l
Junto con:	
Agar:	8 g/l
Sacarosa:	30 g/l ó 10 g/l ó 0 g/l
Higromicina (medio selectivo):	50 mg/l
pH (ajustado con KOH):	5,8
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio NB y NB selectivo: para el proceso de transformación de callos de arroz

KNO_3:	2,83 g/l
$(NH_4)_2SO4$:	463 mg/l
KH_2PO_4:	400 mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	165 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	185 mg/l
$MnSO_4.2H_2O$:	10 mg/l
H_3BO_3:	3 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$:	2 mg/l
KI:	0,75 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	0,25 mg/l
$CuSO_4.2H_2O$:	0,025 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	0,025 mg/l
Na_2EDTA:	3,72 mg/l

$FeSO_4.7H_2O$:	27,8 mg/l
Piridoxina:	1 mg/l
Tiamina:	10 mg/l
Ácido nicotínico:	1 mg/l
Sacarosa:	30 g/l
L-Prolina:	0,5 g/l
L-Glutamina:	0,5 g/l
Caseína hidrolizada:	0,3 g/l
Mio-inositol:	100 mg/l
2,4 D:	2,5 mg/l
Phytagel (NB no selectivo):	2,6 g/l
Agarosa (NB selectivo):	7 g/l
Cefotaxima (NB selectivo):	400 mg/l
Vancomicina (NB selectivo):	100 mg/l
Higromicina (NB selectivo):	50 mg/l
pH:	5,8 (no selectivo) 6 (selectivo)
Filtrado con Sterivex® 0,22um	

Medio R2 (líquido y sólido) y R2 selectivo: para transformación de callos de arroz

KNO_3:	4 g/l
$(NH_4)_2SO_4$:	330 mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	146 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	246 mg/l
$NaH_2PO_4.H_2O$:	312 mg/l
$MnSO_4.2H_2O$:	1,6 mg/l
H_3BO_3:	2,83 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$:	2,2 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	0,125 mg/l
$CuSO_4.2H_2O$:	0,2 mg/l
Na_2EDTA:	1,8 mg/l
$FeSO_4.7H_2O$:	12,5 mg/l
Tiamina:	1 mg/l
Glucosa (R2 sólido y líquido):	10 g/l
Sacarosa (R2 selectivo):	30 g/l
2,4 D:	2,5 mg/l
Acetosiringona:	19,62 mg/l
Agarosa (R2 sólido y selectivo):	7 g/l
Cefotaxima (NB selectivo):	400 mg/l
Vancomicina (NB selectivo):	100 mg/l
Higromicina (NB selectivo):	50 mg/l
pH:	5,2 (no selectivo) 6 (selectivo)
Filtrado con Sterivex® 0,22um	

Medio P-RN: medio utilizado en el proceso de transformación de callos de arroz

KNO_3:	2,83 g/l
$(NH_4)_2SO_4$:	463 mg/l
KH_2PO_4:	400 mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	165 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	185 mg/l

$MnSO_4.2H_2O$:	10 mg/l
H_3BO_3:	3 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$:	2 mg/l
KI:	0,75 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	0,25 mg/l
$CuSO_4.2H_2O$:	0,025 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	0,025 mg/l
Na_2EDTA:	3,72 mg/l
$FeSO_4.7H_2O$:	27,8 mg/l
Piridoxina:	1 mg/l
Tiamina:	10 mg/l
Ácido nicotínico:	1 mg/l
Sacarosa:	30 g/l
L-Prolina:	0,5 g/l
L-Glutamina:	0,5 g/l
Caseína hidrolizada:	0,3 g/l
Mio-inositol:	100 mg/l
Agarosa:	7 g/l
Cefotaxima:	400 mg/l
Vancomicina:	100 mg/l
Higromicina:	50 mg/l
Benzilaminopurina:	2 mg/l
Ácido naftalen-acético:	0,1 mg/l
Ácido absícico:	2,5 mg/l
pH:	5,8
Filtrado con Sterivex® 0,22um	

Medio RN: medio utilizado en el proceso de transformación de callos de arroz

KNO_3:	2,83 g/l
$(NH_4)_2SO_4$:	463 mg/l
KH_2PO_4:	400 mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	165 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	185 mg/l
$MnSO_4.2H_2O$:	10 mg/l
H_3BO_3:	3 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$:	2 mg/l
KI:	0,75 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	0,25 mg/l
$CuSO_4.2H_2O$:	0,025 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	0,025 mg/l
Na_2EDTA:	3,72 mg/l
$FeSO_4.7H_2O$:	27,8 mg/l
Piridoxina:	1 mg/l
Tiamina:	10 mg/l
Ácido nicotínico:	1 mg/l
Sacarosa:	30 g/l
L-Prolina:	0,5 g/l
L-Glutamina:	0,5 g/l
Caseína hidrolizada:	0,3 g/l

Mio-inositol:	100 mg/l
Phytagel:	3,5 g/l
Benzilaminopurina:	2 mg/l
Ácido naftalen-acético:	0,1 mg/l
pH:	5,8
Filtrado con Sterivex® 0,22um	

Medio P: medio utilizado para el enraizamiento de plantas de arroz transformadas

MS (Duchefa):	4,4 g/l
Phytagel (NB no selectivo):	2,6 g/l
Sacarosa:	50 g/l
pH:	5,8
Autoclavado durante 20 minutos	

Medio Yoshida: medio utilizado para crecimiento hidropónico de plantas de arroz

NH_4NO_3:	114,3 mg/l
K_2SO_4:	89,4 mg/l
KH_2PO_4:	115,5 mg/l
K_2HPO_4:	21,4 mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	110,8 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	405,2 mg/l
$MnCl_2.4H_2O$:	1,88 mg/l
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H2O$:	0,093 mg/l
H_3BO_3:	1,17 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$:	0,044 mg/l
$CuSO_4.2H_2O$:	0,039 mg/l
FeNaEDTA:	13,12 mg/l
pH:	5
Autoclavado durante 20 minutos	

Sustrato de arroz

El sustrato es una mezcla de turba y vermiculita a razón de 1:1. Por cada kg de esta mezcla se agrega 1 g de $CaCO_3$ y 1 g de fertilizante 15-15-15. Se humedece y se deja reposar sin autoclavar durante 1 semana. La turba corresponde a una turba clara de Sphangum, con pH 3,5; materia orgánica de 96% y contenido de N total de 1%. El fertilizante 15-15-15 está formulado con 15% de nitrógeno total (nítrico, amoniacal y uréico), 15% de anhídrico fosfórico (P_2O_5) y 15% de óxido de potasio (K_2O).

Solución nutritiva de fertirrigación de arroz

KNO_3:	14 mg/l
NH_4NO_3:	1,6 mg/l
K_2HPO_4:	3,5 mg/l
KH_2PO_4:	8,2 mg/l
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$:	9,9 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	2,8 mg/l

$FeSO_4.7H_2O$:	2,7 mg/l
Kelamix (Fe-EDDHA):	35 mg/l
Microelementos:	0,4 g/l

(B 0,005%; Cu 0,001%; Fe 0,012%; Zn 0,004%; Mo 0,005%; Mn 0,005% quelados por EDTA)

8. Soluciones y tampones

TE

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	5 mM

PBS 20X

$NaPO_4.H_2O$	16 mM
$Na_2HPO_4.2H_2O$	84 mM
NaCl	1,5 M

PBST

PBS	1X
Tween	0,1%

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato trisódico	0,3 M

TBE 10X

Tris-HCl	0,089 M
Ácido bórico	0,089 M
EDTA	0,002 M

MEN 10X

MOPS	200 mM
NaAc	50 mM
EDTA	10 mM
BSA	20 g/l

Solución desnaturalizante

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Solución neutralizante

Tris-HCl	0,5 M
NaCl	1,5 M
pH (ajustado con HCl)	8,0

Solución TBF1

KOAc	30 mM
$MnCl_2.4H_2O$	50 mM

$CaCl_2.2H_2O$	10 mM
RbCl	100 mM
Glicerol	15%
Esterilizado por filtración	

Solución TBF2

MOPS pH 7	10 mM
$CaCl_2.2H_2O$	75 mM
RbCl	10 mM
Glicerol	15%
Esterilizado por filtración	

Tampón MATAB

TRIS-HCl pH 8	100 mM
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
MATAB	2%
PEG 6000	1%
$NaSO_3$	0,5%

Tampón de extracción de proteínas

Hepes pH 7,4	50 mM
EGTA	5 mM
EDTA	5 mM
NaF	10 mM
Na_3VO_4	10 mM
B-glicerofosfato	50 mM
DTT	5 mM
Leupepstatina	60 µM
Pepstatina	1 µM
Aprotinina	10 µM
E-64	10 µM
PMSF	1 mM
Inhibidores de proteasas (Sigma™)	1/500

Tampón de elución de proteínas

Hepes pH 7,4	20 mM
NaF	10 mM
Na_3VO_4	10 mM
B-glicerofosfato	50 mM
Leupepstatina	60 µM
Pepstatina	1 µM
Aprotinina	10 µM
E-64	10 µM
PMSF	1 mM
Inhibidores de proteasas (Sigma™)	1/500
Tampón fosfato-Na^+pH 7,5	20 mM
Tritón	1%

$MgCl_2$	1 mM

Tampón de gel separador de proteínas (Lower)

Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4%

Tampón de gel concentrador de proteínas (Upper)

Tris-HCl pH 6,5	0,5 M
SDS	0,4%

Tampón de electroforesis de proteínas

Tris-HCl	0,25 M
Glicina	1,92 M
SDS	10%
pH	8,3-8,8

Tampón GUS

Ferricianuro potásico	100 µM
Ferrocianuro potásico	100 µM
EDTA pH 8	10 mM
X-Gluc	1 mg/ml
Tampón fosfato pH 7,5	50 mM
N,N dimetilformamida	1%

Tampón de carga para DNA 6X

Glicerol	30%
Azul de bromofenol	0,25%
Xileno cianol	0,25%
EDTA	0,5 M

Tampón de carga para RNA 2X

Tampón de carga para DNA 6X	20%
Formamida desionizada	50%
Formaldehído	6,4%
MEN 10X	10%
Bromuro de etidio	200 µg

Tampón de carga para proteínas 2X

Tris	125 mM
Glicerol	20%
SDS	4%
Bromophenol	0.04%
DTT	10%

Tampón de transferencia para proteínas

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
Metanol	20%

SDS	1,3 mM
pH	9-9,4

Rojo Ponceau

Rojo Ponceau	0,1%
Ac. Acético	1%

RNAsa

Tris-HCl	10 mM
NaCl	15 mM
Ribonucleasa A	10 mg/ml

Métodos

1. Métodos generales

Las técnicas generales de manipulación y análisis de ácidos nucleicos y proteínas se han realizado siguiendo los manuales *Molecular cloning: A laboratory manual* (Sambrook & Russell, 2001) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 2003). Se incluyen otras metodologías específicas o técnicas que se han puesto a punto en el transcurso de este trabajo que han sido fundamentales para la obtención de los resultados presentados.

2. Obtención y análisis de ácidos nucleicos

Todos los ácidos nucleicos fueron comprobados en calidad y cantidad mediante geles de electroforesis de agarosa y medición por espectrofotometría en un aparato Nanodrop® de Thermo Fischer™.

2.1 Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos y análisis de recombinantes

2.1.1 Obtención de DNA plasmídico de bacterias

Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala se utilizó el kit para midipreparaciones Genopure® de Roche™ siguiendo las instrucciones del fabricante y en caso de extracción de DNA plasmídico en escala pequeña se utilizó el kit de minipreparaciones High Pure Plasmid Isolation® de Roche™ según el protocolo indicado por el mismo, partir de 50-200 ml y de 5 ml de cultivo respectivamente. El DNA resultante es de alta pureza y libre de DNAsas.

2.1.2 Modificación de DNA: digestión por enzimas de restricción y ligación

Se han realizado las reacciones de digestión de DNA con endonucleasas de restricción y ligaciones teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes de las enzimas comerciales.

2.1.3 Clonación de fragmentos por recombinación homóloga mediante el sistema Gateway®

Las clonaciones en el plásmido que contiene los sitios de recombinación homóloga pENTR3C se ha realizado por medio de enzimas de restricción. Se han realizado clonaciones por recombinación homóloga mediante el sistema Gateway® de Invitrogen™ desde el

plásmido pENTR3C, que contiene los sitios de recombinación homóloga *attL* al vector pGWB541 o pGWB544 (Nakagawa *et al.*, 2007), que contienen los sitios *attR*, mediante la enzima recombinasa LR de Invitrogen™, según las recomendaciones del fabricante.

2.1.4 Purificación de DNA

Para la purificación de fragmentos de DNA separados por electroforesis en geles de agarosa se ha utilizado el kit de purificación High Pure PCR Product Purification® de Roche™, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.5 Clonación de fragmentos de DNA por sistema T/A

Las clonaciones de fragmentos purificados de DNA se realizó por el sistema T/A utilizando el kit pGEM-TEasy® de Promega™, siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.1.6 Preparación de células competentes de *E. coli*

Se prepararon células listas para ser transformadas siguiendo el siguiente protocolo en esterilidad:

- Inocular una colonia de *E. coli* proveniente de una placa fresca en 5 ml de medio LB.
- Incubar durante 16 horas a 37ºC con agitación orbital constante de 250 rpm.
- Inocular 250 ml de medio LB con 2,5 ml del cultivo inicial en un Erlenmeyer de 1 litro.
- Incubar el cultivo a 37ºC con agitación de 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{(600nm)}$ de 0,5-1,0.
- Enfriar el cultivo en hielo durante 15 minutos y transferir el mismo a tubos de centrífuga previamente enfriados en hielo.
- Centrifugar en frío (4ºC) durante 10 minutos a 4000 rpm, con frenado suave.
- Descartar sobrenadante y resuspender las células precipitadas suavemente en 50 ml de solución fría de TFB1. Incubar esta suspensión de células 10 minutos a 4ºC.
- Centrifugar a 4ºC por 10 minutos a 4000 rpm.
- Descartar sobrenadante y resuspender las células suavemente en 5 ml de solución fría de TFB2.
- Preparar alícuotas de 100 µl de esta suspensión de células en microtubos y congelar inmediatamente en N_2 líquido. Se conservan las células a -80ºC.

2.1.7 Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*

- Inocular una colonia de *A. tumefaciens* proveniente de una placa fresca en 5 ml de medio LB.
- Incubar durante 16 horas a 28ºC con agitación orbital constante de 250 rpm.
- Inocular 100 ml de medio YEB con 2 ml del cultivo inicial.
- Incubar el cultivo a 28ºC con agitación de 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{(600nm)}$ de 0,5-1,0.
- Enfriar el cultivo en hielo durante 15 minutos y transferir el mismo a tubos de centrífuga previamente enfriados en hielo.
- Centrifugar en frío (4ºC) durante 5 minutos a 4500 rpm, con frenado suave.
- Descartar sobrenadante y resuspender las células precipitadas suavemente en 1 ml de solución fría de $CaCl_2$ a 20mM.
- Preparar alícuotas de 100 µl de esta suspensión de células en microtubos y congelar inmediatamente en N_2 líquido. Se conservan las células a -80ºC.

2.1.8 Transformación de células competentes bacterianas

Se añade 1 µg de DNA plasmídico o el producto total de una reacción de ligación de DNA a una alícuota de 100 µl de células competentes y se congela inmediatamente en N_2 líquido. El protocolo difiere a partir de este paso según cada bacteria:

E. coli:

- Luego del congelamiento se mantener las células a 37ºC durante 5 minutos, agregar 1 ml de medio SOB e incubar las células a 37ºC durante 1 hora en agitación.
- Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, descartar sobrenadante y resuspender las células en 100 µl de medio SOB.
- Sembrar las células en placas de Petri con medio LB sólido y con los antibióticos de selección de la cepa bacteriana y los plásmidos con los que se han transformado.

A. tumefaciens:

- Luego del congelamiento se mantener las células a 37ºC durante 5 minutos, agregar 1 ml de medio YEB e incubar las células a 28ºC durante 2-4 horas en agitación.
- Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, descartar sobrenadante y resuspender las células en 100 µl de medio YEB.

- Sembrar las células en placas de Petri con medio YEB sólido y con los antibióticos de selección de la cepa bacteriana y los plásmidos con los que se han transformado.

2.2 Extracción de DNA genómico vegetal

Se extrajo el DNA genómico de muestras vegetales según el protocolo descrito por Murray y Thompson (1980) con ligeras modificaciones.

- Triturar el tejido con mortero en N_2 líquido y pasar aproximadamente 100 mg a tubos de polipropileno junto con bolas de cristal de 2 mm.
- Con el objetivo de obtener una mejor extracción, triturar las muestras en nitrógeno líquido por medio de TissueLyser® siguiendo las instrucciones del fabricante Quiagen™.
- Agregar 600 µl de tampón de extracción MATAB (mixed alkyltrimethylammonium bromide - Sigma®) A 72ºC e incubar 1 hora a esa temperatura, homogeneizando por vortex cada 15 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir 600 µl de una dilución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v). Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 5 µl de RNAsa. Incubar durante 30 minutos a 37ºC.
- Agregar 600 µl de isopropanol, centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Añadir 400 µl de etanol al 70%, vortear y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
- Descartar el sobrenadante, secar el pellet y resuspenderlo en 50 µl de agua mQ estéril. El DNA genómico es conservado a 4ºC para utilización a corto término y a -20ºC para conservación por periodos largos.

2.3 Extracción, manipulación y análisis de RNA de plantas

2.3.1 Extracción de RNA total de tejidos vegetales

El protocolo de extracción de RNA con Trizol® se basó en el descrito por la casa comercial, descrito a continuación.

- Triturar el tejido con mortero en N_2 líquido y pasar aproximadamente 100 mg a tubos de polipropileno junto con bolas de cristal de 2 mm.

- Con el objetivo de obtener una mejor extracción, triturar las muestras en nitrógeno líquido por medio de Tissue Lyser® siguiendo las instrucciones del fabricante Quiagen™.
- A las muestras aún congeladas agregar 1 ml de Trizol®, homogeneizar con vortex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 200 µl de cloroformo, homogeneizar por inversión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 4ºC durante 15 minutos y a 13000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante, añadir 500 µl de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 4ºC durante 15 minutos y a 13000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75%.
- Centrifugar a 4ºC durante 5 minutos y a 13000 rpm. Dejar secar el pellet y resuspenderlo en 50 µl de agua mQ estéril.
- Incubar la solución de RNA a 65ºC durante 5 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante.
- Precipitar el RNA con 125 µl de etanol absoluto y 5 µl de acetato sódico 3M pH 5,5 durante toda la noche a -20ºC.
- Centrifugar a 4ºC durante 20 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 200 µl de etanol al 70%, secarlo y resuspenderlo en 50 µl de agua mQ estéril. El RNA total es conservado a -20ºC para utilización a corto término y a -80ºC para conservación por periodos largos.
- En el caso de extracción de RNA de tejidos radiculares de plantas de arroz crecidas en tierra, las muestras de RNA se purificaron además en columnas del kit PureLink® de Ambion™.

2.3.2 Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida

En este trabajo se realizaron trabajos relacionados principalmente con miRNAs, por lo que se utilizaron geles de poliacrilamida para la electroforesis de RNA. Este sistema permite que el RNA que ingrese dentro del tramaje del gel sea sólo de pequeño tamaño.

Los geles desnaturalizantes utilizados para la electroforesis de RNA fueron de 1,5 mm con una concentración de poliacrilamida al 17,5%. Los aparatos utilizados fueron los de Miniprotean® de Biorad™ o Hoefer SE 400™. La composición de los geles fue la siguiente para un total de 25 ml:

Urea:	10,5 g
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1):	10,92 ml
TBE 5X:	2,5 ml
APS 10%:	200 µl
TEMED:	9,16 µl

Las muestras de RNA (total de 10-100 µg) se prepararon con formamida al 50% y el tampón de carga para miRNAs a 1X. La migración del RNA se realizó en tampón TBE 0,5X a un voltaje de 100-120V durante aproximadamente 2 horas (Miniprotean®) o a 180-200V durante 6 horas (Hoefer™).

2.3.3 Transferencia de RNA a un soporte inerte – *Northern blot*

El RNA se transfiere a una membrana de nylon Nytran® de Whatman™ utilizando el sistema de electrotransferencia semiseca XCell Sure Lock ® de Invitrogen™ o Transblot Semi-dry® de Biorad™, siguiendo las instrucciones de los fabricantes y con tampón TBE 0,5X durante aproximadamente 1 hora a 300 mA. Luego de la transferencia se fija el RNA en la membrana con 1200 J, por medio de un crosslinker.

2.3.4 Marcaje radiactivo y purificación de sondas

El DNA utilizado como sonda de hibridación de microRNAs (21-24 nt) es un oligonucleótido. Para el marcaje radiactivo de estas sondas de hibridación se utilizaron 2 µl de oligonucleótido (10 µM) y el kit comercial de T4 Polynucleotide Kinase® siguiendo las indicaciones del fabricante. El marcaje se realizó en un volumen final de 50 µl, utilizando 5 µl del isótopo radiactivo γATP^{32} durante 1 hora a 37ºC. La sonda se purificó para eliminar la radiactividad no incorporada mediante columnas Probe Quant™ G-25 (Amersham) según instrucciones del fabricante. A continuación, y previo a la hibridación, la sonda se desnaturaliza incubándola durante 10 minutos a 95ºC.

2.3.5 Hibridación de membranas de RNA

- *Pre-hibridación*: previamente a la hibridación con la sonda radiactiva la membrana debe ser embebida en 5 ml de la solución de hibridación e incubada durante 1-6 horas a 37ºC en agitación suave. En este trabajo se utilizó la solución comercial PerfectHyb® plus de Sigma™.
- *Hibridación*: Añadir a la solución de hibridación la sonda marcada radiactivamente e incubar a 37ºC durante 1-3 días.
- *Lavados y exposición*: Se lavan las membranas 3 veces con una solución de SSC 2X y SDS 0,2% a 37ºC. Las membranas se sellan dentro de film de plástico, se exponen en una pantalla Phosphorimager® de Biorad™ y la imagen se visualiza en Storm 860® de GE™.

2.3.6 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se ha utilizado para los estudios de expresión génica mediante análisis de RT-PCR. Para ello se realiza una digestión con DNAsa previa a la retrotranscripción. La reacción de retrotranscripción de miRNAs maduros se realizó por medio de la técnica de *stemloop* RT, descrita por Chen *et al.* (2005), según las modificaciones realizadas indicadas a continuación.

- *Digestión con DNAsa*: Antes de comenzar la retrotranscripción del RNA mensajero hay que asegurarse de que no queden restos de DNA genómico en las muestras que puedan interferir en la PCR, digiriendo la preparación de RNA con DNAsa. Se utilizó el kit Turbo DNAFree® de Ambion™. Una mezcla de 10 µg de RNA total, 1 µL DNA-asa, 4 µL de tampón de DNAsa 10X se llevan a un volumen final de 40 µL con agua mQ estéril. Incubar a 37ºC durante 30 minutos y se inactiva la DNAsa durante 5 minutos a 70ºC. Precipitar con etanol antes y resuspender el RNA en 40 µL de agua mQ estéril.
- *Retrotranscripción (RT)*: Se utilizó o bien el kit High Capacity cDNA Reverse Trancription® de Life Technology™ o bien el kit Transcriptor First cDNA Synthesis® de Roche™ siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Generalmente se realizó la reacción con un total de 1 µg de RNA total con inhibidor de RNAsas y con oligo-dT

como cebador de la reacción para la síntesis a partir de los mRNA con colas de polyA.

- *Retrotranscripción de pequeños RNAs*: Los miRNA maduros son RNAs pequeños de 21-24 nucleótidos de largo, lo cuales son producto de un procesamiento pos-transcripcional, por lo que no poseen polyA y no sirven como molde para la síntesis de cDNAs en una reacción de RT típica a partir del cebador de oligo-dT. La técnica de *stemloop* RT se utilizó para sintetizar cDNA a partir de mRNAs y miRNAs maduros conjuntamente y se detalla en la Figura 73, así como la reacción de *stemloop* RT y los componentes que se utilizaron en este trabajo. Para la síntesis de cDNA total, incluídos los miRNAs, en ocasiones también fue utilizado el kit MiR-X® de Clontech™ según especificaciones del fabricante. La composición de la reacción de *stemloop* RT utilizada en este trabajo fue la siguiente:

RNA total:	1 µg
Cebador SL:	10 µM
Cebador oligoT:	10 µM
Enzima RT:	10 U
Inhibidor de RNAsas:	20 U
dNTPs:	10 mM
Tampón RT:	4 µl
Agua libre de nucleasas:	hasta 20 µl

2.4 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

La técnica de PCR se utilizó para amplificar fragmentos de DNA a partir de DNA genómico o de plásmidos recombinantes. También fue utilizada en estudios de expresión génica mediante RT-PCR y en confirmación de reacciones de RT.

Contenidos generales de los en las reacciones de PCR realizadas en este trabajo:

DNA	10-100 ng
Tampón PCR 10X	1X
$MgCl_2$	2,5 mM
dNTPs	200 µM
Cebadores	100 nM
Taq polimerasa	0,5 U

La Figura 74 muestra las condiciones generales de temperaturas, tiempos y ciclos para las PCR. Las mismas fueron optimizadas para cada reacción.

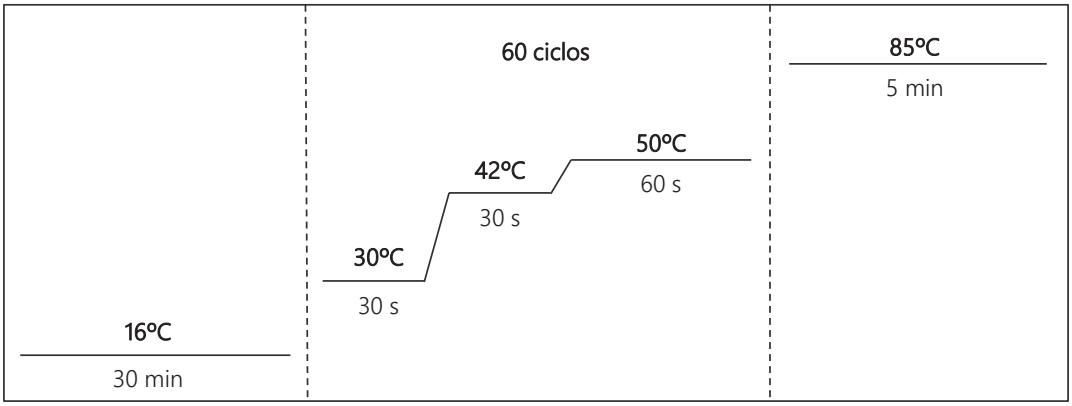

Figura 73. Protocolo de la reacción de *stemloop* RT.

2.5 PCR en tiempo real cuantitativa

En este trabajo se ha utilizado la técnica de PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) para estudios de expresión génica, en combinación con la reacción de síntesis de cDNA mediante retrotranscriptasa, es decir, de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

Los cebadores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real cuantitativa se diseñaron desde el sitio Primer3web (http://primer3.ut.ee/) siguiendo parámetros específicos como: aproximadamente 20 pb de largo, 45-55% de contenido de G y C, máximo 2 G o C en las 5 últimas bases en 3', mejor no tener G en 5', Tm de 55-72ºC pero óptimo de 60ºC y un amplicón de 70-150 pares de bases con una Tm máxima de 92ºC. Para las PCRs se utilizó como mezcla de reacción LightCycler 480® SYBRGreen Master de Roche™. Esta mezcla contiene ya todos los componentes necesarios para la reacción, solamente hay que añadir los cebadores de interés y el DNA problema. Las PCR se realizaron en 10 µL de volumen final con una concentración final de cada cebador de 300 nM. Para el análisis de la expresión se realiza generalmente una dilución 1:10 de los cDNA obtenidos y se utilizan 2 µL de la misma en cada reacción.

Para generar las curvas estándar con qué comparar las muestras problema se prepara una dilución seriada con cDNA (1:5, 1:20, 1:80, 1:320). Se utilizaron 2 µL en cada reacción. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un aparato LightCycler 480 II® de Roche™. Se realizan 40 ciclos de PCR utilizando el programa de PCR recomendado por el fabricante (Figura 75).

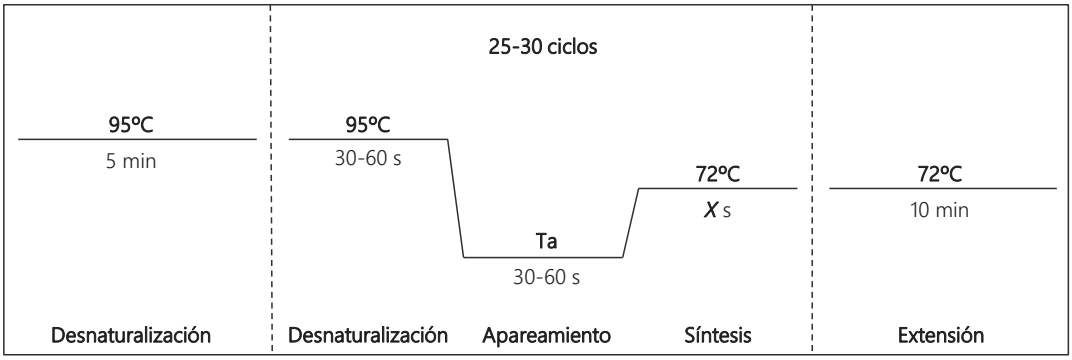

Figura 74. Condiciones generales para amplificación de fragmentos de DNA por PCR.

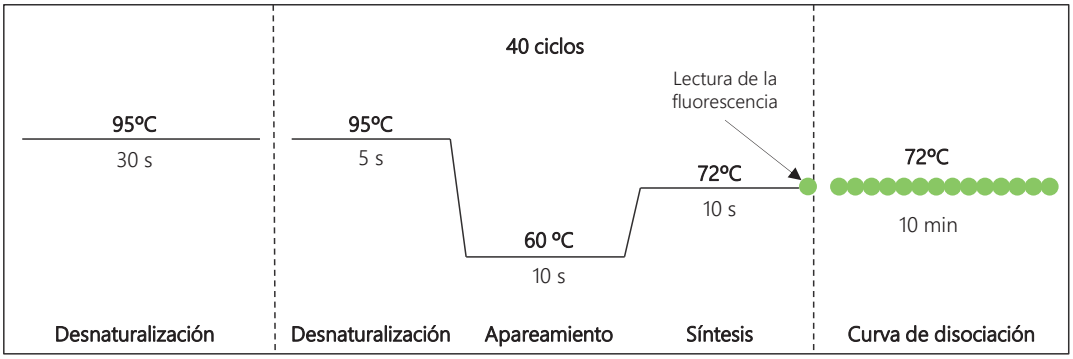

Figura 75. Protocolo de amplificación de fragmentos de cDNA por qPCR utilizando SybrGreen® de Roche™.

Los datos se analizan mediante el programa informático del mismo. Para el caso de miRNAs de muy baja expresión se realizó una segunda ronda de qRT-PCR utilizando como muestra una dilución de 1/10.000 del producto de la primera ronda (ej: osa-miR1319a), según el protocolo descrito por Mou *et al.* (2013). La técnica de *stemloop* qRT-PCR se ha validado con análisis *Northern blot* y se ha comprobado que los niveles de detección se corresponden, como se muestra en la Figura 76, donde se ven los análisis realizados en la detección de osa-miR1319a en las líneas transgénicas *osa-MIR1319a* #7, #16 y #18.

Cada muestra se analiza por triplicado en cada PCR tanto para el gen problema como para el gen de referencia. En cada placa incluye el control sin cDNA para cada pareja de cebadores, con tal de comprobar posibles contaminaciones. La cantidad relativa del cDNA problema en cada muestra se calcula comparando el valor de C_T de las muestras (valor C_T: número de ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa un valor umbral en la fase logarítmica de la curva de amplificación) con una recta patrón y se normaliza mediante el

valor obtenido para el gen constitutivo. Para utilizar el método de comparación de C_T se ha de validar primero la especificidad de los cebadores realizando una curva patrón para comprobar que la eficiencia de amplificación del cDNA problema es aproximadamente igual a la eficiencia de los cebadores del gen de referencia (Livak & Schmittgen, 2001).

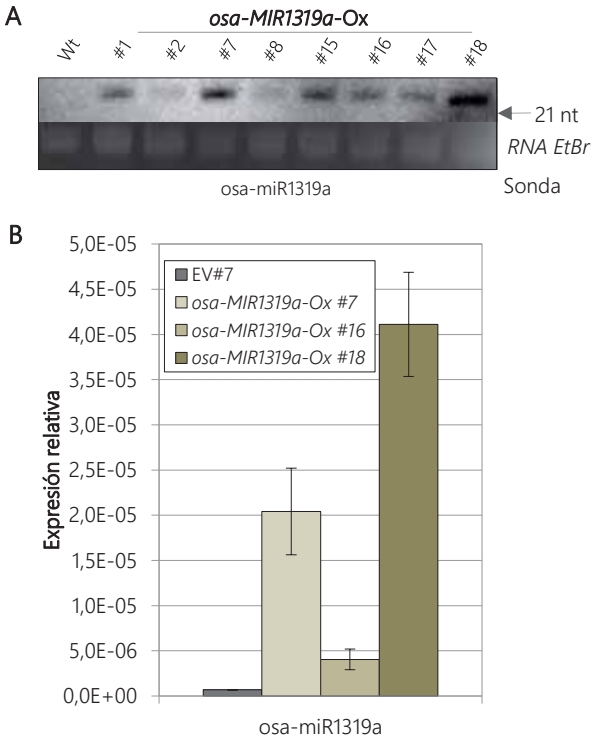

Figura 76. Validación de la técnica *stemloop* qRT-PCR mediante análisis *Northern blot*. A. Análisis *Northern blot* de la acumulación del miRNA osa-miR1319a. Los datos son los presentados en los resultados. **B.** Cuantificación por *stemloop* qRT-PCR de la acumulación de osa-miR1319a, según la metodología presentada y utilizando el mismo RNA que en (A).

2.6 Secuenciación y análisis de DNA

La secuenciación capilar se ha realizado utilizando la tecnología ABI 3730 DNA Analyzer® de Applied Biosystems™, en el servicio de secuenciación del CRAG. Para la búsqueda de homologías se consultaron las bases de datos KOME (*Knowlegde-based Oryza Molecular biological Enciclopedia*), GenBank, EMBL, SWISSPROT y Plaza utilizando el programa BLAST a través del servidor *Nacional Center for Biotechnology Information web site* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/) y del servidor de la base de datos KOME (http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/Wblast2.html). Los alineamientos de secuencias se han realizado utilizando el programa ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/).

3. Obtención y análisis de proteínas

3.1 Extracción de proteínas de tejidos vegetales

El protocolo de extracción de proteínas utilizado en este trabajo es el descrito a continuación.

- Triturar el tejido con mortero en N_2 líquido y pasar aproximadamente 200 mg a tubos de polipropileno.
- A las muestras aún congeladas agregar 400 µl de tampón de extracción de proteínas y homogeneizar con vortex.
- Centrifugar a 4ºC durante 15 minutos a 2000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y centrifugar a 4ºC durante 15 minutos a 13000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con ayuda de un baño de sonicación en 100 µl de tampón de elución de proteínas.
- Cuantificar el contenido de proteínas por el método descrito por Bradford (1976).

3.2 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

Los geles utilizados para la electroforesis de proteínas fueron de 1,5 mm con una concentración de poliacrilamida al 10%. Los aparatos utilizados fueron los de Miniprotean® de Biorad™. La composición de los geles fue la siguiente para 2 geles:

Gel separador (Lower):

Acrilamida:bis-acrilamida (37:1):	5 ml
Tampón separador:	5 ml
Agua mQ:	10 ml
APS 10%:	80 µl
TEMED:	10 µl

Gel concentrador (Upper):

Acrilamida:bis-acrilamida (37:1):	1 ml
Tampón concentrador:	2 ml
Agua mQ:	4,5 ml
APS 10%:	80 µl
TEMED:	20 µl

Los geles se preparan con ¾ de contenido de gel separador y ¼ de concentrador. Las muestras de proteínas se prepararon con el tampón de carga para proteínas a 1X. La

migración de las proteínas se realizó en tampón de electroforesis de proteínas a un voltaje de 100-120V hasta que lleguen al final del gel.

3.3 Transferencia de proteínas a un soporte inerte – *Western blot*

Las membranas deben equilibrarse previamente a la transferencia embebiéndose en el tampón de transferencia de proteínas 1X. Las proteínas se transfieren desde el gel de acrilamida por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa Hybond® de Amersham™. La transferencia se realiza en el XCell Sure Lock ® de Invitrogen™, siguiendo las instrucciones de los fabricantes y con tampón de transferencia de proteínas 1X. Las condiciones para la electrotransferencia son de 12 V durante 1 hora. Luego de la transferencia, desmontar la membrana, teñirla con rojo Ponceau y sacar una fotografía de las proteínas teñidas.

3.4 Inmunodetección de proteínas

Para realizar la inmunodetección de la proteína deseada, en este trabajo se siguió el siguiente protocolo.

- Lavar la membrana dos veces con PBST durante 5 minutos en agitación.
- Bloquear las membranas con una solución de leche en polvo (Sveltesse® de Molico™) al 10% en PBST durante 1 hora a 37ºC.
- Lavar con PBST durante 5 minutos en agitación.
- Incubar la membrana con el anticuerpo primario a la dilución necesaria (OsCPK13: 1/1000) diluída en PBST, durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con PBST.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario a una dilución 1/10000 (anti-conejo) diluída en PBST, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
- Lavar 4 veces la membrana con PBST durante 5 minutos en agitación.
- Revelar la membrana con los reactivos del kit Fast Western Blot Kit® de Thermo™, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
- Detectar la señal en un aparato ImageQuant LAS 4000® de GE™.

4. Crecimiento y manipulación de hongos patógenos

4.1 Crecimiento de *M. oryzae*

Esporas de *M. oryzae* del aislado de interés se inoculan en placas de CMA en condiciones de esterilidad y se mantienen en condiciones controladas de crecimiento a una temperatura de 25ºC y fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) durante 15 días para obtener una buena producción de esporas.

4.2 Crecimiento de *F. verticillioides* y *P. cucumerina*

Se inoculan esporas de *F. verticillioides* o de *P. cucumerina* en placas de PDA y se mantienen a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad durante 15 a 21 días.

4.3 Obtención de suspensiones de esporas de hongos

Bajo campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad se añaden 5 ml de agua mQ estéril a las placas donde ha crecido el hongo de interés. Se remueven las esporas con un ansa de vidrio para suspenderlas en el agua. Se toma el total de la suspensión y se filtran con papel de filtro miracloth. Se realiza el conteo de esporas utilizando la cámara de Neubauer o de Hausser y se diluye a la concentración necesaria. A la dilución a ser utilizada para ensayos de infección se agrega Tween® hasta una concentración de 0,02%.

5. Crecimiento, manipulación, análisis y tratamiento de plantas

5.1 Esterilización superficial y germinación de semillas de arroz

Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron: 14h/10h de fotoperiodo (luz/oscuridad); 60% de humedad y 28ºC de temperatura. Cuando las semillas no son sembradas directamente en tierra o se necesitan condiciones estériles de crecimiento, se procede de la siguiente manera:

- Descascarillar las semillas.
- Pasar las semillas a un tubo o similar y lavar con etanol 70% durante 3 minutos en agitación.
- Decantar el etanol y añadir una solución de hipoclorito sódico 30% (Carlo Erba™) y mantener en agitación durante 30 minutos.
- En campana de flujo laminar, decantar el hipoclorito sódico y seguidamente lavar con agua estéril repetidas veces.

- Las semillas pueden conservarse en agua estéril hasta 4h antes de proceder a sembrarlas en medio estéril.

Una vez esterilizadas, las semillas pueden sembrarse en el medio deseado. Como norma general, para la germinación de plantas de arroz se utiliza medio MS suplementado con 3% de sacarosa, si bien pueden usarse MS sin sacarosa o a otras concentraciones si las condiciones del experimento lo requieren. Las condiciones de crecimiento *in vitro* fueron: 16h/8h de fotoperiodo (luz/oscuridad) y 28ºC de temperatura.

5.2 Esterilización superficial y germinación de semillas de Arabidopsis

Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron: 12h/12h de fotoperiodo (luz/oscuridad); 40% de humedad y 22ºC de temperatura. Cuando las semillas no son sembradas directamente en tierra o se necesitan condiciones estériles de crecimiento, se procede de la siguiente manera:

- Poner un pequeño volumen de semillas en un tubo de polipropileno de 1,5 ml.
- Preparar (bajo campana extractora) una solución con 100mL de hipoclorito sódico concentrado y 3 ml de HCl al 37% fumante.
- Colocar los tubos abiertos dentro de un desecador cerrado con la solución preparada durante 4 horas. Esta solución genera gases y esteriliza las semillas.
- Ventilar los tubos en una campana de flujo laminar 15 minutos para eliminar los vapores.
- Sembrar las semillas en placas de MS (sin sacarosa, habitualmente).
- Estratificar la germinación de 2-3 días a 4ºC en oscuridad (este paso es realizado también para semillas sembradas directamente en tierra).
- Transferir a la cámara de cultivo. Las condiciones de crecimiento *in vitro* fueron: 12h/12h de fotoperiodo (luz/oscuridad); 40% de humedad y 22ºC te temperatura.

5.3 Inoculación de plantas de arroz con agentes patogénicos

5.3.1 Infección con *M. oryzae*

- *Infección de plantas enteras*: Las plantas de arroz de la línea o variedad de interés se crecieron en macetas de tierra en invernadero, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad durante 21 días. Cada maceta conteniendo 10 a 12 plantas. En los casos de líneas hemicigotas se han crecido 7 días *in vitro* en presencia del agente de

selección y después fueron trasplantadas a tierra y crecidas por 14 días. Las plantas se inocularon por aspersión a 2 atm con un aerógrafo a razón de 2 ml/maceta con una suspensión de esporas de *M. oryzae* del aislado de interés, a concentración de 10^5 esp/ml. Para análisis moleculares de estas plantas, se tomaron muestras de la parte aérea según la necesidad del experimento a los tiempos requeridos. Para el análisis del fenotipo, las plantas se mantuvieron durante 7 días en las mismas condiciones en las que habían crecido. Para evaluar la incidencia de lesiones fúngicas, se tomaron las penúltimas hojas emergidas de cada planta.

- *Infección de hojas cortadas*: Se crecieron las plantas de la misma forma que la referida para la infección de plantas enteras. Se cortaron las penúltimas hojas emergidas de cada planta y se posicionaron sobre una placa de agar-kinetina. Las hojas se inocularon con varios papeles de filtro de 5 mm de diámetro embebidos en una suspensión de esporas de *M. oryzae* del aislado necesario, a una concentración de 10^5 esp/ml. Las placas se mantuvieron tapadas durante 24 horas en condiciones de oscuridad y se retiraron los papeles de filtro. Una vez retirados los papeles de filtro, las placas se mantuvieron en condiciones de crecimiento *in vitro* de plantas de arroz. Para análisis moleculares de estas hojas, se tomaron muestras según la necesidad del experimento a los tiempos requeridos. El análisis del fenotipo se ha evaluado luego de 7 días de iniciada la infección.

5.3.2 Infección con *F. verticillioides*

Se sembraron semillas de las líneas de interés en condiciones *in vitro* en medio MS sin sacarosa a razón de 10-12 semillas/jarra y se mantuvieron en esterilidad y germinando durante 4-8 horas. Se inoculó cada semilla con 50 µl de una suspensión de esporas de *F. verticillioides* a una concentración de 10^4 esp/ml. Se mantuvieron las semillas durante 7 días en condiciones *in vitro* y temperatura de 28ºC.

5.3.3 Inoculación con elicitores de *M. oryzae*

Las plantas se crecieron durante 21 días en macetas de tierra en invernadero bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad y se trataron las plantas por aspersión de una suspensión de elicitores de *M. oryzae* a una concentración de 300 µg/ml. Se tomaron muestras de la parte aérea de las plantas a diferentes tiempos luego del tratamiento.

5.4 Infección de Arabidopsis con *P. cucumerina*

· *Infección in vitro*: Se sembraron semillas de las líneas de interés en placas de medio sólido MS sin sacarosa y se mantuvieron *in vitro* durante 15 días. Después se inocularon por aspersión de una suspensión de esporas de *P. cucumerina* a una concentración de 10^5 esp/ml. El fenotipo de las plantas fue evaluado después de 5 días de la inoculación.

· *Infección en tierra*: Se crecieron plantas de las líneas requeridas macetas de tierra y se mantuvieron en invernadero bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad durante 21 días. Después de este tiempo se inocularon con una suspensión de esporas de *P. cucumerina* a una concentración de 10^5 esp/ml. Se mantuvieron las plantas en condiciones normales de crecimiento pero con alta humedad. El fenotipo es analizado luego de 12 días de iniciada la inoculación.

5.5 Agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana*

El protocolo seguido para la infiltración de hojas de *N. benthamiana* con células de *A. tumefaciens* fue el que se detalla a continuación.

- Inocular células de *A. tumefaciens* EHA105, conteniendo los vectores de interés, en 5 ml de medio YEB líquido suplementado con los antibióticos necesarios.
- Incubar el cultivo a 26ºC y 250 rpm durante 2 días.
- Inocular 1 ml de este cultivo en 5 ml de YEB líquido e incubar durante 24 horas.
- La $OD_{(600nm)}$ óptima del cultivo para obtenerse en fase exponencial se ubica entre 0,8 y 1.
- Lavar las células ajustando la concentración de células a una $OD_{(600nm)}$ de 0,2 a un volumen final de 50 ml con medio MI.
- Centrifugar esta suspensión de células a 4ºC durante 10 min a 13000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 50 ml de medio MI.
- Incubar durante 3 h a temperatura ambiente.
- Utilizar plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 30 días y 5-6 hojas.
- Infiltrar las hojas por mitades, en una de las mitades las células de *A. tumefaciens* y en la otra mitad un control sin células bacterianas, sólo con medio MI.

- Extraer las muestras para su posterior análisis entre 24 a 72 horas después de la agroinfiltración, cuando se ha hecho efectiva la transformación transitoria de las células foliares.

5.6 Tratamiento de estrés hídrico en plantas de arroz

- *Tratamiento en tierra*: Las plantas de arroz de la línea o variedad de interés se crecieron en macetas de tierra en invernadero, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad durante 21 días. Cada maceta conteniendo 6-8 plantas. En los casos de líneas hemicigotas se han crecido 7 días *in vitro* en presencia del agente de selección y después fueron trasplantadas a tierra y crecidas por 14 días. Las plantas se sometieron a un régimen de sequía (sin riego) durante 5 días. Pasado este tiempo se empezó el riego de recuperación durante 7 días y se ha evaluado el fenotipo.
- *Tratamiento in vitro*: Se crecieron plantas de las líneas deseadas durante 7 días en condiciones *in vitro* y después se sometieron a desecación en campana de flujo laminar. Se tomaron muestras de tejido de la parte aérea y radicular a los tiempos necesarios.
- *Curva de retención de agua*: Se crecieron plantas de las líneas de interés durante 7 días en condiciones *in vitro* y después de este tiempo se mantuvieron sobre papel de filtro y se pesaron las plantas a diferentes tiempos post-desecación. Los cálculos de la pérdida de agua se refirieron al peso inicial de las plantas.

5.7 Tratamientos de fertilización fosfatada en plantas de arroz

5.7.1 Tratamiento en tierra

- *Suficiencia de fosfatos*: Se crecieron plantas de las líneas deseadas en macetas conteniendo el sustrato normal de crecimiento de arroz. Se regó cada 2 días con agua sin fertilización y una vez a la semana con fertirriego conteniendo los nutrientes a concentraciones normales.
- *Deficiencia de fosfatos*: Las plantas se crecieron en las mismas condiciones que en suficiencia de fosfatos, excepto en lo relativo al fertirriego. Cada semana se realizó el riego con fertilización exenta de fuentes de fosfatos, por lo que las plantas sólo tenían disponible los fosfatos de liberación lenta del sustrato.

5.7.2 Tratamiento en hidroponía

Las plantas se crecieron en medio Yoshida a las concentraciones normales de nutrientes, que corresponde a suficiencia de fosfatos. Para los tratamientos de deficiencia se preparó el medio de crecimiento hidropónico con una concentración de 1/10 de fuentes de fosfatos (KH_2PO_4 y K_2HPO_4). Para los tratamientos de exceso de fosfatos se crecieron las plantas en medio hidropónico Yoshida preparado con la concentración de 10X de las fuentes de fosfatos.

5.8 Análisis histoquímico de la actividad GUS

Los ensayos para la detección histoquímica de la actividad β-glucuronidasa (*GUS*) se realizaron sobre las plantas de arroz portadoras del transgén que contiene la región codificante del gen *GUS* bajo el control del promotor de *OsCPK13*, siguiendo el siguiente protocolo.

- Crecer las plantas en hidroponía con medio Yoshida en condiciones de esterilidad, durante 14 días (o según el tratamiento de interés).
- Fijar la actividad GUS de las plántulas de arroz sumergiéndolas en acetona al 90% a 4ºC durante 20 minutos.
- Eliminar la acetona y lavar 3 veces las plántulas con agua mQ.
- Infiltrar al vacío las plántulas con tampón GUS durante 15 minutos e incubar a 37ºC durante 16 horas en oscuridad.
- Retirar el tampón GUS y lavar las plántulas varias veces con alcohol etílico al 70% hasta que el color verde de las hojas haya desaparecido.
- Visualizar directamente la tinción de las hojas bajo lupa o realizando microdisecciones de los tejidos con un vibratomo.

5.9 Detección y análisis de la producción de ROS

5.9.1 Análisis histoquímico para la detección de superóxido (O_2^-) por tinción con NBT

Los tejidos de arroz se sometieron al tratamiento para evaluar la presencia de iones superóxido (O_2^-) según el siguiente protocolo.

- Incubar las secciones de hojas en una solución de tampón fosfato de potasio (pH 7,8) y azida sódica, ambos a una concentración de 10 mM.
- Infiltrar al vacío durante 10 min.

- Extraer los tejidos y sumergirlos en una solución fresca de tampón fosfato potásico (pH 7,8) 10 mM y NBT al 0,1%.
- Infiltrar durante 15 minutos mediante vacío e incubar toda la noche a temperatura ambiente.
- Un precipitado azul ha de formarse por la reacción entre el NBT y el O_2^- en presencia de azida sódica, observable en hojas desprovistas de clorofila.
- Fijar el precipitado azul mediante incubación en una solución 2:1:1 de etanol:ácido láctico:fenol durante 30 min a 65ºC.
- Clarificar las hojas lavando 2 veces en alcohol etílico al 50% y 2 veces en agua.
- Visualizar bajo lupa.

5.9.2 Detección de ROS por fluorescencia de CM-H2DCFDA

El tratamiento para evaluar la presencia de moléculas ROS en tratamientos con elicitores, utilizando el compuesto CM-H2DCFDA, que es fluorescente en presencia de esas moléculas, fue el siguiente.

- Incubar las secciones de hojas en la solución de CM-H2DCFDA en PBST a una concentración de 10 µM e infiltrar al vacío durante 1 h.
- Lavar en PBST y tratarlos o no con una suspensión de elicitores de *M. oryzae* a una concentración de 300 µg/ml durante el tiempo necesario.
- Visualizar bajo microscopio de fluorescencia GFP.

5.9.3 Cuantificación del contenido de H_2O_2

Los ensayos para la cuantificación del contenido de peróxido de hidrógeno se realizaron sobre plantas crecidas *in vitro*, siguiendo el siguiente protocolo.

- Se pesan 50 mg de tejido fresco.
- Se añaden en frío 500 µl de TCA al 0,1% p/v y se mantienen en hielo.
- Centrifugar durante 15 minutos a 4ºC y 13.000 rpm.
- Extraer el máximo e igual volumen de sobrenadante para cada muestra.
- Agregar al mismo volumen de tampón fosfato-sodio 10 mM pH 7,5.
- Añadir el doble de volumen de ioduro de potasio fresco 1 M.
- Medir la absorbancia $OD_{(390nm)}$ y calcular el contenido de H2O2 utilizando el coeficiente de extinción E=0,28 $\mu M^{-1}cm^{-1}$ y la fórmula μMH_2O_2=A/(0,9.E).

- Referir al peso inicial para obtener el resultado en µM de H_2O_2 por mg de tejido.

5.10 Análisis del contenido de fósforo en tejidos de plantas de arroz

El contenido de fósforo en tejidos de plantas de arroz fue realizado por colorimetría mediante el protocolo adaptado de Plank (1992) y Ames (1966).

Reactivos:

HNO_3 concentrado
H_2O_2 30%
Ácido ascórbico 10%
Molibdato de amonio diluído en ácido sulfúrico 1N, al 0,42%
KH_2PO_4 1000 mgP/l
Agua mQ

Destrucción de materia orgánica (digestión húmeda rápida):

- Enjuagar el tejido con agua y secar con papel absorbente.
- Congelar el material en N_2 líquido, triturar con mortero y homogeneizar. Secar el material triturado a 80ºC por 3 días.
- Pesar 50-100 mg de material seco y ponerlo en un recipiente de vidrio resistente al calor.
- Bajo una campana de extracción añadir 1 ml de ácido nítrico concentrado por cada 50 mg de muestra y digerir la muestra en un microondas durante 3 minutos a 30% de potencia (210 watts) hasta que la muestra esté seca.
- Dejar enfriar el recipiente y añadir 3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% enjuagando las paredes. Digerir durante 2 minutos a 60% de potencia (390 watts) hasta que la muestra esté completamente seca.
- Agregar a la muestra aún caliente 5 ml de agua mQ y disolver por vortex.
- Filtrar la solución con papel Whatman #1. Esta muestra puede utilizarse para el análisis del contenido de fósforo por colorimetría.

Preparación de una curva estándar de contenido de P:

- Se prepara una solución stock de KH_2PO_4 a una concentración de 1000 mgP/l: disolver 0,439 g de fosfato de monopotasio en agua mQ y diluir en 100 ml.
- Diluir esta solución a concentraciones de 20, 40, 0, 80 y 100 mgP/l, además de una muestra con 0 mgP/ml.

- Determinar la curva estándar del contenido de fósforo por colorimetría utilizando estas muestras.

Determinación del contenido de fósforo por colorimetría:

- Transferir una alícuota de 50 µl de la muestra a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y ajustar el volumen a 300 µl con agua mQ.
- Preparar una solución de 1 parte de ácido ascórbico al 10% y 6 partes de molibdato de amonio.
- Añadir 700 µl de esta solución a la muestra, homogeneizar con vortex e incubar durante 30 minutos a 42ºC.
- Medir la $OD_{(820nm)}$ en un espectrofotómetro. El color es estable por varias horas.
- Referir cada muestra a la curva estándar de concentración conocida.

6. Obtención de líneas transgénicas de arroz

Se obtuvieron líneas transgénicas de *O. sativa* cv. Tainung67 mediante el protocolo de transformación de callos embriogénicos mediado por *A. tumefaciens* basado en el descrito por Hiei *et al.* (1994) y puesto a punto por el *Institute of Molecular Plant Science* (Universidad de Leiden, Holanda) y por la UMR DAP del CIRAD, Montpellier, Francia. El protocolo seguido se detalla a continuación y se resume en el esquema de la Figura 77.

6.1 Inducción de callos embriogénicos

- Semillas esterilizadas superficialmente según el protocolo mencionado previamente son puestas en condiciones de esterilidad sobre placas altas de cultivo celular Greiner Bio-one® de 100 mm x 20 mm con medio NB, a razón de 12 semillas/placa. Se dejan las placas abiertas bajo el flujo laminar con el fin de evitar exceso de líquido y luego se cierran con Parafilm®.
- Se incuban las placas a 28ºC en oscuridad durante 4-5 semanas. Luego de ese periodo se habrán formado callos primarios pequeños (de 0,5-2 mm), compactos, resistentes, esféricos y blanquecinos.
- Transferir estas unidades embriogénicas a una nueva placa de NB a razón de 50-70 callos/placa e incubarlas a 28ºC en oscuridad durante 10 días.

- Luego de 10 días estos callos se habrán desarrollado en unidades esféricas de 2-4 mm y con superficie rugosa, las cuales son utilizadas para la transformación mediada por *A. tumefaciens*.

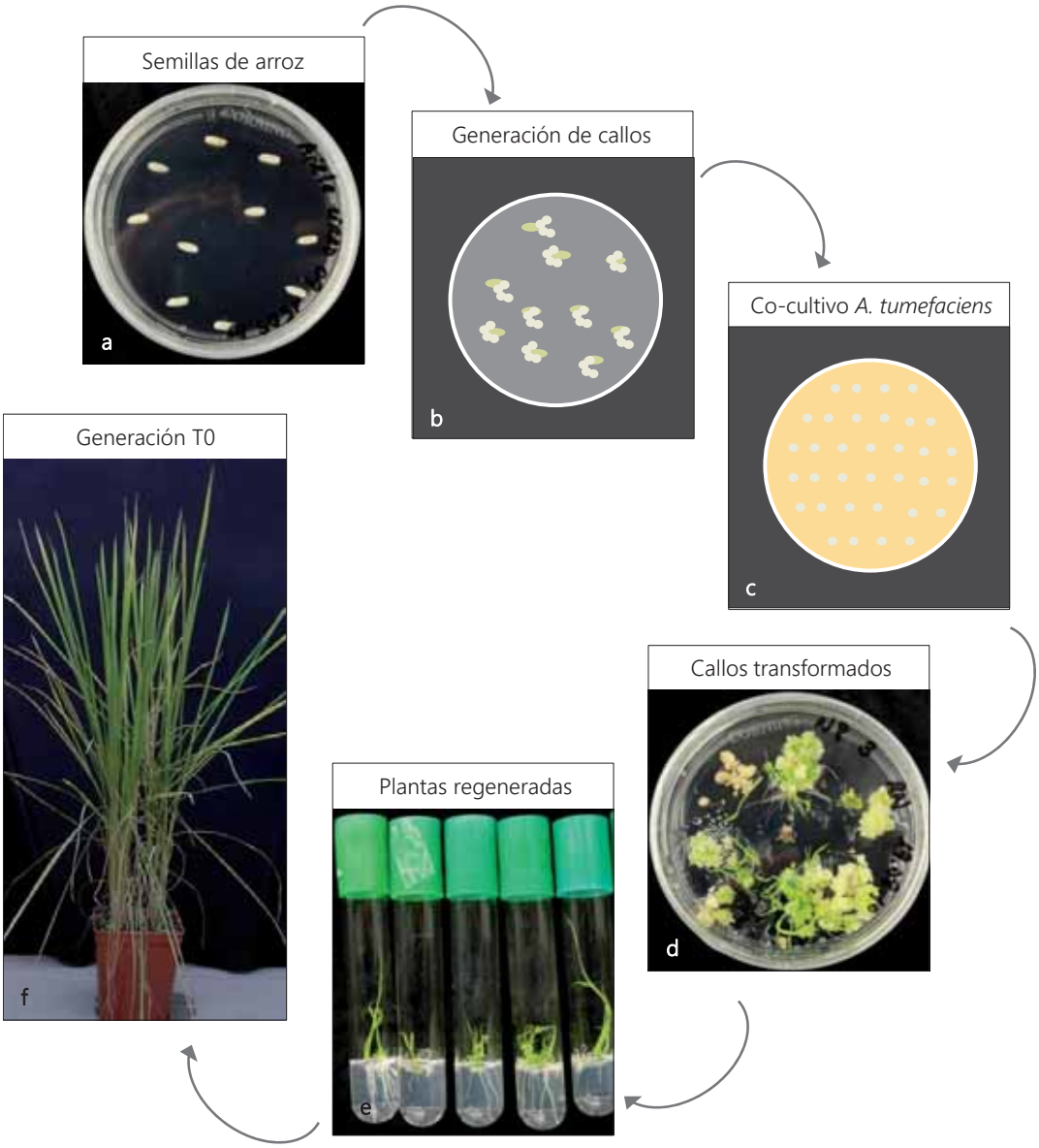

Figura 77. Esquema del proceso de transformación de arroz a partir de callos embriogénicos via *A. tumefaciens*. Diagrama del proceso de transformación de callos de arroz. Las semillas de arroz se crecen *in vitro* en medio de inducción (a) para generación de callos embriogénicos (b), los cuales se co-cultivan con una suspensión de células de *A. tumefaciens* cepa EHA105 portadoras del vector de interés (c). Los callos son crecidos en medio selectivo para la identificación de callos transformados (d) que regeneran plantas de arroz transgénicas de la generación T0 (e-f).

6.2 Transformación de callos embriogénicos mediada por *A. tumefaciens*

- Inocular la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 portadora del vector de transformación deseado en 5 ml de medio YEB líquido con los antibióticos de selección adecuados e incubar con agitación suave a 28ºC durante 12-24 horas.
- Inocular 200 µl del cultivo líquido en placas de medio YEB sólido selectivo con antibióticos e incubar las placas durante 3 días a 28ºC.
- Con ayuda de una espátula estéril recoger el cultivo mocoso de *Agrobacterium* crecido en la placa y resuspenderlo en 20 ml de medio R2 líquido. Medir la $OD_{(600nm)}$.
- Preparar 30 ml de suspensión de células bacterianas a $OD_{(600nm)}$ de 0,3 que es la óptima para realizar el co-cultivo con los callos.
- Seleccionar 50 callos para ser transformados, pasarlas a una placa de Petri vacía y añadir los 30 ml de suspensión de *Agrobacterium*. El co-cultivo se incuba durante 15 minutos, removiendo cada 3 minutos.
- Secar los callos haciéndolos rodar suavemente sobre un papel de filtro Whatman CHR1 esterilizado y seco en flujo laminar durante 2 minutos. Repetir este proceso de secado 5 veces.
- Una vez secos los callos se pasan a placas altas de medio R2 sólido a razón de 10 callos/placa y se mantienen a 24ºC durante 3 días en oscuridad.

6.3 Selección de callos transformados y regeneración de plantas transgénicas

- Pasar los callos que has sido co-cultivados a placas altas de medio R2 selectivo sólido, el que contiene el antibiótico de selección higromicina.
- Mantener los callos en condiciones de oscuridad y a 28ºC durante 2 semanas. En caso de contaminaciones por presencia de Agrobacterium, pasar a una placa nueva los callos limpios y eliminar los contaminados.
- Luego de las 2 semanas se pasan los callos a placas altas de medio NBS sólido y se incuban a 28ºC en oscuridad durante otras 2 semanas.
- Los callos primarios transformados se van necrosando, pero producen callos secundarios que crecen sobre el mismo. En el periodo de 2 semanas cada 5 días se disgregan estos callos secundarios alrededor del callo primario para favorecer su crecimiento.

- Se seleccionan callos secundarios pequeños (de 0,5-2 mm), compactos, resistentes, esféricos y blanquecinos para regenerar plantas transgénicas. Transferirlos a placas altas de medio P-RN sólido e incubarlos en oscuridad a 28ºC durante 10 días.
- Pasar los callos a placas altas de medio RN sólido a razón de 10 callos/placa e incubarlos a 28ºC en oscuridad durante 2 días y luego en régimen de luz 16h/8h de luz/oscuridad durante 3-4 semanas.
- Los callos que han regenerado pequeñas plantas completas, con parte verde y raíces formadas, se transfieren a tubos de cultivo In vitro de 5 cm de diámetro con medio de cultivo P para enraizamiento y se mantienen a 28ºC en las mismas condiciones de luz.
- Una vez que las plantas hayan desarrollado un buen sistema radicular y parte aérea se trasplantan a tierra en condiciones normales de invernadero.
- Luego de 4 semanas se toman muestras de las hojas de cada planta y se realiza un análisis genómico de inserción de T-DNA para confirmar la transgénesis.

7. Métodos informáticos

7.1 Bases de datos consultadas

Las bases de datos consultadas fueron las relacionadas con: secuencias del genoma de arroz, secuencias y estructuras de miRNAs y dianas de miRNAs.

- *Rice Genome Annotation Project*: http://rice.plantbiology.msu.edu/ (Kawahara *et al.* 2013).
- miRBase: www.mirbase.org (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014).
- TARBase:http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index (Vlachos *et al.*, 2014).
- Uniprot: http://www.uniprot.org/

7.2 Análisis de promotores

Para el análisis de las secuencias promotoras en esta tesis se han tomado los 1500 pb antes del inicio de la transcripción, además de las secuencias 5' UTR de genes y las secuencias ubicadas entre el inicio de la transcripción y el inicio del precursor para los miRNAs. Estas secuencias se han sometido al análisis en la búsqueda de elementos

reguladores en las plataformas bioinformáticas *en línea* PlantCARE: http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/ (Lescot *et al.*, 2002) y/o PLACE: http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/ (Higo *et al.*, 1999), según lo indicado para cada experimento. Para el análisis del sitio de inicio de transcripción se utilizó la plataforma *en línea* Softberry y su programa de predicción del inicio de la transcripción: www.softberry.com (Shahmuradov *et al.*, 2003).

7.3 Tratamiento de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

El alineamiento de las secuencias se realizó en la plataforma bioinformática *en línea* MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/), según el caso utilizando la secuencia genómica o de los tránscritos. Para la construcción de árboles filogenéticos se tomaron las secuencias de los tránscritos de los genes y se alinearon como se ha descrito. Este alineamiento se ha utilizado en el programa bioinformático SeaView (Gouy *et al.*, 2010) y se ha corrido el programa de construcción de árboles según el método PhyML (Guindon *et al.*, 2010). Para realizar la predicción de estructura secundaria de precursores de miRNAs se utilizó el servidor *en línea* del programa bioinformático *RNA-fold web server* (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi).

Bibliografía

Bibliografía

Abbasi, F., Onodera, H., Toki, S., Tanaka, H., & Komatsu, S. (2004). OsCDPKI3, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Molecular Biology*, *55*(4), 541–552. doi:10.1007/s11103-004-1178-y

Ai, P., Sun, S., Zhao, J., Fan, X., Xin, W., Guo, Q., ... Xu, G. (2009). Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation. *Plant Journal*, *57*(5), 798–809. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03726.x

Ambrose, B. A., & Purugganan, M. (2013). The Evolution of Plant Form. In *Annual Plant Reviews* (Vol. 45).

Ames, B. N. (1966). [10] Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology*, *8*(C), 115–118. doi:10.1016/0076-6879(66)08014-5

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*, 373–399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P., & Baulcombe, D. C. (2005). Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant Journal*, *43*(6), 837–848. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02499.x

Asai, S., Ichikawa, T., Nomura, H., Kobayashi, M., Kamiyoshihara, Y., Mori, H., ... Yoshioka, H. (2013). The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(20), 14332–14340. doi:10.1074/jbc.M112.448910

Asano, T., Hayashi, N., Kobayashi, M., Aoki, N., Miyao, A., Mitsuhara, I., ... Ohsugi, R. (2012). A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. *Plant Journal*, *69*(1), 26–36. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04766.x

Aung, K., Lin, S.-I., Wu, C.-C., Huang, Y.-T., Su, C.-L., & Chiou, T.-J. (2006). pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiology*, *141*(3), 1000–1011. doi:10.1104/pp.106.078063

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., ... Blackshaw, S. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology Current Protocols in Molecular Biology*. *Molecular Biology* (Vol. 1). doi:10.1002/mrd.1080010210

Baldrich, P., Campo, S., Wu, M.-T., Liu, T.-T., Hsing, Y.-I. C., & Segundo, B. S. (2015). MicroRNA-mediated regulation of gene expression in the response of rice plants to fungal elicitors. *RNA Biology*, 0. doi:10.1080/15476286.2015.1050577

Baldrich, P., Kakar, K., Siré, C., Moreno, A. B., Berger, A., García-Chapa, M., ... San Segundo, B. (2014). Small RNA profiling reveals regulation of Arabidopsis miR168 and heterochromatic siRNA415 in response to fungal elicitors. *BMC Genomics*, *15*(1), 1083. doi:10.1186/1471-2164-15-1083

Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, *69*(4), 473–488. doi:10.1007/s11103-008-9435-0

Barna, B., Fodor, J., Harrach, B. D., Pogány, M., & Király, Z. (2012). The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, *59*, 37–43. doi:10.1016/j.plaphy.2012.01.014

Batistič, O., & Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1820*(8), 1283–1293. doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.012

Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, *65*(5), 1229–1240. doi:10.1093/jxb/ert375

Bhullar, N. K., & Gruissem, W. (2013). Nutritional enhancement of rice for human health: The contribution of biotechnology. *Biotechnology Advances*, *31*(1), 50–57. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.001

Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate Immunity in Plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, *742*(5928), 742–4. doi:10.1126/science.1171647

Bombarely, A., Rosli, H. G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L., & Martin, G. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(12), 120809142432005. doi:10.1094/MPMI-06-12-0148-TA

Bouain, N., Kisko, M., Rouached, A., Dauzat, M., Lacombe, B., Belgaroui, N., … Rouached, H. (2014). Phosphate/zinc interaction analysis in two lettuce varieties reveals contrasting effects on biomass, photosynthesis, and dynamics of Pi transport. *BioMed Research International*, *2014*. doi:10.1155/2014/548254

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bray, E. A., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1158–1203). American Society of Plant Physiologists. doi:10.1016/j.ibmb.2010.02.006

Bruggeman, Q., Raynaud, Cã©., Benhamed, M., & Delarue, M. (2015). To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Frontiers in Plant Science*, *6*(January), 1–22. doi:10.3389/fpls.2015.00024

Bundó, M. & Coca, M. (2015). Enhancing blast disease resistance by overexpression of the calcium-dependent protein kinase OsCPK4 in rice. *Plant Biotechnology Journal* (Under revision).

Bundó, M., Montesinos, L., Izquierdo, E., Campo, S., Mieulet, D., Guiderdoni, E., … Coca, M. (2014). Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 102. doi:10.1186/1471-2229-14-102

Cai, X., Davis, E. J., Ballif, J., Liang, M., Bushman, E., Haroldsen, V., … Wu, Y. (2006). Mutant identification and characterization of the laccase gene family in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *57*(11), 2563–2569. doi:10.1093/jxb/erl022

Campo, S., Baldrich, P., Messeguer, J., Lalanne, E., Coca, M., & San Segundo, B. (2014). Overexpression of a Calcium-Dependent Protein Kinase Confers Salt and Drought Tolerance in Rice by Preventing Membrane Lipid Peroxidation. *Plant Physiology*, *165*(2), 688–704. doi:10.1104/pp.113.230268

Campo, S., Peris-Peris, C., Siré, C., Moreno, A. B., Donaire, L., Zytnicki, M., … San Segundo, B. (2013). Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the Nramp6 (Natural resistance-associated macrophage protein 6) gene involved in pathogen resistance. *New Phytologist*, *199*(1), 212–227. doi:10.1111/nph.12292

Campos-Soriano, L., García-Martínez, J., & Segundo, B. S. (2012). The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology*, *13*(6), 579–592. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00773.x

Campos-Soriano, L., Gómez-Ariza, J., Bonfante, P., & San Segundo, B. (2011). A rice calcium-dependent protein kinase is expressed in cortical root cells during the presymbiotic phase of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 90. doi:10.1186/1471-2229-11-90

Campos-Soriano, L., & San Segundo, B. (2009). Assessment of blast disease resistance in transgenic PRms rice using a gfp -expressing Magnaporthe oryzae strain. *Plant Pathology*, *58*(4), 677–689. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02061.x

Campos-Soriano, L., Valè, G., Lupotto, E., & San Segundo, B. (2013). Investigation of rice blast development in susceptible and resistant rice cultivars using a gfp- expressing *Magnaporthe oryzae* isolate. *Plant Pathology*, *62*(5), 1030–1037. doi:10.1111/ppa.12023

Chen, C., Ridzon, D. a., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., … Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *33*(20), 1–9. doi:10.1093/nar/gni178

Chen, L.-J., Wuriyanghan, H., Zhang, Y.-Q., Duan, K.-X., Chen, H.-W., Li, Q.-T., … Zhang, J.-S. (2013a). An S-domain receptor-like kinase, OsSIK2, confers abiotic stress tolerance and delays dark-induced leaf senescence in rice. *Plant Physiology*, *163*(December), 1752–65. doi:10.1104/pp.113.224881

Chen, W., & Singh, K. B. (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant Journal*, *19*(6), 667–677. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00560.x

Chen, X., Fu, S., Zhang, P., Gu, Z., Liu, J., Qian, Q., & Ma, B. (2013b). Proteomic analysis of a disease-resistance-enhanced lesion mimic mutant spotted leaf 5 in rice. *Rice (New York, N.Y.)*, *6*(1), 1. doi:10.1186/1939-8433-6-1

Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A., & Mao, L. (2010). SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: Star players for plant growth and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(11), 946–951. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00987.x

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., … Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, *448*(7152), 497–500. doi:10.1038/nature05999

Chipman, D. M., & Shaanan, B. (2001). The ACT domain family. *Current Opinion in Structural Biology*, 694–700.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, *124*(4), 803–814. doi:10.1016/j.cell.2006.02.008

Cho, H. Y., Lee, C., Hwang, S.-G., Park, Y. C., Lim, H. L., & Jang, C. S. (2014). Overexpression of the OsChl1 gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic Arabidopsis. *Gene*, *552*(1), 98–105. doi:10.1016/j.gene.2014.09.018

Cho, S. H., Coruh, C., & Axtell, M. J. (2012). miR156 and miR390 regulate tasiRNA accumulation and developmental timing in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, *24*(12), 4837–49. doi:10.1105/tpc.112.103176

Coca, M., & San Segundo, B. (2010). AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 526–540. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04255.x

Couch, B. C., & Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, Magnaporthe oryzae, from M. grisea. *Mycologia*, *94*(4), 683–693. doi:10.2307/3761719

Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species, *3*(3), 156–165. doi:10.4161/psb.3.3.5536

Curaba, J., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2014). MiRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of Experimental Botany*, *65*(6), 1425–1438. doi:10.1093/jxb/eru002

Dai, X., Wang, Y., Yang, a., & Zhang, W.-H. (2012). OsMYB2P-1, an R2R3 MYB Transcription Factor, Is Involved in the Regulation of Phosphate-Starvation Responses and Root Architecture in Rice. *Plant Physiology*, *159*(1), 169–183. doi:10.1104/pp.112.194217

Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, *39*(SUPPL. 2), 1–5. doi:10.1093/nar/gkr319

Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, *411*(6839), 826–833. doi:10.1038/35081161

Datta, K., Oliva, N., Velazhahan, R., Mew, T., Muthukrishnan, S., & Datta, S. K. (1999). Over-expression of thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor.Appl.Genet.*, 1138–1145.

Datta, S. K., & Muthukrishnan, S. (1999). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. (C. Press, Ed.).

De Datta, S. K. (1981). *Principles and practices of rice production*. (IRRI, Ed.). Wiley-Interscience.

De Vleesschauwer, D., Gheysen, G., & Höfte, M. (2013). Hormone defense networking in rice: Tales from a different world. *Trends in Plant Science*, *18*(10), 555–565. doi:10.1016/j.tplants.2013.07.002

Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., … Birren, B. W. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, *434*(7036), 980–986. doi:10.1038/nature03449

Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., … Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant*, *1*(3), 423–445. doi:10.1093/mp/ssn019

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(5), 547–552. doi:10.1016/j.pbi.2004.07.005

Du, P., Wu, J., Zhang, J., Zhao, S., Zheng, H., Gao, G., … Li, Y. (2011). Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursors. *PLoS Pathogens*, *7*(8). doi:10.1371/journal.ppat.1002176

Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.-P., … Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(21), 8744–9. doi:10.1073/pnas.1221294110

Dufresne, M., & Osbourn, A. E. (2001). Definition of tissue-specific and general requirements for plant infection in a phytopathogenic fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *14*(3), 300–307. doi:10.1094/MPMI.2001.14.3.300

Dunoyer, P., Himber, C., & Voinnet, O. (2006). Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nature Genetics*, *38*(2), 258–263. doi:10.1038/ng1722

Ebbole, D. J. (2007). Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *45*, 437–456. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094346

Ehrenreich, I. M., & Purugganan, M. D. (2008). Sequence variation of MicroRNAs and their binding sites in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *146*(4), 1974–1982. doi:10.1104/pp.108.116582

Eldem, V., Okay, S., & Ünver, T. (2013). Plant micrornas: New players in functional genomics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *37*(1), 1–21. doi:10.3906/tar-1206-50

Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(4), 366–371. doi:10.1016/j.pbi.2007.04.020

Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, H. (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. In Plant Responses to Drought Stress (pp. 1–33). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-32653-0_1

Fekih, R., Tamiru, M., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Kanzaki, E., … Terauchi, R. (2014). The rice (*Oryza sativa* L.) LESION MIMIC RESEMBLING, which encodes an AAA-type ATPase, is implicated in defense response. *Molecular Genetics and Genomics*, *290*(2), 611–622. doi:10.1007/s00438-014-0944-z

Feller, A., Hernandez, J. M., & Grotewold, E. (2006). An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(39), 28964–28974. doi:10.1074/jbc.M603262200

Feng, B. H., Yang, Y., Shi, Y. F., Shen, H. C., Wang, H. M., Huang, Q. N., … Wu, J. L. (2013). Characterization and Genetic Analysis of a Novel Rice Spotted-leaf Mutant HM47 with Broad-spectrum Resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae. *Journal of Integrative Plant Biology*, *55*(5), 473–483. doi:10.1111/jipb.12021

Ferreira, T. H., Gentile, A., Vilela, R. D., Costa, G. G. L., Dias, L. I., Endres, L., & Menossi, M. (2012). microRNAs Associated with Drought Response in the Bioenergy Crop Sugarcane (Saccharum spp.). *PLoS ONE*, *7*(10). doi:10.1371/journal.pone.0046703

Galvao, V. C., Horrer, D., Kuttner, F., & Schmid, M. (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, *139*(21), 4072–4082. doi:10.1242/dev.080879

Gamuyao, R., Chin, J. H., Pariasca-Tanaka, J., Pesaresi, P., Catausan, S., Dalid, C., … Heuer, S. (2012). The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, *488*(7412), 535–539. doi:10.1038/nature11346

Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., & Zhang, Y. (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research*, *18*(12), 1190–1198. doi:10.1038/cr.2008.300

Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Li, Y., Cai, H., … Zhu, Y. (2010). Over-expression of *osa-MIR396c* decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta*, *231*(5), 991–1001. doi:10.1007/s00425-010-1104-2

Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., … Zhu, Y. (2011). Osa-MIR393: A salinity- and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular Biology Reports*, *38*(1), 237–242. doi:10.1007/s11033-010-0100-8

Gao, X., Cox Jr., K., & He, P. (2014). Functions of calcium-dependent protein kinases in plant innate immunity. *Plants*, *3*(1), 160–176. doi:10.3390/plants3010160

García-Olmedo, F., Molina, a, Segura, a, & Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, *3*(2), 72–74. doi:10.1016/S0966-842X(00)88879-4

Gavnholt, B., & Larsen, K. (2002). Molecular biology of plant laccase in relation to lignin formation. *Physiol Plant*, *116*, 273–280.

Ge, X., Chen, J., Li, N., Lin, Y., Sun, C., & Cao, K. (2003). Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(6), 603–607.

German, M. A., Luo, S., Schroth, G., Meyers, B. C., & Green, P. J. (2009). Construction of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome. *Nature Protocols*, *4*(3), 356–362. doi:10.1038/nprot.2009.8

Giots, F., Donaton, M. C. V, & Thevelein, J. M. (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Molecular Microbiology*, *47*(4), 1163–1181. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03365.x

Girardi, C. L., Rombaldi, C. V., Dal Cero, J., Nobile, P. M., Laurens, F., Bouzayen, M., & Quecini, V. (2013). Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in apple and transcriptional evidence of ERF involvement in scab pathogenesis. *Scientia Horticulturae*, *151*, 112–121. doi:10.1016/j.scienta.2012.12.017

Gómez-Ariza, J., Campo, S., Rufat, M., Estopà, M., Messeguer, J., San Segundo, B., & Coca, M. (2007). Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *20*(7), 832–842. doi:10.1094/MPMI-20-7-0832

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*(6), 1003–1011. doi:10.1016/S1097-2765(00)80265-8

Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(2), 221–224. doi:10.1093/molbev/msp259

Grant, G. a. (2006). The ACT domain: A small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 33825–33829. doi:10.1074/jbc.R600024200

Griffiths-Jones, S., Hui, J. H. L., Marco, A., & Ronshaugen, M. (2011). MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Reports*, *12*(2), 172–177. doi:10.1038/embor.2010.191

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010

Guo, C., Ge, X., & Ma, H. (2013). The rice *OsDIL* gene plays a role in drought tolerance at vegetative and reproductive stages. *Plant Molecular Biology*, *82*, 239–253. doi:10.1007/s11103-013-0057-9

Guo, L., Zhang, H., Zhao, Y., Yang, S., & Chen, F. (2014). Selected isomiR expression profiles via arm switching? *Gene*, *533*(1), 149–155. doi:10.1016/j.gene.2013.09.102

Gupta, O. P., Meena, N. L., Sharma, I., & Sharma, P. (2014). Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Molecular Biology Reports*, *41*(7), 4623–4629. doi:10.1007/s11033-014-3333-0

Hackenberg, M., Huang, P. J., Huang, C. Y., Shi, B. J., Gustafson, P., & Langridge, P. (2013a). A Comprehensive expression profile of micrornas and other classes of non-coding small RNAs in barley under phosphorous-deficient and-sufficient conditions. *DNA Research*, *20*(2), 109–125. doi:10.1093/dnares/dss037

Hackenberg, M., Shi, B. J., Gustafson, P., & Langridge, P. (2012). A transgenic transcription factor (TaDREB3) in barley affects the expression of microRNAs and other small non-coding RNAs. *PLoS ONE*, *7*(8). doi:10.1371/journal.pone.0042030

Hackenberg, M., Shi, B.-J., Gustafson, P., & Langridge, P. (2013b). Characterization of phosphorus-regulated miR399 and miR827 and their isomirs in barley under phosphorus-sufficient and phosphorus-deficient conditions. *BMC Plant Biology*, *13*(1), 214. doi:10.1186/1471-2229-13-214

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8

Harmon, A. C., Gribskov, M., & Harper, J. F. (2000). CDPKs–a kinase for every Ca 2+ signal? *Trends Plant Sci*, *5*(4), 154–159.

Hassler, S., Lemke, L., Jung, B., Möhlmann, T., Krüger, F., Schumacher, K., … Neuhaus, H. E. (2012). Lack of the Golgi phosphate transporter PHT4;6 causes strong developmental defects, constitutively activated disease resistance mechanisms and altered intracellular phosphate compartmentation in Arabidopsis. *Plant Journal*, *72*(5), 732–744. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05106.x

Hernandez, I., & Munne-Bosch, S. (2015). Linking phosphorous availability with photo-oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 1–12. doi:10.1093/jxb/erv056

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *6*(2), 271–282. doi:10.1046/j.1365-313X.1994.6020271.x

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/27.1.297

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, *2*(4), 208–218. doi:10.1007/BF01977351

Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, *168*(1), 51–62. doi:10.1016/j.jplph.2010.06.014

Hou, M., Xu, W., Bai, H., Liu, Y., Li, L., Liu, L., … Liu, G. (2012). Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Cell Reports*, *31*(5), 895–904. doi:10.1007/s00299-011-1210-z

Hou, X. L., Wu, P., Jiao, F. C., Jia, Q. J., Chen, H. M., Yu, J., … Yi, K. K. (2005). Regulation of the expression of OsIPS1 and OsIPS2 in rice via systemic and local Pi signalling and hormones. *Plant, Cell and Environment*, *28*(3), 353–364. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01272.x

Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., … Harmon, A. C. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, *132*(2), 666–680. doi:10.1104/pp.102.011999

Hsing, Y. I., Chern, C. G., Fan, M. J., Lu, P. C., Chen, K. T., Lo, S. F., … Yu, S. M. (2007). A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Molecular Biology*, *63*(3), 351–364. doi:10.1007/s11103-006-9093-z

Hu, B., & Chu, C. (2011). Phosphate starvation signaling in rice. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(7), 927–929. doi:10.4161/psb.6.7.15377

Hu, B., Zhu, C., Li, F., Tang, J., Wang, Y., Lin, A., … Chu, C. (2011). LEAF TIP NECROSIS1 plays a pivotal role in the regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. *Plant Physiology*, *156*(3), 1101–1115. doi:10.1104/pp.110.170209

Hu, W., Wang, T., Yue, E., Zheng, S., & Xu, J. H. (2014). Flexible microRNA arm selection in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *447*(3), 526–530. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.036

Huang, C., Barker, S. J., Langridge, P., Smith, F. W., & Graham, R. D. (2000). Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. *Plant Physiology*, *124*(1), 415–422. doi:10.1104/pp.124.1.415

Jain, A., Nagarajan, V. K., & Raghothama, K. G. (2012). Transcriptional regulation of phosphate acquisition by higher plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(19), 3207–3224. doi:10.1007/s00018-012-1090-6

Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(46), 16892–16897. doi:10.1073/pnas.0508467102

Jarosch, B., Kogel, K., & Schaffrath, U. (1999). The Ambivalence of the Barley Mlo Locus : Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus Magnaporthe grisea. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *12*(6), 508–514. doi:10.1094/mpmi.1999.12.6.508

Jeong, D.-H., Park, S., Zhai, J., Gurazada, S. G. R., De Paoli, E., Meyers, B. C., & Green, P. J. (2011). Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. *The Plant Cell*, *23*(12), 4185–207. doi:10.1105/tpc.111.089045

Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. doi:10.1038/nature05286

Jorgensen, S. a., & Preston, J. C. (2014). Differential SPL gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in Mimulus and Arabidopsis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *73*(1), 129–139. doi:10.1016/j.ympev.2014.01.029

Jwa, N. S., Kumar Agrawal, G., Rakwal, R., Park, C. H., & Prasad Agrawal, V. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel Jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *286*(5), 973–983. doi:10.1006/bbrc.2001.5507

Kader, J. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, (47), 627–654.

Kam, J., Gresshoff, P. M., Shorter, R., & Xue, G. P. (2008). The Q-type C2H2 zinc finger subfamily of transcription factors in *Triticum aestivum* is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress. *Plant Molecular Biology*, *67*(3), 305–322. doi:10.1007/s11103-008-9319-3

Kankanala, P., Czymmek, K., & Valent, B. (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *The Plant Cell*, *19*(2), 706–724. doi:10.1105/tpc.106.046300

Karki, S., Rizal, G., & Quick, W. P. (2013). Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C4 pathway. *Rice (New York, N.Y.)*, *6*(1), 28. doi:10.1186/1939-8433-6-28

Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., … Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(47), 18002–18007. doi:10.1073/pnas.0608258103

Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., … Matsumoto, T. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice (New York, N.Y.)*, *6*(1), 4. doi:10.1186/1939-8433-6-4

Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., … Valent, B. (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *The Plant Cell*, *22*(4), 1388–1403. doi:10.1105/tpc.109.069666

Khraiwesh, B., Zhu, J.-K., & Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(2), 137–148. doi:10.1016/j.bbagrm.2011.05.001

Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., & Ahn, J. H. (2012). The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 Module Regulates Ambient Temperature-Responsive Flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *159*(1), 461–478. doi:10.1104/pp.111.192369

Kimura, S., Kaya, H., Kawarazaki, T., Hiraoka, G., Senzaki, E., Michikawa, M., & Kuchitsu, K. (2012). Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca2+-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca2+ and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1823*(2), 398–405. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.011

Kjær, B. J., Jensen, H. P., Jensen, J., & Jørgensen, J. H. (1990). Associations between 3 ml-o powdery mildew resistance genes and agronomic traits in barley. *Euphytica*, *46*(3), 185–193. doi:10.1007/BF00027217

Klimecka, M., Muszyńska, G., & Muszynska, G. (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol*, *54*(2), 219–233. Retrieved from http://www.actabp.pl/pdf/2_2007/219s.pdf

Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., … Yoshioka, H. (2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant Cell*, *19*(3), 1065–1080. doi:10.1105/tpc.106.048884

Kong, Q., Pattanaik, S., Feller, A., Werkman, J. R., Chai, C., Wang, Y., … Yuan, L. (2012). Regulatory switch enforced by basic helix-loop-helix and ACT-domain mediated dimerizations of the maize transcription factor R. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(30), E2091–E2097. doi:10.1073/pnas.1205513109

Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Satoh, K., Shibato, J., Kottapalli, P., Iwahashi, H., & Kikuchi, S. (2007). Transcriptional profiling of indica rice cultivar IET8585 (Ajaya) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(10-11), 834–850. doi:10.1016/j.plaphy.2007.07.013

Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), 68–73. doi:10.1093/nar/gkt1181

Krasnikova, M. S., Goryunov, D. V., Troitsky, A. V., Solovyev, A. G., Ozerova, L. V., & Morozov, S. Y. (2013). Peculiar evolutionary history of miR390-guided TAS3-like genes in land plants. *The Scientific World Journal*, *2013*. doi:10.1155/2013/924153

Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., & Kogel, K. H. (2001). A Compromised Mlo Pathway Affects the Response of Barley to the Necrotrophic Fungus *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and Its Toxins. *Phytopathology*, *91*(2), 127–133. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.2.127

Kumar, K., & Sinha, A. K. (2013). Overexpression of constitutively active mitogen activated protein kinase kinase 6 enhances tolerance to salt stress in rice. *Rice (New York, N.Y.)*, *6*(1), 25. doi:10.1186/1939-8433-6-25

Lai, Z., Vinod, K., Zheng, Z., Fan, B., & Chen, Z. (2008). Roles of Arabidopsis WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biology*, *8*, 68. doi:10.1186/1471-2229-8-68

Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., & Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant Journal*, *16*(2), 223–233. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9839467

Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., … Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 325–327. doi:10.1093/nar/30.1.325

Li, A. li, Meng, C. sheng, Zhou, R. hua, Ma, Z. ying, Jia, J. zeng, & Zhang, Y. min. (2006). Assessment of Lipid Transfer Protein (LTP1) Gene in Wheat Powdery Mildew Resistance. *Agricultural Sciences in China*, *5*(4), 241–249. doi:10.1016/S1671-2927(06)60045-X

Li, C., Xie, W., Bai, W., Li, Z., Zhao, Y., & Liu, H. (2008). Calmodulin binds to maize lipid transfer protein and modulates its lipids binding ability. *FEBS Journal*, *275*, 5298–5308. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06660.x

Li, H., Dong, Y., Yin, H., Wang, N., Yang, J., Liu, X., … Li, X. (2011a). Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 170. doi:10.1186/1471-2229-11-170

Li, H., Zhou, S. Y., Zhao, W. S., Su, S. C., & Peng, Y. L. (2009). A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance. *Plant Molecular Biology*, *69*, 337–346. doi:10.1007/s11103-008-9430-5

Li, T., Li, H., Zhang, Y. X., & Liu, J. Y. (2011b). Identification and analysis of seven H_2O_2-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Nucleic Acids Research*, *39*(7), 2821–2833. doi:10.1093/nar/gkq1047

Li, Y. F., Zheng, Y., Addo-Quaye, C., Zhang, L., Saini, A., Jagadeeswaran, G., … Sunkar, R. (2010a). Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant Journal*, *62*(5), 742–759. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04187.x

Li, Y., Lu, Y.-G. Y.-G., Shi, Y. Y., Wu, L., Xu, Y.-J. Y.-J. Y.-J., Huang, F. F., … Wang, W.-M. W.-M. (2013a). Multiple Rice MicroRNAs Are Involved in Immunity against the Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Physiology*, *164*(2), 1077–1092. doi:10.1104/pp.113.230052

Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J.-M. (2010b). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology*, *152*(4), 2222–2231. doi:10.1104/pp.109.151803

Li, Z., Hu, Q., Zhou, M., Vandenbrink, J., Li, D., Menchyk, N., … Luo, H. (2013b). Heterologous expression of OsSIZ1, a rice SUMO E3 ligase, enhances broad abiotic stress tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(4), 432–445. doi:10.1111/pbi.12030

Liese, A., & Romeis, T. (2013). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(7), 1582–1589. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.024

Lin, S. I., Santi, C., Jobet, E., Lacut, E., El Kholti, N., Karlowski, W. M., … Echeverria, M. (2010). Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. *Plant and Cell Physiology*, *51*(12), 2119–2131. doi:10.1093/pcp/pcq170

Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, a H., & Leyser, H. M. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of Arabidopsis, *29*, 751–760. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01251.x

Liu, F., Wang, Z., Ren, H., Shen, C., Li, Y., Ling, H. Q., … Wu, P. (2010). OsSPX1 suppresses the function of OsPHR2 in the regulation of expression of OsPT2 and phosphate homeostasis in shoots of rice. *Plant Journal*, *62*(3), 508–517. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04170.x

Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., & Zheng, C.-C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(5), 836–843. doi:10.1261/rna.895308

Liu, X., Li, F., Tang, J., Wang, W., Zhang, F., Wang, G., … Li, C. (2012a). Activation of the Jasmonic Acid Pathway by Depletion of the Hydroperoxide Lyase OsHPL3 Reveals Crosstalk between the HPL and AOS Branches of the Oxylipin Pathway in Rice. *PLoS ONE*, *7*(11). doi:10.1371/journal.pone.0050089

Liu, Z., Kumari, S., Zhang, L., Zheng, Y., & Ware, D. (2012b). Characterization of mirnas in response to short-term waterlogging in three inbred lines of Zea mays. *PLoS ONE*, *7*(6). doi:10.1371/journal.pone.0039786

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Lloyd, J., & Meinke, D. (2012). A Comprehensive Dataset of Genes with a Loss-of-Function Mutant Phenotype in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *158*(3), 1115–1129. doi:10.1104/pp.111.192393

López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(1), 95–123. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035949

Lu, S., Li, Q., Wei, H., Chang, M.-J., Tunlaya-Anukit, S., Kim, H., … Chiang, V. L. (2013). Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(26), 10848–53. doi:10.1073/pnas.1308936110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1308936110

Mahler, R. L. (2004). Nutrients Plants Require for Growth. *Magnesium*, 20–23.

Mall, T. K., Dweikat, I., Sato, S. J., Neresian, N., Xu, K., Ge, Z., … Clemente, T. (2011). Expression of the rice CDPK-7 in sorghum: Molecular and phenotypic analyses. *Plant Molecular Biology*, *75*(4-5), 467–479. doi:10.1007/s11103-011-9741-9

Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A. S., Weijers, D., Vaucheret, H., … Maizel, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory

network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant Cell*, *22*(4), 1104–1117. doi:10.1105/tpc.109.072553

Marsico, A., Huska, M. R., Lasserre, J., Hu, H., Vucicevic, D., Musahl, A., … Vingron, M. (2013). PROmiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs. *Genome Biology*, *14*(8), R84. doi:10.1186/gb-2013-14-8-r84

Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, *60*(6), 551–565. doi:10.1016/S0031-9422(02)00171-1

McAinsh, M. R., & Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist*. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x

McGrann, G. R. D., Stavrinides, A., Russell, J., Corbitt, M. M., Booth, A., Chartrain, L., … Brown, J. K. M. (2014). A trade off between mlo resistance to powdery mildew and increased susceptibility of barley to a newly important disease, Ramularia leaf spot. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1025–37. doi:10.1093/jxb/ert452

McGrann, G. R. D., Steed, , a., Burt, C., Nicholson, P., & Brown, J. K. M. (2015). Differential effects of lesion mimic mutants in barley on disease development by facultative pathogens. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/erv154

Mellersh, D. G., Foulds, I. V, Higgins, V. J., & Heath, M. C. (2002). H_2O_2 plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant ± fungal interactions. *Science*, *29*, 257–268.

Mendoza-Soto, A. B., Sánchez, F., & Hernández, G. (2012). MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Frontiers in Plant Science*, *3*(May), 1–6. doi:10.3389/fpls.2012.00105

Meng, Y., Shao, C., Wang, H., & Jin, Y. (2012). Target mimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants. *BMC Genomics*, *13*(1), 197. doi:10.1186/1471-2164-13-197

Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., … Ohashi, Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*, *279*(4), 415–427. doi:10.1007/s00438-008-0322-9

Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, tpc.114.133090. doi:10.1105/tpc.114.133090

Mizobuchi, R., Hirabayashi, H., Kaji, R., Nishizawa, Y., Yoshimura, A., Satoh, H., … Okamoto, M. (2002). Isolation and characterization of rice lesion-mimic mutants with enhanced resistance to rice blast and bacterial blight. *Plant Science*, *163*(2), 345–353. doi:10.1016/S0168-9452(02)00134-6

Moldenhauer, K., & Gibbons, J. (2003). Rice morphology and development. In C. W. Smith & R. H. Dilday (Eds.), *Rice: Origin, History, technology and production* (pp. 103–128). Jonh Wiley & Sons.

Morin, R. D., Aksay, G., Dolgosheina, E., Ebhardt, H. A., Magrini, V., Mardis, E. R., … Va, B. (2008). Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*, 571–584. doi:10.1101/gr.6897308.1

Mou, G., Wang, K., Xu, D., & Zhou, G. (2013). Evaluation of Three RT-qPCR-Based miRNA Detection Methods Using Seven Rice miRNAs. *Biosci Biotechnol Biochem*, *77*(6), 1349–1353. doi:10.1271/bbb.130192

Moxon, S., Schwach, F., Dalmay, T., MacLean, D., Studholme, D. J., & Moulton, V. (2008). A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets. *Bioinformatics*, *24*(19), 2252–2253. doi:10.1093/bioinformatics/btn428

Muchhal, U. S., Liu, C. M., & Raghothama, K. G. (1997). Ca2+-ATPase is expressed differentially in phosphate-starved roots of tomato. *Physiologia Plantarum*, *101*(3), 540–544. doi:10.1034/j.1399-3054.1997.1010313.x

Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 59, pp. 501–520). doi:10.1093/jxb/erm239

Mutum, R. D., Balyan, S. C., Kansal, S., Agarwal, P., Kumar, S., Kumar, M., & Raghuvanshi, S. (2013). Evolution of variety-specific regulatory schema for expression of osa-miR408 in indica rice varieties under drought stress. *FEBS Journal*, *280*(7), 1717–1730. doi:10.1111/febs.12186

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., … Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *104*(1), 34–41. doi:10.1263/jbb.104.34

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., … Jones, J. D. G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5772), 436–439. doi:10.1126/science.1126088

Ng, T. B., Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ye, X. (2012). Lipid-transfer proteins. *Biopolymers*, *98*(4), 268–279. doi:10.1002/bip.22098

Niu, Y. F., Chai, R. S., Jin, G. L., Wang, H., Tang, C. X., & Zhang, Y. S. (2013). Responses of root architecture development to low phosphorus availability: A review. *Annals of Botany*, *112*(2), 391–408. doi:10.1093/aob/mcs285

Nürnberger, T., & Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: Emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(4), 318–324. doi:10.1016/S1369-5266(02)00265-0

Oñate-Sánchez, L., Anderson, J. P., Young, J., & Singh, K. B. (2007). AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiology*, *143*(1), 400–409. doi:10.1104/pp.106.086637

Ouyang, S.-Q., Liu, Y.-F., Liu, P., Lei, G., He, S.-J., Ma, B., … Chen, S.-Y. (2010). Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *62*, 316–329. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04146.x

Panigrahy, M., Rao, D. N., & Sarla, N. (2009). Molecular mechanisms in response to phosphate starvation in rice. *Biotechnology Advances*, *27*(4), 389–397. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.02.006

Pareek, A., Sopory, S. K., & Bohnert, H. J. (2010). *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. *Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. doi:10.1007/978-90-481-3112-9

Park, J.-Y., Jin, J., Lee, Y.-W., Kang, S., & Lee, Y.-H. (2009). Rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) infects Arabidopsis via a mechanism distinct from that required for the infection of rice. *Plant Physiology*, *149*(1), 474–486. doi:10.1104/pp.108.129536

Peng, T., Sun, H., Du, Y., Zhang, J., Li, J., Liu, Y., … Zhao, Q. (2013). Characterization and Expression Patterns of microRNAs Involved in Rice Grain Filling. *PLoS ONE*, *8*(1). doi:10.1371/journal.pone.0054148

Perez, I. B., & Brown, P. J. (2014). The role of ROS signaling in cross-tolerance: from model to crop. *Frontiers in Plant Science*, *5*(December), 1–6. doi:10.3389/fpls.2014.00754

Peterhansel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., & Schulze-Lefert, P. (1997). Interaction Analyses of Genes Required for Resistance Responses to Powdery Mildew in Barley Reveal Distinct Pathways Leading to Leaf Cell Death. *The Plant Cell*, *9*(8), 1397–1409. doi:10.1105/tpc.9.8.1397

Petutschnig, E. K., Jones, A. M. E., Serazetdinova, L., Lipka, U., & Lipka, V. (2010). The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(37), 28902–28911. doi:10.1074/jbc.M110.116657

Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., … Schulze-Lefert, P. (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology*, *129*(3), 1076–1085. doi:10.1104/pp.010954

Plancot, B., Santaella, C., Jaber, R., Kiefer-Meyer, M. C., Follet-Gueye, M.-L., Leprince, J., … Vicré-Gibouin, M. (2013). Deciphering the responses of root border-like cells of Arabidopsis and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology*, *163*(4), 1584–97. doi:10.1104/pp.113.222356

Plank, C. (1992). Plant analysis reference procedures for the southern region of the United States. *Southern Cooperative Series Bulletin (USA)*. Retrieved from http://www.fao.org/agris/search/display.do?f=./1993/v1913/US9314096.xml;US9314096

Popova, Y., Thayumanavan, P., Lonati, E., Agrochão, M., & Thevelein, J. M. (2010). Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(7), 2890–2895. doi:10.1073/pnas.0906546107

Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C. M. J., & Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, *147*(3), 1347–1357. doi:10.1104/pp.108.117523

Pritchard, L., & Birch, P. R. J. (2014). The zigzag model of plant-microbe interactions: is it time to move on? *Molecular Plant Pathology*, *15*(9), 865–870. doi:10.1111/mpp.12210

Qiao, Y., Jiang, W., Lee, J., Park, B., Choi, M. S., Piao, R., … Koh, H. J. (2010). SPL28 encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit μ1 (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, *185*(1), 258–274. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03047.x

Qiao-Ying, Z., Cun-Yi, Y., Qi-Bin, M., Xiu-Ping, L., Wen-Wen, D., & Hai, N. (2012). Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 182. doi:10.1186/1471-2229-12-182

Quilis, J., Peñas, G., Messeguer, J., Brugidou, C., & San Segundo, B. (2008). The Arabidopsis AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *21*(9), 1215–1231. doi:10.1094/MPMI-21-9-1215

Rama Devi, S. J. S., Madhav, M. S., Kumar, G. R., Goel, a. K., Umakanth, B., Jahnavi, B., & Viraktamath, B. C. (2013). Identification of abiotic stress miRNA transcription factor binding motifs (TFBMs) in rice. *Gene*, *531*(1), 15–22. doi:10.1016/j.gene.2013.08.060

Ray, S., Agarwal, P., Arora, R., Kapoor, S., & Tyagi, A. K. (2007). Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Molecular Genetics and Genomics*, *278*(5), 493–505. doi:10.1007/s00438-007-0267-4

Rebollar, A., & López-García, B. (2013). PAF104, a synthetic peptide to control rice blast disease by blocking appressorium formation in Magnaporthe oryzae. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *26*(12), 1407–16. doi:10.1094/MPMI-04-13-0110-R

Reddy, A. S. N., Ali, G. S., Celesnik, H., & Day, I. S. (2011). Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell*, *23*(6), 2010–2032. doi:10.1105/tpc.111.084988

Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L., & Desnos, T. (2006). Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, *29*(1), 115–125. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01405.x

Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, *25*(7), 2383–99. doi:10.1105/tpc.113.113159

Romeis, T., Ludwig, a a, Martin, R., & Jones, J. D. (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal*, *20*(20), 5556–5567. doi:10.1093/emboj/20.20.5556

Ruiz-Ferrer, V., & Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 485–510. doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092111

Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, *15*(5), 247–258. doi:10.1016/j.tplants.2010.02.006

Saijo, Y., Hata, S., Kyozuka, J., Shimamoto, K., & Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca^{+2}-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal*, *23*(3), 319–327. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00787.x

Sailaja, B., Anjum, N., Vishnu Prasanth, V., Sarla, N., Subrahmanyam, D., Voleti, S. R., … Mangrauthia, S. K. (2014). Comparative Study of Susceptible and Tolerant Genotype Reveals Efficient Recovery and Root System Contributes to Heat Stress Tolerance in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, *32*(6), 1228–1240. doi:10.1007/s11105-014-0728-y

Salinas, M., Xing, S., Höhmann, S., Berndtgen, R., & Huijser, P. (2012). Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta*, *235*(6), 1171–1184. doi:10.1007/s00425-011-1565-y

Sambrook, J., & W Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 999. Retrieved from http://books.google.com /books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover\npapers2://publication/uuid/BBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB

Sarowar, S., Kim, Y. J., Kim, K. D., Hwang, B. K., Ok, S. H., & Shin, J. S. (2009). Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports*, *28*, 419–427. doi:10.1007/s00299-008-0653-3

Schenk, G., Mitić, N., Hanson, G. R., & Comba, P. (2013). Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. *Coordination Chemistry Reviews*, *257*(2), 473–482. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.020

Schulz, P., Herde, M., & Romeis, T. (2013). Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development. *Plant Physiology*, *163*(2), 523–530. doi:10.1104/pp.113.222539

Schünmann, P. H. D., Richardson, A. E., Vickers, C. E., & Delhaize, E. (2004). Promoter analysis of the barley Pht1;1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiology*, *136*(4), 4205–4214. doi:10.1104/pp.104.045823

Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, *8*(4), 517–527. doi:10.1016/j.devcel.2005.01.018

Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., & Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology*, *138*(4), 1842–1852. doi:10.1104/pp.105.063537

Segura, a., Moreno, M., & Garcia-Olmedo, F. (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of Arabidopsis and spinach. *FEBS Letters*, *332*(3), 243–246. doi:10.1016/0014-5793(93)80641-7

Sesma, A., & Osbourn, A. E. (2004). The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*, *431*(7008), 582–586. doi:10.1038/nature02880

Shahmuradov, I. a., Gammerman, A. J., Hancock, J. M., Bramley, P. M., & Solovyev, V. V. (2003). PlantProm: A database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, *31*(1), 114–117. doi:10.1093/nar/gkg041

Shalom, L., Shlizerman, L., Zur, N., Doron-Faigenboim, A., Blumwald, E., & Sadka, A. (2015). Molecular characterization of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family from Citrus and the effect of fruit load on their expression. *Frontiers in Plant Science*, *6*(May), 1–10. doi:10.3389/fpls.2015.00389

Shanker, A. K., Maheswari, M., Yadav, S. K., Desai, S., Bhanu, D., Attal, N. B., & Venkateswarlu, B. (2014). Drought stress responses in crops. *Functional & Integrative Genomics*, *14*(1), 11–22. doi:10.1007/s10142-013-0356-x

Shimizu, A., Yanagihara, S., Kawasaki, S., & Ikehashi, H. (2004). Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *109*(7), 1361–1368. doi:10.1007/s00122-004-1751-4

Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.-J., Ono, K., Toki, S., & Takatsuji, H. (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *The Plant Cell*, *19*(6), 2064–2076. doi:10.1105/tpc.106.046250

Silber, A., Ben-Jaacov, J., Ackerman, A., Bar-Tal, A., Levkovitch, I., Matsevitz-Yosef, T., ... Granot, D. (2002). Interrelationship between phosphorus toxicity and sugar metabolism in *Verticordia plumosa* L. *Plant and Soil*, *245*(2), 249–260. doi:10.1023/A:1020432512980

Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(5), 430–436. doi:10.1016/S1369-5266(02)00289-3

Slater, a., Scott, N. W., & Fowler, M. R. (2008). *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants. 2nd ed.* (P. Oxford University, Ed.) (2nd. ed.). Oxford: Oxford University Press. Retrieved from http://hdl.handle.net/2086/2811

Smith, C. W., & Dilday, R. H. (2003). *Rice: Origin, History, Technology and Production*. (C. W. Smith & R. H. Dilday, Eds.). Jonh Wiley & Sons.

Staiger, D., Korneli, C., Lummer, M., & Navarro, L. (2013). Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. *New Phytologist*, (197), 394–404. doi:10.1111/nph.12022

Stein, M., & Somerville, S. C. (2002). MLO, a novel modulator of plant defenses and cell death, binds calmodulin. *Trends in Plant Science*. doi:10.1016/S1360-1385(02)02322-1

Steinhorst, L., & Kudla, J. (2013). Calcium and ROS rule the waves of signaling. *Plant Physiology*, *163*(October), 471–485. doi:10.1104/pp.113.222950

Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R. J., Chiou, S.-T., Frye, R. a, & York, J. D. (2005). Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(35), 12612–12617. doi:10.1073/pnas.0504172102

Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W.-R., & Bäurle, I. (2014). Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. *The Plant Cell*, *26*(4), 1792–1807. doi:10.1105/tpc.114.123851

Sun, S., Gu, M., Cao, Y., Huang, X., Zhang, X., Ai, P., … Xu, G. (2012). A Constitutive Expressed Phosphate Transporter, OsPht1;1, Modulates Phosphate Uptake and Translocation in Phosphate-Replete Rice. *Plant Physiology* (Vol. 159). doi:10.1104/pp.112.196345

Sunkar, R., Girke, T., Jain, P. K., & Zhu, J.-K. (2005). Cloning and characterization of microRNAs from rice. *The Plant Cell*, *17*(5), 1397–1411. doi:10.1105/tpc.105.031682

Sunkar, R., Zhou, X., Zheng, Y., Zhang, W., & Zhu, J.-K. (2008). Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology*, *8*, 25. doi:10.1186/1471-2229-8-25

Sunkar, R., & Zhu, J.-K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(8), 2001–2019. doi:10.1105/tpc.104.022830

Talbot, N. J. (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, *57*, 177–202. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090957

Tang, S., Wang, Y., Li, Z., Gui, Y., Xiao, B., Xie, J., … Fan, L. (2012a). Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC Plant Biology*, *12*(1), 28. doi:10.1186/1471-2229-12-28

Tang, Z., Zhang, L., Xu, C., Yuan, S., Zhang, F., Zheng, Y., & Zhao, C. (2012b). Uncovering Small RNA-Mediated Responses to Cold Stress in a Wheat Thermosensitive Genic Male-Sterile Line by Deep Sequencing. *Plant Physiology*, *159*(2), 721–738. doi:10.1104/pp.112.196048

Tapia, G., Morales-Quintana, L., Parra, C., Berbel, a., & Alcorta, M. (2013). Study of nsLTPs in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (LjLTP10) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. *Plant Molecular Biology*, *82*, 485–501. doi:10.1007/s11103-013-0080-x

Tena, G., Boudsocq, M., & Sheen, J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(5), 519–529. doi:10.1016/j.pbi.2011.05.006

Ticconi, C. a., & Abel, S. (2004). Short on phosphate: Plant surveillance and countermeasures. *Trends in Plant Science*, *9*(11), 548–555. doi:10.1111/j.1399-3054.2004.00394.x

Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J., & Weigel, D. (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of MicroRNA function in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, *6*(7), 1–10. doi:10.1371/journal.pgen.1001031

Tornero, P., Chao, R. a, Luthin, W. N., Goff, S. a, & Dangl, J. L. (2002). Large-Scale Structure -Function Analysis of the Arabidopsis RPM1 Disease Resistance Protein. *The Plant Cell Online*, *14*(2), 435–450. doi:10.1105/tpc.010393.436

Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, *138*(4), 414–429. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x

Turlapati, P. V., Kim, K. W., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2011). The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: Towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta*, *233*(3), 439–470. doi:10.1007/s00425-010-1298-3

Undan, J. R., Tamiru, M., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Takagi, H., … Terauchi, R. (2012). Mutation in *OsLMS*, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA binding motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes & Genetic Systems*, *87*(3), 169–179. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/87/3/87_169/_pdf

Valent, B., & Chumley, F. G. (1991). Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, *29*(c), 443–467. doi:10.1146/annurev.py.29.090191.002303

Van Leeuwen, W., Vermeer, J. E. M., Gadella, T. W. J., & Munnik, T. (2007). Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings. *Plant Journal*, *52*(6), 1014–1026. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03292.x

Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, *44*, 135–162. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425

Vargas, W. a., Martin, J. M. S., Rech, G. E., Rivera, L. P., Benito, E. P., Diaz-Minguez, J. M., … Sukno, S. a. (2012). Plant Defense Mechanisms Are Activated during Biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotricum graminicola* in Maize. *Plant Physiology*, *158*(3), 1342–1358. doi:10.1104/pp.111.190397

Vega-Sanchez, M. E., Verhertbruggen, Y., Christensen, U., Chen, X., Sharma, V., Varanasi, P., … Ronald, P. C. (2012). Loss of Cellulose Synthase-Like F6 Function Affects Mixed-Linkage Glucan Deposition, Cell Wall Mechanical Properties, and Defense Responses in Vegetative Tissues of Rice. *PLANT PHYSIOLOGY*. doi:10.1104/pp.112.195495

Vignols, F., Wigger, M., García-Garrido, J. M., Grellet, F., Kader, J. C., & Delseny, M. (1997). Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene*, *195*, 177–186. doi:10.1016/S0378-1119(97)00137-6

Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Vergoulis, T., Kanellos, I., … Hatzigeorgiou, a. G. (2014). DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally

supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D153–D159. doi:10.1093/nar/gku1215

Voinnet, O. (2008). Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(4), 464–470. doi:10.1016/j.pbi.2008.04.006

Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687. doi:10.1016/j.cell.2009.01.046

Wan, B., Lin, Y., & Mou, T. (2007). Expression of rice Ca^{2+}-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Letters*, *581*(6), 1179–1189. doi:10.1016/j.febslet.2007.02.030

Wang, C., Wei, Q., Zhang, K., Wang, L., Liu, F., Zhao, L., … Su, Z. (2013a). Down-regulation of OsSPX1 causes high sensitivity to cold and oxidative stresses in rice seedlings. *PLoS ONE*, *8*(12), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0081849

Wang, C. Y., Zhang, S., Yu, Y., Luo, Y. C., Liu, Q., Ju, C., … Chen, Y. Q. (2014). MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, 1132–1142. doi:10.1111/pbi.12222

Wang, C., Ying, S., Huang, H., Li, K., Wu, P., & Shou, H. (2009a). Involvement of OsSPX1 in phosphate homeostasis in rice. *Plant Journal*, *57*(5), 895–904. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03734.x

Wang, H., Makeen, K., Yan, Y., Cao, Y., Sun, S., & Xu, G. (2011). OsSIZ1 Regulates the Vegetative Growth and Reproductive Development in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, *29*(2), 411–417. doi:10.1007/s11105-010-0232-y

Wang, J. W., Czech, B., & Weigel, D. (2009b). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, *138*(4), 738–749. doi:10.1016/j.cell.2009.06.014

Wang, L., Cai, H., Bai, X., Li, L.-W., Li, Y., & Zhu, Y.-M. (2008). Cultivation of transgenic rice plants with OsCDPK7 gene and its salt tolerance. *Yi Chuan = Hereditas / Zhongguo Yi Chuan Xue Hui Bian Ji*, *30*(8), 1051–1055. doi:10.3724/SP.J.1005.2008.011051

Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R., & Hawkins, S. (2013b). Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 220. doi:10.3389/fpls.2013.00220

Wang, Y. H., & Irving, H. R. (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(4), 494–500. doi:10.4161/psb.6.4.14558

Wang, Z., Hu, H., Huang, H., Duan, K., Wu, Z., & Wu, P. (2009c). Regulation of OsSPX1 and OsSPX3 on expression of OsSPX domain genes and Pi-starvation signaling in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, *51*(7), 663–674. doi:10.1111/j.1744-7909.2009.00834.x

Warthmann, N., Chen, H., Ossowski, S., Weigel, D., & Herve, P. (2008). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS ONE*, *3*(3), 13–15. doi:10.1371/journal.pone.0001829

Wei, S., Hu, W., Deng, X., Zhang, Y., Liu, X., Zhao, X., … He, G. (2014). A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 133. doi:10.1186/1471-2229-14-133

Williamson, L. C., Ribrioux, S. P., Fitter, a H., & Leyser, H. M. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *126*(2), 875–882. doi:10.1104/pp.126.2.875

Wilson, R. a, & Talbot, N. J. (2009). Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews. Microbiology*, *7*(3), 185–195. doi:10.1038/nrmicro2032

Wissuwa, M. (2003). How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Small causes with big effects. *Plant Physiology*, *133*(4), 1947–1958. doi:10.1104/pp.103.029306

Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical Journal*, *322 (Pt 3*, 681–692.

Wu, C., Bordeos, A., Madamba, M. R. S., Baraoidan, M., Ramos, M., Wang, G. L., … Leung, H. (2008). Rice lesion mimic mutants with enhanced resistance to diseases. *Molecular Genetics and Genomics*, *279*(6), 605–619. doi:10.1007/s00438-008-0337-2

Wu, F., Shu, J., & Jin, W. (2014). Identification and validation of miRNAs associated with the resistance of maize (*Zea mays* L.) to Exserohilum turcicum. *PLoS ONE*, *9*(1), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0087251

Wu, L., Zhang, Q., Zhou, H., Ni, F., Wu, X., & Qi, Y. (2009). Rice MicroRNA effector complexes and targets. *The Plant Cell*, *21*(11), 3421–3435. doi:10.1105/tpc.109.070938

Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F., & Deng, X. W. (2003). Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiology*, *132*(3), 1260–1271. doi:10.1104/pp.103.021022

Wu, P., Shou, H., Xu, G., & Lian, X. (2013). Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(2), 205–212. doi:10.1016/j.pbi.2013.03.002

Xia, K., Wang, R., Ou, X., Fang, Z., Tian, C., Duan, J., … Zhang, M. (2012). OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0030039

Xiang, Y., Huang, Y., & Xiong, L. (2007). Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*, *144*(3), 1416–1428. doi:10.1104/pp.107.101295

Xie, K., Wu, C., & Xiong, L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology*, *142*(1), 280–293. doi:10.1104/pp.106.084475

Xing, T., Wang, X. J., Malik, K., & Miki, B. L. (2001). Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato

protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *14*(10), 1261–1264. doi:10.1094/mpmi.2001.14.10.1261

Xue-Fei, D., Na, C., Li, W., Xiao-Cui, Z., Bo, Q., Tian-Lai, L., & Guo-Liang, Z. (2012). The SnRK protein kinase family and the function of SnRK1 protein kinase. *International Journal of Agriculture and Biology*, *14*(4), 575–579.

Yang, D. L., Yang, Y., & He, Z. (2013). Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Molecular Plant*, *6*(3), 675–685. doi:10.1093/mp/sst056

Yang, G. D., Yan, K., Wu, B. J., Wang, Y. H., Gao, Y. X., & Zheng, C. C. (2012). Genomewide analysis of intronic microRNAs in rice and Arabidopsis. *Journal of Genetics*, *91*(3), 313–324. doi:10.1007/s12041-012-0199-6

Yang, L., & Huang, H. (2014). Roles of small RNAs in plant disease resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, *XXXX*(Xxxx), 1–9. doi:10.1111/jipb.12200

Ye, N., Jia, L., & Zhang, J. (2012). ABA signal in rice under stress conditions. *Rice*, *5*(1), 1. doi:10.1186/1939-8433-5-1

Ye, S., Wang, L., Xie, W., Wan, B., Li, X., & Lin, Y. (2009). Expression profile of calcium-dependent protein kinase (CDPKs) genes during the whole lifespan and under phytohormone treatment conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Plant Molecular Biology*, *70*(3), 311–325. doi:10.1007/s11103-009-9475-0

Yeats, T. H., & Rose, J. K. C. (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *17*(607), 191–198. doi:10.1110/ps.073300108

Yi, K., Wu, Z., Zhou, J., Du, L., Guo, L., Wu, Y., & Wu, P. (2005). OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiology*, *138*(4), 2087–2096. doi:10.1104/pp.105.063115

Yin, Z., Chen, J., Zeng, L., Goh, M., Leung, H., Khush, G. S., & Wang, G. L. (2000). Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *13*(8), 869–876. doi:10.1094/MPMI.2000.13.8.869

Yu, S., Galvao, V. C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., … Wang, J.-W. (2012). Gibberellin Regulates the Arabidopsis Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE Transcription Factors. *The Plant Cell*, *24*(8), 3320–3332. doi:10.1105/tpc.112.101014

Zhai, J., Arikit, S., Simon, S. A., Kingham, B. F., & Meyers, B. C. (2014). Rapid construction of parallel analysis of RNA end (PARE) libraries for Illumina sequencing. *Methods*, *67*(1), 84–90. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.025

Zhang, L., Li, X., Zhang, L., Li, B., Han, M., Liu, F., … Alva, A. K. (2014a). Role of abscisic acid (ABA) in modulating the responses of two apple rootstocks to drought stress. *Pakistan Journal of Botany*, *46*(1), 117–126.

Zhang, Q., & Wing, R. A. (2013). *Genetics and Genomics of Rice*. Springer Science & Business Media.

Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., … Ye, Z. (2011). Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters*, *33*(2), 403–409. doi:10.1007/s10529-010-0436-0

Zhang, Y. (2005). miRU: An automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Research*, *33*(SUPPL. 2). doi:10.1093/nar/gki383

Zhang, Y.-C., Yu, Y., Wang, C.-Y., Li, Z.-Y., Liu, Q., Xu, J., … Chen, Y.-Q. (2013). Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 848–52. doi:10.1038/nbt.2646

Zhang, Z., Liao, H., & Lucas, W. J. (2014b). Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *56*(3), 192–220. doi:10.1111/jipb.12163

Zhang, Z., Liu, X., Wang, X., Zhou, M., Zhou, X., Ye, X., & Wei, X. (2012). An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to Bipolaris sorokiniana and drought stresses through regulation of defense- and stress-related genes. *New Phytologist*, *196*(4), 1155–1170. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04353.x

Zhao, X., & Li, L. (2013). Comparative Analysis of MicroRNA Promoters in Arabidopsis and Rice. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, *11*(1), 56–60. doi:10.1016/j.gpb.2012.12.004

Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., … Wu, P. (2008). OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiology*, *146*(4), 1673–1686. doi:10.1104/pp.107.111443

Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4157–4168. doi:10.1093/jxb/erq237

Zhu, Q. H., Fan, L., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D., & Wilson, I. (2013). miR482 regulation of NBS-LRR defense genes during fungal pathogen infection in cotton. *PLoS ONE*, *8*(12). doi:10.1371/journal.pone.0084390

Zhu, Q. H., Spriggs, A., Matthew, L., Fan, L., Kennedy, G., Gubler, F., & Helliwell, C. (2008). A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome Research*, *18*(9), 1456–1465. doi:10.1101/gr.075572.107

Zhu, Q.-H., Upadhyaya, N. M., Gubler, F., & Helliwell, C. a. (2009). Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology*, *9*, 149. doi:10.1186/1471-2229-9-149

Zhu, T., Song, F., & Zheng, Z. (2006). Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Phytopathology*, *154*(6), 378–384. doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01110.x

Zhu, Y. (2001). Zinc (Zn)-phosphorus (P) Interactions in Two Cultivars of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Differing in P Uptake Efficiency. *Annals of Botany*, *88*(5), 941–945. doi:10.1006/anbo.2001.1522

Zottich, U., Da, M., Germana, C., Guilherme, B. D., Elenir, A., & Andre, A. O. (2014). The Toxicity of a Lipid Transfer Protein (Cc-LTP1) from *Coffea canephora* Seeds on the Larval Development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae), 422–431. doi:10.1007/s10930-014-9575-9

Zou, J.-J., Li, X.-D., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W.-X., Song, L.-F., … Wu, W.-H. (2015). Arabidopsis CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 Function in Abscisic Acid-Mediated Signaling and H_2O_2 Homeostasis in Stomatal Guard Cells under Drought Stress. *The Plant Cell*, *4*, tpc.15.00144. doi:10.1105/tpc.15.00144

Zurbriggen, M. D., Carrillo, N., & Hajirezaei, M.-R. (2010). ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling & Behavior*, *5*(4), 393–396. doi:10.4161/psb.5.4.10793

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

CRAG
CENTRE DE RECERCA EN AGROGENÒMICA
CSIC IRTA UPC

ITAIPU BINACIONAL

CONACYT