

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



Estudios para la identificación de la diana del
efector bacteriano *ptha4-at* de *Xanthomonas
citri*, que desencadena respuesta hipersensible
en plantas

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Ana Chuan Durá

TUTOR: José Gadea Vacas

COTUTORA: Roxana Andrea Roeschlin

Curso 2018-2019

Valencia, julio 2018

Título: Estudios para la identificación de la diana del efector bacteriano ptha4-at de *Xanthomonas citri*, que desencadena respuesta hipersensible en plantas

Autora: Ana Chuan Durá

Tutor: José Gadea Vacas

Cotutora: Roxana Andrea Roeschlin

Valencia, julio 2019

Resumen

Los TALEs (*transcription-activator like effectors*) de *Xanthomonas* funcionan como factores de transcripción eucariotas en las células vegetales, jugando un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades bacterianas mediante la inducción de genes de susceptibilidad del huésped. Los TALEs son translocados al núcleo de la célula vegetal y se unen a regiones promotoras de genes diana de las plantas, cuya transcripción facilita la colonización y propagación bacteriana. A lo largo de la evolución, algunas plantas se han aprovechado del mecanismo de funcionamiento de los TALEs para activar genes de resistencia, por medio de trampas de genes que contienen sitios de unión de efector en sus regiones promotoras, y cuya activación por el TALE correspondiente desencadena una respuesta de resistencia en el huésped. La variante A^T de *Xanthomonas citri* ssp. *citri* desencadena una respuesta hipersensible hospedante específica (HR) que suprime el desarrollo de la canchrosis de los cítricos. El efector bacteriano que desencadena este proceso es un TALE de 7.5 repeticiones llamado PthA4^{AT}. Sin embargo, debido a la corta longitud de este efector y al hecho de presentar dos repeticiones con reconocimiento ambiguo por dos o más bases, la secuencia diana de ADN tiene únicamente 8 pb y está presente muchas veces en el genoma de la planta. La gran cantidad de posibles dianas indica que es necesaria una comprensión más detallada del modo de acción de PthA4^{AT}, para identificar con éxito la causa de la inducción de la HR.

El objetivo principal de este TFG era evaluar la especificidad de este TALE para desencadenar la HR en *N. benthamiana*, con el fin de iniciar la búsqueda de genes diana responsables del disparo de la respuesta hipersensible. Utilizando un kit de construcción modular de biología sintética para TALEs, se elaboraron diferentes construcciones derivadas de PthA4^{AT}, se evaluaron para la HR en la planta modelo *Nicotiana benthamiana* y se compararon con el PthA4^{AT} natural, para identificar la especificidad de secuencia requerida por este efector para disparar la respuesta hipersensible. Los ensayos con las construcciones sintéticas planteadas en este trabajo han permitido ampliar el conocimiento acerca de la secuencia del gen diana responsable de la HR en el genoma de *N. benthamiana*, consiguiéndose reducir el número de bases posibles para dos de las posiciones del sitio de reconocimiento (la segunda y la cuarta). Del mismo modo, se llevó a cabo la extensión de la misma en dos posiciones (posiciones novena y décima del sitio de reconocimiento en el gen diana). Esto ha permitido acotar el número de posibles genes que podrían ser causantes del disparo de la HR tras la entrada en la célula de este efector bacteriano.

Palabras clave: *Xanthomonas*, efectores TAL, respuesta hipersensible, *Nicotiana benthamiana*, biología sintética

Title: Studies for the identification of the target of the bacterial effector ptha4-at from *Xanthomonas citri*, which triggers hypersensitive response in plants

Abstract

Transcription-activator like effectors (TALEs) of *Xanthomonas* function as eukaryotic transcription factors in plant cells, playing a central role in promoting bacterial disease by the induction of host susceptibility genes. TALEs are translocated into the plant cell nucleus and bind to the promoter regions of plant target genes whose transcription facilitate bacterial colonization and spread. Over the course of evolution, some plants have co-opted the TALE mechanism of gene activation for resistance, by means of gene traps that contain effector-binding-sites in their promoter regions, and whose activation by the corresponding TALE triggers a host resistance response. *Xanthomonas citri* ssp. *citri* variant A^T triggers a host-specific hypersensitive response (HR) that suppresses citrus canker development. The bacterial effector that elicits this process is a 7.5-repeats TALE called PthA4^{AT}. However, due to the low length of this effector, the target DNA sequence is only 8bp long and it is present many times within the plant genome. The large number of putative targets indicates that a more detailed understanding of the mode of action of PthA4^{AT} is needed to successfully identify the cause for the induction of HR.

The main objective of this TFG was to evaluate the specificity of this TALE to trigger HR in *N. benthamiana*, to initiate the search of target(s) gene(s) responsible for triggering the HR response. Using a synthetic biology modular construction kit for TALEs, different artificial PthA4^{AT} derivative constructs were built and assayed for HR in the model plant *Nicotiana benthamiana*, and compared to the natural PthA4^{AT}, in order to identify the sequence specificity required by this effector for triggering the HR. The trials with the synthetic constructs raised in this work have allowed expanding the knowledge about the sequence of the target gene responsible for the HR in the genome of *N. benthamiana*, being able to reduce the number of possible bases for two of the positions of the recognition site (the second and the fourth). In the same way, the extension of the same in two positions (positions ninth and tenth of the recognition site in the target gene) was carried out. This has allowed us to enclose the number of possible genes that could be the cause of the HR triggering after the entry into the cell of this bacterial effector.

Keywords: *Xanthomonas*, TAL effectors, hypersensitive response (HR), *Nicotiana benthamiana*, synthetic biology

Agradecimientos

En primer lugar, querría dar las gracias a mis tutores, Pepe y Roxana, por todo lo que me han enseñado en este tiempo y por la confianza que han puesto en mí. Gracias a Pepe por haber estado a mi lado desde el minuto cero y haberme dado la oportunidad de formar parte de un grupo de trabajo tan bueno para realizar este Trabajo. A Roxana quiero agradecerle todo lo que consiguió enseñarme en un mes y la implicación que ha mostrado conmigo en todo momento pese a la distancia.

Una parte fundamental de este Trabajo ha sido Lola. Muchas gracias por estar siempre para echarme una mano y por resolver todas mis “duditas” con paciencia y cariño. Gracias también a Regina, Vir, Paloma, Carmen, Ricardo y Rubén por ayudarme, compartir el día a día conmigo y animarme en todo momento. Quería agradecer también su ayuda a los miembros del 1.10, Gaetano, Joan, Edu e Irene.

Por último quería agradecer a mis padres por todo el apoyo que me han dado durante este tiempo y por recibirme siempre con una sonrisa, especialmente en esos momentos de agobio en los que las cosas no salían a la primera. Gracias también a mis amigos por apoyarme y estar siempre ahí para compartir buenos momentos y desconectar

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Interacción planta-patógeno	1
1.2 Efectores bacterianos y genes R	2
1.3 Efectores tipo TAL	3
1.3.1 Estructura de los efectores tipo TAL	4
1.3.2 Mecanismo de acción. TALEs en interacciones compatibles e incompatibles.....	5
1.4 Biología sintética. Efectores tipo TAL	6
1.5 Género <i>Xanthomonas</i> y su importancia en las enfermedades bacterianas de Plantas	7
1.5.1 Cancrosis de los cítricos.....	7
1.6 Antecedentes.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Material biológico	11
3.1.1 Material vegetal: <i>Nicotiana benthamiana</i>	11
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
3.2 Medios de cultivo	11
3.3 Construcción de los vectores de expresión TALEs	11
3.3.1 Construcción de los vectores de ensamblado	12
3.3.2 Construcción del vector destino	13
3.3.3 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	15
3.3.4 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	15
3.3.5 Comprobación del inserto	15
3.3.5.1 Enzimas de restricción	15
3.3.5.2 Geles de agarosa.....	16
3.3.6 Secuenciación para la comprobación de los vectores	16
3.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
3.5 Agroinfiltración	16
3.6 Análisis de la expresión de las proteínas por Western Blot	17
3.6.1 Preparación de las muestras.....	17
3.6.2 Separación de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE	17
3.6.3 Electrotransferencia	18
3.6.4 Tinción de la membrana	18
3.6.5 Inmunodetección de los efectores TALEs	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Diseño experimental	19
4.1.1 Sistema de clonado	19

4.1.2	Ejemplo para la construcción de un TALE sintético	21
4.1.3	Construcciones TALE realizadas en este trabajo	21
4.1.4	Metodología de los ensayos biológicos en <i>Nicotiana benthamiana</i>	23
4.2	Expresión de las construcciones en planta	23
4.3	Construcción de un efector pthA4 ^{AT} sintético utilizando módulos de biología sintética. Estimación del tiempo de aparición de HR	24
4.4	Evaluación de la especificidad de reconocimiento del efector TALE 1	25
4.5	Evaluación de la segunda repetición (N*) del TALE 1: reconocimiento a C versus T	26
4.6	Evaluación de la cuarta repetición (NS) del TALE 1: reconocimiento A, C, G o T	27
4.7	Extensión del efector TALE 1 a 9 RVDs para definir su secuencia de reconocimiento	28
4.8	Extensión del efector TALE 1 a 10 RVDs para definir su secuencia de reconocimiento	29
4.9	Redefinición final de la secuencia de reconocimiento del TALE 1	30
4.10	Propuesta de una diana del sitio de reconocimiento del gen responsable de la HR acorde a los resultados obtenidos	30
5.	DISCUSIÓN	32
6.	CONCLUSIONES	35
7.	BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Representación de la respuesta inmune en plantas mediante el modelo de Zigzag	1
Figura 2. Modelo estructural de un efector tipo TAL	4
Figura 3. Mecanismo de acción de los efectores tipo TAL una vez alcanzan el núcleo de la célula vegetal	5
Figura 4. Esquema de la construcción de los efectores tipo TAL utilizando la tecnología Golden TAL	19
Figura 5. Flujo de trabajo seguido desde la construcción inicial modular hasta el ensayo del efector en el organismo destino	20
Figura 6. Esquema de la construcción del TALE 6, de 7.5 repeticiones	21
Figura 7. Detalle del diseño experimental	23
Figura 8. Resultados Western Blot con el anticuerpo anti-GFP	24
Figura 9. Comprobación de la eficacia del TALE 1 sintético en el disparo de la HR	25
Figura 10. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 10 – 16	26
Figura 11. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 2, 4 y 11	27
Figura 12. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 4 – 8	27
Figura 13. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 17 – 20	28
Figura 14. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 21 – 32	29
Figura 15. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 33 - 38	30
Tabla 1. Módulos y vectores utilizados en este trabajo	12
Tabla 2. Vectores de ensamblado generados en este trabajo	13
Tabla 3. Vectores destino generados en este trabajo	14
Tabla 4. Secuencias de los cebadores empleados para la secuenciación de las construcciones generadas en este trabajo	16
Tabla 5. Nomenclatura de las RVDs y nucleótido/s de mayor afinidad de cada una de ellas	21
Tabla 6. Estado de las construcciones de los TALEs 1 – 42	22

Abreviaturas

AIM: medio de agroinfiltración

APS: persulfato de amonio

atm: Atmósfera

ATP: Adenosín trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: dicloro difenil tricloroetano

EBE: elemento de unión al efector (*effector binding element*)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

HR: respuesta hipersensible

kDa: kiloDalton

M: molar

mA: miliamperio

mg: miligramo

mL: mililitro

mM: micromolar

nm: nanómetro

OD₆₀₀ : densidad óptima a 600 nm

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PVDF: polifluoruro de vinilideno

p/v: peso/volumen

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato

TALE: *transcription activator-like effector*

TBE: Tris/Borate/EDTA

TBS: tampón fosfato salino

TEMED: terametiletildiamina

UV: ultravioleta

V: voltio

v/v: volumen /volumen

μM: micromolar

1. Introducción

1.1 Interacción planta-patógeno

En su entorno natural, las plantas además de hacer frente a numerosos estreses de tipo abiótico, coexisten con multitud de organismos patogénicos, como pueden ser los hongos y las bacterias. Sin embargo, este hecho no implica que la enfermedad sea el estado habitual de las plantas, es más bien una excepción. Esto es debido a los mecanismos basales de defensa de los que disponen las plantas frente a estos patógenos (Stall, 1995; Shah *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, la evolución de estos organismos ha llevado a que algunos de ellos hayan conseguido suprimir esta respuesta basal, de modo que se convierten en patógenos para la planta (Gürlebeck *et al.*, 2006).

De acuerdo a esto, las interacciones planta-patógeno se pueden clasificar en dos grupos: compatibles o incompatibles, lo que marcará la susceptibilidad o resistencia de la planta frente a la infección, respectivamente. Aquellas interacciones en las que hay incompatibilidad entre la planta y el patógeno tienen como resultado la resistencia de la planta, mientras que en el caso contrario, es decir, cuando la interacción entre ambos es compatible, la planta resulta susceptible (Keen, 1990).

Se conocen tradicionalmente dos líneas de defensa en el sistema inmune de las plantas: la inmunidad inducida por PAMPs (PTI) y la inmunidad inducida por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006), tal y como se observa en la Figura 1.

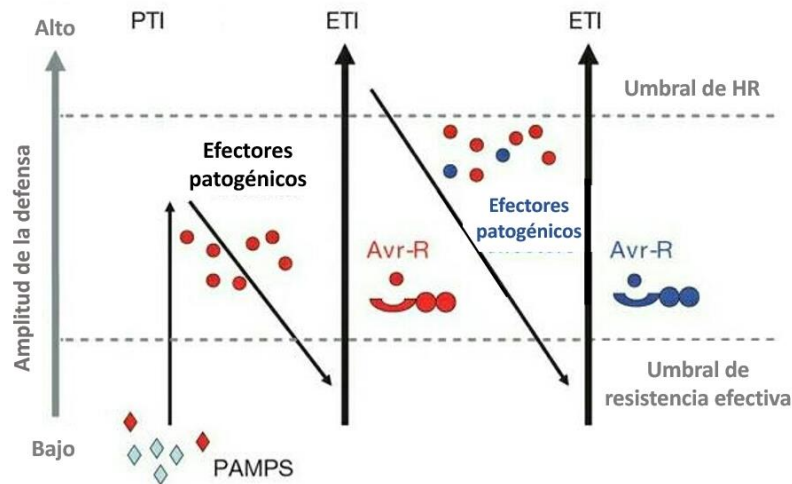


Figura 1. Representación de la respuesta inmune en plantas mediante el modelo de zigzag (Modificado de Jones y Dangl, 2006).

La PTI está basada en receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) asociados a la membrana plasmática, como son los de tipo quinasa (RLKs) o los de tipo proteico (RLPs), similares a los RLKs pero carentes del dominio quinasa (Kanyuka y Rudd, 2019). Estos receptores llevan a cabo el reconocimiento de moléculas altamente conservadas, características de los diferentes grupos de microorganismos. Son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos/microbios (PAMPs o MAMPs), y entre ellas se pueden

encontrar lipopolisacáridos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (PGN), factores de *quorum sensing* o flagelina, entre otros (Boller y Felix, 2009). Además de reconocer los patrones asociados al patógeno, algunos PRRs son capaces de reconocer señales de peligro derivadas de la propia planta. Estas señales se denominan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Algunos ejemplos de DAMPs son péptidos propios de la planta o fragmentos de la pared celular que se desprenden durante el proceso de infección.

La unión de los PAMPs o de los DAMPs a los receptores de tipo PRRs, causa la activación de los mismos, hecho que desencadena numerosos cambios fisiológicos en la planta que dan como resultado la inmunidad inducida por PAMPs (PTI). Algunos de estos cambios son estallidos de calcio y especies reactivas de oxígeno (ROS), así como la activación de proteínas quinasas asociadas a mitógenos (MAPK) y proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK), que conducen a una reprogramación masiva de la transcripción.

La PTI es suficiente para evitar la entrada de un elevado número de microorganismos. Algunos patógenos, sin embargo, liberan una serie de proteínas dentro de las células del hospedador, superando la PTI y favoreciendo la colonización del hospedador y por tanto la virulencia. Estas proteínas son conocidas como efectores bacterianos. La segunda línea de defensa de las plantas es la inmunidad inducida por efectores (ETI). Los genotipos de la misma especie hospedadora pueden poseer receptores intracelulares altamente variables conocidos como proteínas de resistencia (R), codificadas por los genes de resistencia (genes R). Estas proteínas R son capaces de detectar efectores específicos, así como controlar su actividad, lo que finalmente resulta en la activación de una nueva línea de defensa, la ETI. Este proceso está frecuentemente asociado a la muerte celular programada de la célula afectada, o lo que se conoce como respuesta hipersensible (HR) (Kanyuka y Rudd, 2019), que restringe el crecimiento del patógeno.

Cuando una proteína R se extiende entre los genotipos de las plantas hospedadoras, ya sea mediante la reproducción de las mismas o a través de la agricultura, el patógeno tiene dos opciones: o bien acumular mutaciones en el efector reconocido por la proteína R en cuestión, o bien, perder dicho efector, para evitar de este modo la ETI (Dangl *et al.*, 2013). El patógeno, además, puede desarrollar nuevos efectores capaces de suprimir la ETI inducida por otro efector. Por su parte, las plantas pueden desarrollar nuevas proteínas R que sean capaces de reconocer los nuevos tipos de efectores. Es por ello que la carrera entre el desarrollo de nuevos efectores por parte de los patógenos y de proteínas R por parte las plantas está en continua evolución, puesto que el objetivo de ambos es resultar beneficiado tras la interacción (Jones y Dangl, 2006; Paulus y van der Horn, 2018).

1.2 Efectores bacterianos y genes R

Los efectores pueden ser definidos como las proteínas cuya finalidad inicial es promover la virulencia del patógeno (llamándose factores de virulencia). Si, como ocurre en las interacciones donde se dispara una ETI, estos efectores son reconocidos por la planta e inducen respuestas de defensa en la misma, se denominan entonces factores de avirulencia.

Los efectores, inicialmente se identificaron de acuerdo a su capacidad para inducir una respuesta hipersensible en plantas resistentes (actividad de avirulencia). Se denominaron ese momento genes Avr, ya que su actividad, mediada por los genes R, inducía las defensas de la planta para prevenir la virulencia. Fue a posteriori cuando se comprendió que los efectores debían actuar de algún modo favoreciendo la actividad del patógeno, contribuyendo a la virulencia en los hospedadores susceptibles. La utilización del término efector en las interacciones planta-patógeno se extendió con el descubrimiento de que las bacterias Gram negativas patógenas de plantas utilizan un mecanismo específico para introducir proteínas en la célula hospedadora. Es el conocido como sistema de secreción tipo III (T3SS). El número de efectores de tipo III que las bacterias son capaces de introducir en las células del hospedador es elevado, pudiendo alcanzar según la cepa hasta los 100 efectores (Bent y Mackey, 2007; Hogenhout *et al.*, 2009).

Este sistema es utilizado por numerosas bacterias patógenas Gram negativas del género *Xanthomonas* para introducir un conjunto de efectores que interferirán en las rutas celulares eucarióticas, contribuyendo a la enfermedad o induciendo una respuesta inmune en la planta, al unirse a los genes específicos de la célula vegetal (Bogdanove *et al.*, 2010; Scholze y Boch, 2011). Así, la función principal de los efectores de tipo III es la supresión de la inmunidad innata o PTI. Muchos de ellos contribuyen a la virulencia suprimiendo las defensas basales que han sido previamente inducidas por PAMPs, mientras que otros efectores, como se ha dicho, suprimen la muerte celular causada por diferentes proteínas Avr, llevando a la infección.

1.3 Efectores tipo TAL

Los efectores de tipo III interactúan con el sistema inmune del hospedador mediante diferentes mecanismos. Los efectores estudiados han permitido describir cuáles son los procesos de la célula vegetal que actúan como diana de los efectores. Estos son 3 procesos fundamentales del sistema inmune vegetal: el recambio proteico, la homeostasis del RNA y las rutas de fosforilación (Block *et al.* 2008; Hogenhout *et al.*, 2009).

En el género *Xanthomonas* se han descrito dos clases de efectores de tipo III: los efectores de tipo TAL (*transcription activator-like*) y los efectores de tipo no-TAL. Los efectores de tipo no-TAL son un grupo de proteínas funcional y estructuralmente muy diversas. Son efectores de tipo III, pero en este caso, actúan principalmente a nivel citoplasmático. Muchos de ellos han sido caracterizados funcionalmente como factores de virulencia supresores de la PTI (Ryan *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2018).

Los efectores tipo TAL se pueden definir como un tipo de proteínas de bacterias patógenas de plantas con unas características funcionales específicas y una estructura común bastante conservada. Dentro de la célula vegetal, los TALEs se dirigen al núcleo, donde se unen a los promotores diana específicos e inducen la expresión de genes de la planta. Este sistema es utilizado por numerosas bacterias patógenas Gram negativas del género *Xanthomonas* para introducir un conjunto de efectores que interferirán en las rutas celulares eucarióticas,

contribuyendo a la enfermedad o induciendo una respuesta inmune en la planta, al unirse a los genes específicos de la célula vegetal. (Bogdanove *et al.*, 2010; Scholze y Boch, 2011).

1.3.1 Estructura de los efectores tipo TAL

Los efectores tipo TAL presentan una estructura proteica con regiones altamente conservadas entre todos los efectores existentes; son el dominio N-terminal y el dominio C-terminal. El dominio N-terminal contiene una señal de secreción necesaria para la secreción de los efectores por parte del sistema de secreción tipo III, y un dominio de translocación para entrar en la célula vegetal. Por su parte, el dominio C-terminal contiene señales de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación ácido (AAD), típico de los factores de transcripción eucarióticos.

La característica diferencial de cada TALE es el dominio central, formado por repeticiones casi idénticas en tándem. Cada una de estas repeticiones tiene generalmente una longitud de entre 33 y 35 aminoácidos, siendo la última repetición más corta, de unos 20 aminoácidos. Este conjunto de repeticiones es el que va a determinar la especificidad del TALE para unirse de forma selectiva al DNA de la planta, tal y como se observa en la Figura 2.

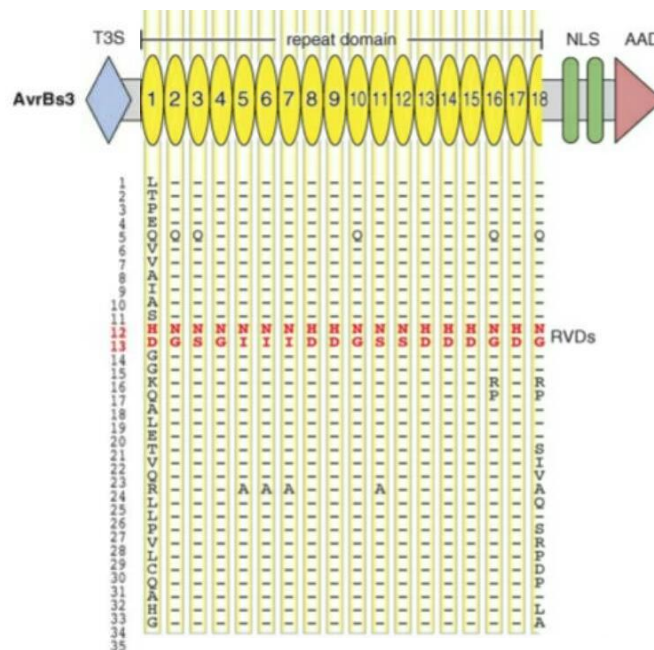


Figura 2. Modelo estructural de un efector tipo TAL, ejemplificado en el efector AvrBs3. El efector contiene en su dominio N-terminal una señal de secreción del sistema de secreción tipo III (T3S), las repeticiones centrales, y en su dominio C-terminal, una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación ácido (AAD) (Modificado de Bogdanove *et al.*, 2010).

De este modo, este sistema constituye un tipo de dominio de unión al DNA. Unos TALEs y otros se diferencian entre sí por el número de repeticiones, que suele oscilar entre 15.5 y 19.5 repeticiones, y también por los polimorfismos existentes entre estas repeticiones. Estos polimorfismos están limitados básicamente a dos residuos hipervariables, los aminoácidos 12 y 13, recibiendo el nombre de RVDs (*repeat-variable diresidues*).

Las diferentes RVDs se nombran de acuerdo a un código de dos letras, que hace referencia a los dos aminoácidos que las componen. El estudio de los diferentes TALEs conocidos ha establecido la existencia de, en torno a, 20 RVDs distintas. Cada RVD tiene una mayor afinidad por alguna de las cuatro bases de la secuencia del DNA (Scholze y Boch, 2011; Boch *et al.*, 2014). Moscou y Bogdanove (2009) observaron que HD era la RVD más frecuente y que tenía un alto grado de afinidad por la citosina (C). Las siguientes más comunes eran NG, con alta afinidad por la timina (T), NI, uniéndose principalmente a adenina (A) y NN, uniéndose frecuentemente a guanina (G), pero también a adenina (A), y en menor frecuencia a T o C. Estas cuatro RVDs constituyen alrededor del 75% de las totales presentes en los efectores de tipo TAL (Bogdanove *et al.*, 2010). Otras RVDs también presentes en los efectores son NS, con capacidad de unión a G, A, T o C, N*, que se une a C o T y HG, que tiene unas uniones similares a las de NG.

1.3.2 Mecanismo de acción. TALEs en interacciones compatibles e incompatibles

Respecto al mecanismo de acción de los efectores tipo TAL, una vez alcanzan el núcleo de la célula vegetal, se unen a una secuencia de bases específica del DNA, que recibe el nombre de elementos de unión del efector (EBEs), localizada en la zona promotora del gen o genes diana, y los activan transcripcionalmente, con la intervención de otras proteínas auxiliares. Estos genes son denominados genes de susceptibilidad (genes S) si su expresión promueve la enfermedad, o de resistencia (genes R) si el mecanismo de acción ha sido utilizado por la planta como trampa para disparar la transcripción de un gen que activa las defensas celulares (Bogdanove *et al.*, 2010; Yang y White, 2004; Zhang *et al.*, 2015), tal y como se observa en la Figura 3.

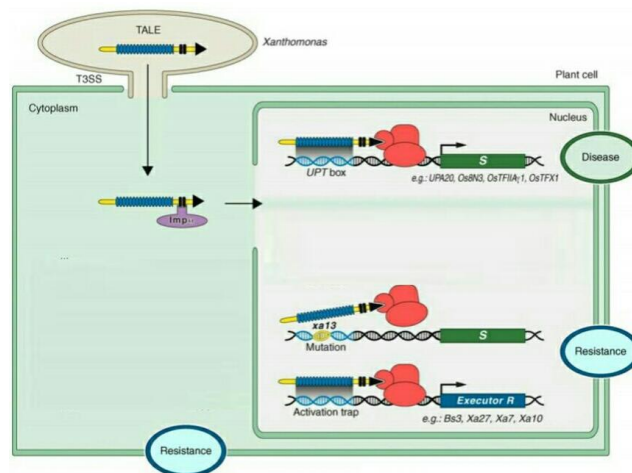


Figura 3. Mecanismo de acción de los efectores tipo TAL (Modificada de Bogdanove *et al.*, 2010).

Este tipo de gen R (gen de resistencia), heredado de forma dominante y transcripcionalmente controlado tras la translocación de un efector TAL contiene, por tanto, un dominio EBE en la zona promotora y una proteína codificada aguas abajo, la proteína ejecutora R, que tras la traducción desencadena la resistencia en la planta. La expresión de este grupo de genes únicamente tiene lugar cuando el efector adecuado se une al sitio EBE del

promotor, de ahí que se denominen genes R dependientes de los TALEs (Boch *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

El código utilizado por los TALEs fue definido al identificar ciertos TALEs y sus correspondientes EBEs (Boch *et al.*, 2009; Moscou y Bogdanove, 2009). La predicción de sitios EBE con la ayuda del código TALE, junto a los perfiles transcriptómicos de plantas infectadas, se han convertido en un método muy robusto para la identificación de nuevos genes diana de los TALEs en los hospedadores, lo que ha permitido el aislamiento de 5 genes R y numerosos genes S relacionados con estos efectores. Estos genes muestran una gran diversidad de secuencias, lo que hace pensar que los TALEs interfieren con un gran número de funciones celulares diferentes para promover la enfermedad o para inducir la respuesta inmune. Todos estos avances en el conocimiento del código TALE, junto los nuevos avances en la edición de genomas de especies vegetales, permite el desarrollo de cultivos resistentes a patógenos que actúan a través de efectores tipo TAL (Boch *et al.*, 2014).

1.4 Biología sintética. Efectores tipo TAL

Los efectores tipo TAL son translocados al interior de la célula vegetal, donde activan la transcripción de sus genes diana. El reconocimiento de esta secuencia diana viene marcada, como se ha dicho, por las repeticiones que forman la región central del efector. El reordenamiento de las repeticiones que componen los efectores permite el diseño de nuevos efectores tipo TAL, con dianas predecibles dentro de la secuencia del DNA. La creación de estas proteínas sintéticas con un reconocimiento específico de las secuencias de DNA deseadas es un método muy versátil, que proporciona un amplio abanico de posibilidades en el sector biotecnológico.

Geissler y colaboradores (2011) diseñaron una estrategia novedosa de clonado modular llamada "Golden TAL Technology", descrita con más detalle en Materiales y métodos, que permite la creación de efectores tipo TAL sintéticos con una composición determinada en cuanto a sus repeticiones. La construcción de proteínas TAL con repeticiones ordenadas es un reto debido a la composición tan similar de las repeticiones, lo que propició el desarrollo de esta estrategia de clonaje modular para el ensamblado de los TALEs. Este sistema de clonaje modular está basado en la utilización de enzimas de restricción de tipo II, que permiten reacciones de corte y ligación simultáneas, facilitando el proceso de ensamblado de los diferentes vectores hasta alcanzar la estructura final del efector TAL.

Estas proteínas sintéticas, además de ser funcionales en células vegetales, también lo son en células humanas y en la expresión dirigida de genes exógenos y endógenos. Se ha demostrado que estos TALEs son capaces de inducir la expresión dirigida de genes en células humanas y que la sustitución del dominio de activación (AD) del TALE por un dominio de activación de la proteína VP16 del virus herpes simple hizo aumentar notablemente la actividad transcripcional. También se observó, mediante la actividad de un gen reportero, que todos los TALEs expresados se localizaban en el núcleo, hecho que confirmó que la translocación del TALE al núcleo en este grupo de hospedadores se daba de forma correcta.

Como ejemplo en células vegetales, Mücke y colaboradores (2019) utilizaron los TALEs sintéticos para ampliar los conocimientos existentes acerca de la virulencia del patógeno *Xanthomonas oryzae* en arroz y facilitar con ello el desarrollo de nuevas formas de resistencia en dicha especie. Con el fin de entender las posibles dianas de los TALEs en las plantas, determinaron las secuencias genómicas de una cepa de *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) y caracterizaron las dianas de los TALEs en arroz. De este modo, mediante predicciones informáticas y datos transcriptómicos, fueron capaces de establecer 12 genes diana inducidos por los TALEs en arroz.

1.5 Género *Xanthomonas* y su importancia en las enfermedades bacterianas de plantas

El género *Xanthomonas* abarca 27 especies de bacterias Gram negativas causantes de enfermedades en cerca de 400 hospedadores vegetales. Las bacterias patogénicas del género *Xanthomonas* infectan a un elevado número de especies vegetales, causando graves enfermedades en una amplia variedad de cultivos de elevada importancia económica, como el arroz, los cítricos, la banana o el tomate. Algunos ejemplos de estas enfermedades sufridas por los cultivos son la bacteriosis vascular del arroz o la cancrrosis de los cítricos, causadas respectivamente por *X. oryzae* pv. (*pathovar*) *oryzae* y *X. axonopodis* pv. *Citri*.

Las especies bacterianas pueden comprender diferentes patovares, es decir, variantes patogénicas que se diferencian en el rango de hospedadores y/o en la especificidad a nivel de tejido. Las enfermedades causadas por *Xanthomonas* pueden tener su origen en semillas contaminadas o en otros factores que aparecen a lo largo de la vida de la planta y que son causantes de la invasión y la posterior enfermedad. Las bacterias, una vez alcanzada la planta, crecen inicialmente en la superficie de las hojas y posteriormente entran a través de aperturas naturales de la planta, como los estomas y los hidátodos, o a través de heridas. Una vez dentro, en función de su especificidad, se multiplican en los espacios intercelulares de los tejidos parenquimáticos del mesófilo y/o en elementos del xilema del sistema vascular. La entrada a través de estos hidátodos está promovida por cambios en las condiciones de humedad. Cuando la humedad es alta, tiene lugar un proceso de exudación y se acumulan gotas de gutación en los hidátodos, las cuales son colonizadas por las bacterias. Con la bajada de la humedad, las gotas junto a las bacterias van a parar al suelo, donde pueden sobrevivir estos microorganismos en asociación con material vegetal muerto, de modo que son capaces de infectar otros cultivos a través de heridas presentes en sus raíces (Kay y Bonas, 2009; Ryan *et al.*, 2011).

1.5.1 Cancrosis de los cítricos

La cancrrosis de los cítricos es una enfermedad que fue descrita inicialmente en Asia. Es causada por cinco cepas diferentes de *Xanthomonas citri* (*X. citri*), tres originarias de Asia (A, A* (suroeste asiático) y Aw (Florida)) y dos originadas en Sudamérica (B y C). Del grupo de Asia, *X. citri* pv. *citri* A, es el que tiene el rango de hospedadores más amplio y está extendido por todo el mundo, mientras que las cepas B y C (*X. citri* pv. *aurantifolii* B y C), tienen menos

hospedadores potenciales y únicamente se han descrito en Sudamérica (Stall y Seymour, 1983; Vojnov *et al.*, 2010).

La cepa A de *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (*X. citri*) es la causante de la mayor parte de los casos de cancrrosis de cítricos. *Xanthomonas citri* ssp. *citri* es un patógeno hemibiotrófico que crece en epifitas y que forma biopelículas en la superficie del hospedador como paso previo a la colonización de los espacios intercelulares a través de heridas o aperturas naturales, como los estomas (Roeschlin *et al.*, 2017). De los genes efectores de *X. citri* cabe destacar al efector pthA, perteneciente a la familia de genes AvrBS3/pthA. PthA juega un papel fundamental en la patogenicidad, y se encuentra en todas las bacterias del género *Xanthomonas* que causan la cancrrosis de los cítricos (Vojnov *et al.*, 2010). PthA4 es un efector de tipo TAL, cuya diana en cítricos es el gen LOB1, un factor de transcripción relacionado con el metabolismo de auxinas implicado en la hiperplasia y en la hipertrofia de las células infectadas (Roeschlin *et al.*, 2019). El efector PthA4 es capaz de reconocer sitios de unión a efectores (EBEs) en el promotor de CsLOB1 (Duan *et al.*, 2018).

Los síntomas propios de la cancrrosis de los cítricos son las lesiones necróticas que penetran la superficie de frutos y hojas, rodeadas de bordes de apariencia oleosa y anillos cloróticos de color amarillo. Todos los cultivares de cítricos son susceptibles de padecer la cancrrosis. El pomelo, la lima mexicana y el limón son altamente susceptibles, mientras que otros cítricos como las mandarinas son ligeramente resistentes (Brunings y Gabriel, 2004). Las frutas infectadas ven disminuidas sus características de cara al mercado, hecho que supone numerosas pérdidas económicas (Vojnov *et al.*, 2010). La cancrrosis de los cítricos es una de las enfermedades con mayor impacto económico dentro del sector de los cítricos a nivel mundial, por lo que en numerosos países existen leyes de cuarentena y erradicación para evitar la expansión de la enfermedad (Brunings y Gabriel, 2004).

Actualmente, no hay ninguna variedad comercial identificada que sea resistente a la cancrrosis de los cítricos, del mismo modo que no hay genes R asociados al género *Citrus* identificados (Roeschlin *et al.*, 2017; Murata *et al.*, 2019). Se están poniendo en práctica numerosas aproximaciones, basadas tanto en métodos tradicionales de mejora genética como en la producción de plantas transgénicas, con el fin de obtener variedades resistentes a la enfermedad. Así, se han obtenido plantas transgénicas que expresan proteínas antimicrobianas o genes de resistencia de otras especies vegetales y que, con ello, han mostrado una reducción en la severidad de los síntomas propios de la cancrrosis.

1.6 Antecedentes

En 2013, se identificó la variante natural no patogénica *X. citri* A^T, desencadenante de una respuesta hospedante-específica en la especie *Citrus limon* (Chiesa *et al.*, 2013). Esta bacteria conseguía desencadenar en plantas de limón y naranjo (*Citrus sinensis*) una respuesta defensiva, pero el efector bacteriano que la disparaba, así como el gen R a partir del cual se iniciaba la activación de dicha respuesta eran desconocidos (Roeschlin *et al.*, 2017).

La variante A^T de *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, como se ha dicho anteriormente, desencadena una respuesta hipersensible (HR) que impide el desarrollo de la cancrrosis de los cítricos, pero el efector que causa esta respuesta es desconocido. Se ha visto que un efector de tipo TALE de 7,5 repeticiones es el causante del desarrollo de la HR. Este efector es una variante más corta del efector patogénico PthA4. La variante AT, por tanto, no dispone del gen pthA4 que le permite inducir la hiperplasia en la planta, necesaria para el éxito de su infección, sino que además, este efector, de algún modo que aún no conocemos, es capaz de desencadenar en la planta una respuesta defensiva tipo ETI. Esto significa que el efector es reconocido por la planta, de modo que esta inicia una respuesta defensiva. Como todo efector TALE, pthA4^{AT} es capaz de unirse al DNA, específicamente a los sitios de unión de efectores (EBEs), de modo que se activa transcripcionalmente. Del mismo modo, esta unión y activación transcripcional, que darán lugar al disparo de la HR, requieren de la localización nuclear de pthA4^{AT}.

Para estudiar el efecto de la expresión de PthA4^{AT} en la activación de la HR en plantas no hospedadoras, se analizó la expresión del efector mediada por *Agrobacterium* en hojas de *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* y *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). PthA4^{AT} fue capaz de provocar muerte celular únicamente en las hojas de *N. benthamiana*, sugiriendo que era capaz de activar la HR en esta especie vegetal. Se realizaron ensayos con variantes de PthA4^{AT} y se comprobó que, al igual que sucede en cítricos, la acción del efector en *N. benthamiana* requiere, como se ha dicho antes, de una señal de localización nuclear, y además, para una respuesta más efectiva es necesario un dominio de activación (AD).

Este es el primer caso en el que un TALE de una longitud tan corta tiene una función biológica de este tipo, lo que hace pensar que la acción de estos efectores para reprogramar el transcriptoma del hospedador así como la capacidad para localizarse en el núcleo celular no está limitado a los clásicos TALEs de longitud más larga. Al tratarse de un efector de una longitud tan reducida, y conociendo el proceso de activación transcripcional mediado por los TALEs descrito anteriormente, es evidente que el número de posibles dianas en el genoma vegetal puede ser muy elevado, por lo que hasta que no se progresa en su estudio, la identificación del gen cuya activación dispara la HR observada (gen R) es una tarea difícil (Roeschlin *et al.*, 2019).

2. Objetivos

Este Trabajo de Final de Grado tiene como objetivo principal proponer una diana del sitio de reconocimiento del gen responsable de la HR que tiene lugar al infiltrar *Nicotiana benthamiana* con el efector sintético PthA4^{AT}.

Para alcanzar dicho objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

i. Comprobación de la eficiencia del efector sintético PthA4^{AT} y estimación del tiempo de aparición de la HR en plantas de *N. benthamiana* infiltradas con el efector sintético PthA4^{AT}.

ii. Evaluación de la especificidad de reconocimiento del efector sintético PthA4^{AT} para provocar el disparo de la respuesta hipersensible en *N. benthamiana*.

iii. Evaluación del reconocimiento nucleotídico de las repeticiones con código de reconocimiento ambiguo del efector sintético PthA4^{AT}, para provocar el disparo de la respuesta hipersensible en *N. benthamiana*.

iv. Acotación de la secuencia de reconocimiento mediante la extensión del efector sintético PthA4^{AT}.

3. Materiales y métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Material vegetal: *Nicotiana benthamiana*

Para los protocolos de transformación bacteriana mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) se utilizó la especie vegetal *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). Mayoritariamente se utilizaron plantas de alrededor de 6 semanas, alcanzando durante su desarrollo un tamaño de hoja de unos 13 centímetros. El crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de condiciones controladas, a una temperatura de 23 °C y con un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

3.1.2 *Escherichia coli*

Se utilizaron células de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (F' ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1).

3.1.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Para las transformaciones llevadas a cabo en *N. benthamiana* se utilizó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* (C58 (Rif^R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) GenR/StrepR nopaline).

3.2 Medios de cultivo

Tanto para el crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*) como de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) se empleó LB, medio complejo estándar para bacterias, ajustado a un valor de pH de 7, compuesto por triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). En caso de que el crecimiento bacteriano se realizara en medio sólido, se añadió agar al 2% (p/v). El medio fue autoclavado durante 20 minutos a 121°C y a 1 atm de presión.

Según el cultivo en crecimiento, fue necesaria la adición de antibióticos u otros compuestos, como el reactivo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), para efectuar la selección adecuada. En el caso de añadir X-gal, 1mL de X-gal 2% fue adicionado por cada 500 mL de medio LB. Los antibióticos fueron añadidos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 μ g/mL), kanamicina (50 μ g/mL), gentamicina (25 μ g/mL), espectinomycinina (50 μ g/mL) y tetraciclina (5 μ g/mL).

3.3 Construcción de los vectores de expresión TALEs

Se realizó el clonado de 42 vectores de expresión TALEs siguiendo la metodología de biología sintética denominada "Golden TAL Technology" descrita por Geissler y colaboradores (2011). Brevemente, mediante la utilización de una biblioteca de módulos, cada uno con una RVD concreta y sitios de restricción *Bpil*, se construyen vectores de ensamblado de hasta 6 RVDs. Tras ello, la construcción del vector de expresión o destino se lleva a cabo por corte en los sitios de restricción *BsaI* y el ensamblado de los vectores de ensamblado, junto con los extremos N-terminal y C-terminal de Hax3 (provenientes del efector TAL de *X. armoraciae*) para la expresión en *N. benthamiana*. Adicionalmente, a partir de los vectores de ensamblado,

se llevó a cabo la construcción de los vectores de expresión para *Xanthomonas*. Para ello, procedió del mismo modo que con los vectores para transformación de *Agrobacterium*, pero utilizando los extremos C-terminal y N-terminal adecuados (Tabla 1). Cabe destacar que estas reacciones de corte y ligación se pueden llevar a cabo en un único paso gracias a que *Bpil* y *Bsal* son enzimas de restricción de tipo II, capaces de cortar unos pares de bases más allá de su secuencia de reconocimiento.

	Nombre	Descripción	Resistencia
Módulos	RVDs	RVDs conteniendo las repeticiones NI, NG, NH, HD, NS, NN o N* flanqueadas por los sitios de restricción <i>Bpil</i> y extremos <i>Bsal</i> , que permite el ensamblado de hasta 6 RVDs.	Ampicilina
	N-terminal Hax3 (NTH3)	Extremo N-terminal del efector TAL Hax3 (<i>X. armoraciae</i>) fusionado a la proteína GFP y sitios de restricción externos <i>Bsal</i> .	
	C-terminal Hax3 (CTM WS Hax3)	Extremo C-terminal del efector TAL Hax3 (<i>X. armoraciae</i>) y sitios de restricción externos <i>Bsal</i> .	
	N-terminal <i>Xoo</i> (NT <i>Xoo</i>)	Extremo N-terminal del efector TAL <i>Xoo</i> (<i>X. oryzae</i>) y sitios de restricción externos <i>Bsal</i> .	
	C-terminal <i>Xoo</i> (CTM <i>Xoo</i>)	Extremo C-terminal del efector TAL <i>Xoo</i> (<i>X. oryzae</i>) y sitios de restricción externos <i>Bsal</i> .	
Vectores de ensamblado (AV)	LA	Vector de ensamblado con extremos <i>Bsal</i> "L left", que se une al extremo N-terminal del módulo NTH3/ NT <i>Xoo</i> y <i>Bsal</i> "A", que se une al extremo "A" del vector de ensamblado AR.	Kanamicina
	AR	Vector de ensamblado con extremos <i>Bsal</i> "R right", que se une con el extremo C-terminal CTM WS Hax3/CTM <i>Xoo</i> y <i>Bsal</i> "A", que se une al extremo "A" del vector de ensamblado LA.	
Vectores destino	pSKA2	Vector binario de expresión en plantas con promotor constitutivo 35SCaMV.	Espectinomomicina
	pSKX1	Vector de expresión en <i>Xanthomonas</i>	

Tabla 1. Módulos y vectores utilizados en este trabajo.

3.3.1 Construcción de los vectores de ensamblado

Para el clonado en los vectores de ensamblado (AV) el primer paso es decidir qué repeticiones (RVDs) van a conformar el vector. Se debe tener en cuenta que el número máximo de repeticiones que admiten los AV es 6. Para que el proceso de clonado tenga lugar correctamente, se deben elegir los distintos RVDs en función de la posición que ocuparán en el

vector de ensamblado. Asimismo, se debe considerar que la última repetición introducida tenga una señal de parada, para permitir la correcta ligación con el AV.

La reacción para la construcción de los vectores de ensamblado (AV) fue la siguiente: vector de ensamblado (LA o AR), ATP 5mM, tampón “Green” (ThermoFisher, 10X buffer G), la enzima T4 DNA ligasa (ThermoFisher, 5U/μL), la enzima Bpil (ThermoFisher, 10 U/μL), las repeticiones (RVDs) que van a conformar el vector de ensamblado final y agua Milli-Q® hasta alcanzar un volumen de reacción de 10 μL.

Esta mezcla de reacción fue introducida en un termociclador Surecycler® 8800 (Agilent Technologies®). Las condiciones para realizar el proceso de corte y ligación fueron las siguientes:

- 30 ciclos
 - o 37 °C 10 minutos
 - o 16 °C 10 minutos
- 37 °C 30 minutos
- 80 °C 10 minutos

Al finalizar la reacción, la mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de *E.coli* y se determinaron los clones positivos/negativos por la expresión de la enzima β-galactosidasa, purificación y corte con la enzima de restricción adecuada, tal y como se describe en los apartados 3.2, 3.3.4 y 3.3.5, respectivamente.

Los vectores de ensamblado (AV) generados en este trabajo han sido numerados del 1 al 42. Cada uno de ellos es del tipo LA o AR en función de cuál de estos vectores de ensamblado haya sido utilizado durante su construcción (Tabla 2)

Nombre del vector	RVDs	Nombre del vector	RVDs
LA-1	NI-N*-NG-NS	AR-22	HD-HD-NG-NG-HD-HD
LA-2	NI-HD-NG-NS	AR-23	HD-HD-NG-NG-HD-NN
LA-3	NI-NG-NG-NS	AR-24	HD-HD-NG-NG-HD-NG
LA-4	NI-N*-NG-NI	AR-25	HD-HD-NG-NG-NH-NI
LA-5	NI-N*-NG-HD	AR-26	HD-HD-NG-NG-NH-HD
LA-6	NI-N*-NG-NH	AR-27	HD-HD-NG-NG-NH-NN
LA-7	NI-N*-NG-NG	AR-28	HD-HD-NG-NG-NH-NG
LA-8	NI-N*-NG-NN	AR-29	HD-HD-NG-NG-NN-NI
AR-9	HD-HD-NG-NG	AR-30	HD-HD-NG-NG-NN-HD
LA-10	HD-N*-NG-NS	AR-31	HD-HD-NG-NG-NN-NN
LA-11	NI-NN-NG-NS	AR-32	HD-HD-NG-NG-NN-NG
LA-12	NI-N*-NI-NS	LA-33	NI-HD-NG-NH
AR-13	NN-HD-NG-NG	LA-34	NI-NG-NG-NH
AR-14	HD-NN-NG-NG	LA-35	NI-HD-NG-NG
AR-15	HD-HD-NN-NG	LA-36	NI-NG-NG-NG
AR-16	HD-HD-NG-NN	LA-37	NI-HD-NG-NN
AR-17	HD-HD-NG-NG-NI	LA-38	NI-NG-NG-NN
AR-18	HD-HD-NG-NG-HD	AR-39	HD-HD-NG-NG-NG-NI
AR-19	HD-HD-NG-NG-NN	AR-40	HD-HD-NG-NG-NG-HD
AR-20	HD-HD-NG-NG-NG	AR-41	HD-HD-NG-NG-NG-NN
AR-21	HD-HD-NG-NG-HD-NI	AR-42	HD-HD-NG-NG-NG-NG

Tabla 2. Vectores de ensamblado generados en este trabajo

3.3.2 Construcción del vector destino

Para el clonado en los vectores finales o destino (pSKA2 en este trabajo o pSKX1), es necesario seleccionar los vectores LA y AR obtenidos anteriormente que van a permitir la construcción del efector TAL final. De este modo, se deberá tomar la combinación de un vector de ensamblado de tipo LA y otro de tipo AR, que den la combinación de repeticiones deseada para la construcción final, tal y como se observa en la Tabla 3.

TALE	AV utilizados	Secuencia final
1	AV-1 (LA) + AV-9 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG
2	AV-2 (LA) + AV-9 (AR)	NI HD NG NS HD HD NG NG
3	AV-3 (LA) + AV-9 (AR)	NI NG NG NS HD HD NG NG
4	AV-4 (LA) + AV-9 (AR)	NI N* NG NI HD HD NG NG
5	AV-5 (LA) + AV-9 (AR)	NI N* NG HD HD HD NG NG
6	AV-6 (LA) + AV-9 (AR)	NI N* NG NH HD HD NG NG
7	AV-7(LA) + AV-9 (AR)	NI N* NG NG HD HD NG NG
8	AV-8 (LA) + AV-9 (AR)	NI N* NG NN HD HD NG NG
10	AV-10 (LA) + AV-9 (AR)	HD N* NG NS HD HD NG NG
11	AV-11(LA) + AV-9 (AR)	NI NN NG NS HD HD NG NG
12	AV-12 (LA) + AV-9 (AR)	NI N* NI NS HD HD NG NG
13	AV-1 (LA) + AV-13 (AR)	NI N* NG NS NN HD NG NG
14	AV-1 (LA) + AV-14 (AR)	NI N* NG NS HD NN NG NG
15	AV-1 (LA) + AV-15 (AR)	NI N* NG NS HD HD NN NG
16	AV-1 (LA) + AV-16 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NN
17	AV-1 (LA) + AV-17 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NI
18	AV-1 (LA) + AV-18 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG HD
19	AV-1 (LA) + AV-19 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NN
20	AV-1 (LA) + AV-20 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NG
21	AV-1 (LA) + AV-21 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG HD NI
22	AV-1 (LA) + AV-22 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG HD HD
23	AV-1 (LA) + AV-23 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG HD NN
24	AV-1 (LA) + AV-24 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG HD NG
25	AV-1 (LA) + AV-25 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NH NI
26	AV-1 (LA) + AV-26 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NH HD
27	AV-1 (LA) + AV-27 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NH NN
28	AV-1 (LA) + AV-28 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NH NG
29	AV-1 (LA) + AV-29 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NN NI
30	AV-1 (LA) + AV-30 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NN HD
31	AV-1 (LA) + AV-31 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NN NN
32	AV-1 (LA) + AV-32 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NN NG
33	AV-33 (LA) + AV-9 (AR)	NI HD NG NH HD HD NG NG
34	AV-34 (LA) + AV-9 (AR)	NI NG NG NH HD HD NG NG
35	AV-35 (LA) + AV-9 (AR)	NI HD NG NG HD HD NG NG
36	AV-36 (LA) + AV-9 (AR)	NI NG NG NG HD HD NG NG
37	AV-37 (LA) + AV-9 (AR)	NI HD NG NN HD HD NG NG
38	AV-38 (LA) + AV-9 (AR)	NI NG NG NN HD HD NG NG
39	AV-1 (LA) + AV-39 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NI
40	AV-1 (LA) + AV-40 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NG HD
41	AV-1 (LA) + AV-41 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NG NN
42	AV-1 (LA) + AV-42 (AR)	NI N* NG NS HD HD NG NG NG NG

Tabla 3. Vectores destino generados en este trabajo

La mezcla de reacción para el clonado en pSKA2 es la siguiente: el vector vacío pSKA2, el extremo C-terminal de Hax3 (CTM WS Hax3), el extremo N-terminal de Hax3 (NTM Hax3), los vectores LA y AR elegidos, la enzima BsaI (NEB, 10.000 U/mL), el tampón CutSmart 10X (NEB), la enzima T4 DNA ligasa (ThermoFisher, 5U/ μ L) y agua Milli-Q® hasta alcanzar un volumen de reacción de 10 μ L. Para el clonado en pSKX1, la mezcla de reacción variará en la utilización del vector vacío pSKX1 y en los extremos C-terminal o N-terminal adecuados (Hax3 o Xoo).

Para llevar a cabo el proceso de corte y ligación se siguieron las condiciones descritas previamente (apartado 3.3.1). Al finalizar la reacción, la mezcla de ligación fue utilizada para transformar células de *E. coli* competentes como se describe en el apartado 3.3.3. La selección de los clones positivos se realizó mediante la purificación y corte con enzima de restricción como se describe en el apartado 3.3.5.

3.3.3 Transformación de *Escherichia coli*

Partiendo de una alícuota de 100 μ L de células competentes, se adicionó la mezcla de ligación obtenida anteriormente y se incubó en hielo durante 20-30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó un choque térmico durante 1 minuto a 42°C y posteriormente las muestras se incubaron en hielo nuevamente (5 minutos). Tras estos minutos en hielo, se adicionaron 200 μ L de medio LB a cada uno de los tubos y se incubaron a 37°C sin agitación durante 1 hora. Por último, se sembraron 200 μ L del resultado de la transformación en placas de LB con el antibiótico o reactivo correspondiente.

En el caso de las transformaciones de los vectores de ensamblado, el medio sólido LB fue suplementado con kanamicina y con el reactivo X-gal para efectuar adecuadamente la selección de los clones positivos. Por otro lado, para las transformaciones de los vectores destino, a las placas de LB se les adicionó el antibiótico espectinomicina. Todos los antibióticos y compuestos fueron adicionados de acuerdo a las cantidades ya citadas.

3.3.4 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para corroborar a presencia del inserto en las cepas transformadas, se procedió al aislamiento del DNA plasmídico de *E. coli* a partir de cultivos overnight de las colonias, resuspendidas en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para el aislamiento del DNA se siguió el protocolo del kit NZYMiniprep de NZYTech. Finalmente, el material genético aislado se eluyó en 50 μ L de agua Milli-Q®.

Con el fin de medir la pureza y la concentración final obtenida tras el protocolo de purificación de DNA plasmídico, se utilizó el equipo ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop®).

3.3.5 Comprobación del inserto

3.3.5.1 Enzimas de restricción

Para la comprobación de la presencia de los insertos se realizaron cortes con las enzimas de restricción *Bsa*I y *Bam*HI, para los vectores AV y pSKA2/pSKX1, respectivamente.

En ambos casos se llevó a cabo la siguiente reacción: plásmido purificado del vector de ensamblado, tampón CutSmart 10x (NEB), enzima *Bsa*I (NEB, 10.000 U/mL) o *Bam*HI (ThermoFisher, 10 U/ μ L y agua Milli-Q®, hasta llegar a un volumen de 20 μ L. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. Los resultados de los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa, tal y como se describe en el apartado 3.3.5.2., estimando el tamaño de los fragmentos generados con los marcadores de pesos moleculares adecuados.

3.3.5.2 Geles de agarosa

Tras la reacción de restricción, la totalidad del producto obtenido se cargó en geles de agarosa con una concentración de 0,7% (p/v) preparados en tampón de electroforesis TBE 0,5X (TrisBase 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM). Tanto en el tampón de electroforesis como en el gel de agarosa se añadió bromuro de etidio (BrEt) 0,05% (p/v).

Como tampón de carga, se adicionó a las muestras fue el *Loading buffer* 6x (sacarosa 40% (p/v), EDTA 0,1 M y azul de bromofenol 0,25% (p/v)) y el marcador de pesos moleculares empleado fue el GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher®). La visualización de las bandas de DNA de los geles se realizó mediante iluminación UV utilizando el dispositivo UVIDOC HD2 (UVITEC Cambridge).

3.3.6 Secuenciación para la comprobación de los vectores

Todos los vectores generados en este trabajo fueron secuenciados a través del servicio de secuenciación del IBMCP, utilizando los cebadores de la Tabla 4.

Cebador	Secuencia	Descripción
Assembly seqR	5' GCTCACATGTTCTTTCCTGC 3'	Secuenciación AV
300seq695F	5' TGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG 3'	Secuenciación pSKA2
pSEQ2843R	5' AACCACTTGCGCGTGGTCGGCAAC 3'	

Tabla 4. Secuencias de los cebadores empleados para la secuenciación de las construcciones generadas en este Trabajo.

3.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Las construcciones finales de los TALEs obtenidas tras el protocolo de clonado, fueron transformadas en *A. tumefaciens* para hacer posible su expresión en planta. Partiendo de alícuotas de 100 µL de células competentes *A. tumefaciens*, se añadió 1 µg del plásmido correspondiente a la construcción presente en el vector destino pSKA2. La mezcla fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y se incubó a 37°C durante 5 min. Tras este tiempo, se añadieron 900 µL de medio LB con los antibióticos tetraciclina y gentamicina. Este cultivo se incubó 4 horas a 28°C en agitación a 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se extendieron 200 µL de las suspensiones en placas de LB suplementadas con los antibióticos tetraciclina, gentamicina y espectinomicina, a las concentraciones citadas en el apartado 3.2. Tras 2-3 días de incubación a 28°C en oscuridad, se seleccionaron dos clones independientes y una mezcla formada por varias colonias y se conservaron a -80°C con glicerol 20% para su posterior utilización en el protocolo de agroinfiltración.

3.5 Agroinfiltración

Para llevar a cabo la agroinfiltración se prepararon placas frescas de las cepas de *Agrobacterium* conteniendo la construcción a partir de los glicerizados y se dejaron crecer durante 2-3 días a 28°C. Pasado este tiempo, se tomó con un palillo plano estéril una porción de cada cultivo celular correspondiente a los diferentes TALEs y se resuspendió en tubos con 4 mL de medio AIM (MgCl₂ 1M, MES 0,5M, acetosiringona 100mM en DMSO y agua Milli-Q®). A

continuación, se midió la OD₆₀₀ en un espectrofotómetro (Biochrom™ WPA Biowave II UV-Vis Spectrophotometer), y se ajustó hasta alcanzar un valor en torno a 0,8. Con el fin de conseguir este valor, se añadió AIM o cultivo bacteriano, en función del valor obtenido en la medición inicial.

Una vez se ajustaron todas las soluciones, se procedió a la infiltración de dos hojas por planta de *N. benthamiana*. Para ello, se utilizaron jeringuillas de 2 mL y se infiltró por el envés de las hojas. En cada hoja se procedió a la infiltración de entre 8 y 12 construcciones. Cada planta de *N. benthamiana* fue considerada como una réplica biológica, y en este trabajo se realizaron 5 réplicas en cada proceso de agroinfiltración.

La observación del desarrollo de la muerte celular se realizó a las 48, 72 y 96 horas tras la infiltración. A estos tiempos se tomaron imágenes de todas las hojas, utilizando siempre la misma iluminación y posición de la cámara.

3.6 Análisis de la expresión de las proteínas por Western Blot

3.6.1 Preparación de las muestras

Se tomaron 9 discos de hoja 48 horas después de ser infiltradas con la ayuda de un sacabocados, obteniéndose discos de 5 mm de diámetro procedentes de diferentes réplicas biológicas. El material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su utilización. La disrupción del tejido vegetal se llevó a cabo añadiendo tampón Laemmli 5x (7,5% SDS, 0,1 M ditioeritritol, 10 mM EDTA, 30% sacarosa p/v, 0,25 mg/mL azul de bromofenol y 0,3 M Tris) y machacando las muestras mediante una varilla con punta cónica. Se hirvieron las muestras a 95°C durante 10 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad (13.000 rpm) durante un minuto, como paso previo a ser cargadas en el gel.

3.6.2 Separación de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y de grosor 1 mm. Para preparar la fase inferior del gel (*resolving gel*), se mezclaron 3 mL de tampón *resolving* (0,75 M Tris, 0,2% SDS, pH 6,8 ajustado con HCl), 1,5 ml de H₂O, 1,5 mL de acrilamida (acrilamida /bisacrilamida 38%/2%), y dos compuestos para favorecer la polimerización: 40 µL de APS 10% y 4 µL de TEMED. Se vertió esta mezcla entre dos cristales, se añadió isopropanol para eliminar burbujas, y una vez solidificado, se añadió la fase superior (*stacking gel*). Esta fase se preparó añadiendo 1,2 mL de tampón *stacking* (0,25 M Tris, 0,2% SDS, pH 6,8 ajustado con HCl), 1 mL de H₂O, 0,2 mL de acrilamida, 20 µL de APS 10% y 2 µL de TEMED.

Una vez el gel había polimerizado, se introdujo en la cubeta de electroforesis, a la que se añadió tampón de electroforesis 1x (0,19 M glicina, SDS 0,1%, ajustado a H 8,3 con Tris-base). Se cargó el marcador de pesos moleculares (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) y 15 µL de cada muestra con la ayuda de una jeringa Hamilton. Las muestras se dejaron correr durante 2 horas a 15 mA por cada uno de los geles.

3.6.3 Electrotransferencia

Como paso previo a la transferencia, la membrana de PVDF (BIO-RAD) fue activada sumergiéndola en metanol durante unos segundos. El proceso de transferencia se realizó a 100 V durante 3 horas a una temperatura de 4°C, con el fin de llevar las proteínas desde el gel hasta la membrana. Durante la transferencia se utilizó un dispositivo de transferencia tipo sándwich y el tampón de transferencia TOWBIN 1x (14,4 g/L glicina, 2 mL de SDS 10%, ajustado a pH 8,3 con Tris-base, 20% metanol).

3.6.4 Tinción de la membrana

Tras la transferencia, la membrana se incubó durante 10 minutos en Direct Blue [DB 71 al 0,1% diluido con solución de lavado (500 mL H₂O, 400 mL etanol absoluto y 100 mL ácido acético glacial)]. Pasado este tiempo, se dejó la membrana ya teñida en la solución de lavado durante 5 minutos y se escaneó. Finalmente, se destiñó utilizando la solución de desteñido (350 mL H₂O, 500 mL etanol absoluto, 150 mL NaHCO₃ 1 M).

3.6.5 Inmunodetección de los efectores TALs

La expresión de los efectores TAL fusionadas a GFP fue analizada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Roche®). Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se llevó a cabo el bloqueo de los sitios no específicos sumergiendo la membrana en una solución compuesta por TBS-T (0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6) y un 5% de leche no grasa durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C en una solución con TBS-T y el anticuerpo anti-GFP a una dilución 1: 2.000. Tras esta incubación se realizaron 5 lavados de 10 minutos en TBS-T en agitación y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (Anti-mouse IgG, GE Healthcae) a una dilución 1:5.000 durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo 3 lavados con TBS-T y se reveló por quimioluminiscencia (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) según las indicaciones del proveedor. Las imágenes fueron digitalizadas con el sistema LAS-3000 (FUJI).

4. Resultados

4.1 Diseño experimental

4.1.1 Sistema de clonado

Los diferentes TALEs fueron construidos utilizando los protocolos de la tecnología Golden TAL (Geissler *et al.*, 2011). Las repeticiones individuales se unieron y se subclonaron en vectores de ensamblado en bloques de un máximo de 6 repeticiones. Los dos vectores de ensamblado conteniendo los dos bloques de repeticiones (parte inicial (LA) y parte final (AR) del efector) se ensamblaron posteriormente en las construcciones finales en el vector destino adecuado, tal y como se muestra en la Figura 4.

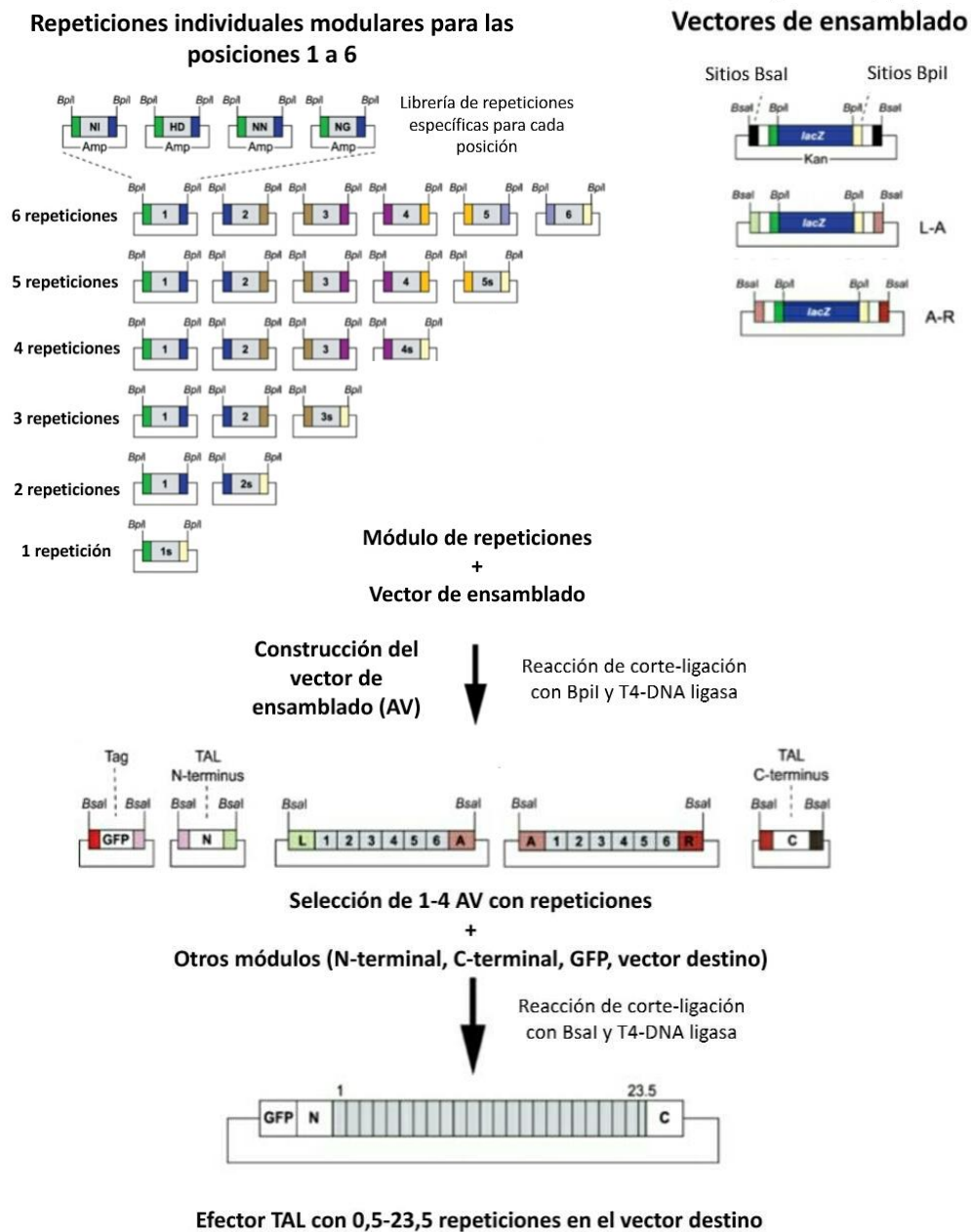


Figura 4. Esquema de la construcción de los efectores tipo TAL utilizando la tecnología Golden TAL (Modificado de Geissler *et al.*, 2011). A partir de los módulos individuales y de los vectores de ensamblado LA o AR, se construyen los vectores con las repeticiones pertinentes (AV). La combinación de 1 a 4 AVs, junto a un extremo N-terminal, un extremo C-terminal y un vector destino, permite la construcción del vector final.

Para la construcción del vector destino utilizado para la transformación de *A. tumefaciens* (pSKA2) se utilizó un módulo conteniendo la zona C-terminal del efector Hax3 de *X. armoriaciae*. El proceso es similar para construcción del vector destino utilizado para *Xanthomonas* y posterior translocación a cítricos. En este caso el vector utilizado es pSKX1, tal como se indica en Materiales y Métodos.

Como se ha indicado, en función de la planta en la que se pretenda probar la construcción se seguirá un camino u otro. En el caso de que la construcción vaya a ensayarse en *N. benthamiana* (tal y como sucede en este trabajo), el vector destino utilizado es pSKA2, y la construcción realizada se transforma en *A. tumefaciens*. Para la expresión de las construcciones en *Xanthomonas*, el proceso es distinto, ya que el vector destino utilizado es pSKX1 y el ensayo se realiza tras la expresión del efector en *Xanthomonas* e infección posterior a plantas de cítricos (la generación de algunos de estos vectores se ha iniciado en este trabajo). El flujo de trabajo seguido desde la construcción inicial modular hasta la expresión en el organismo se muestra en la Figura 5.

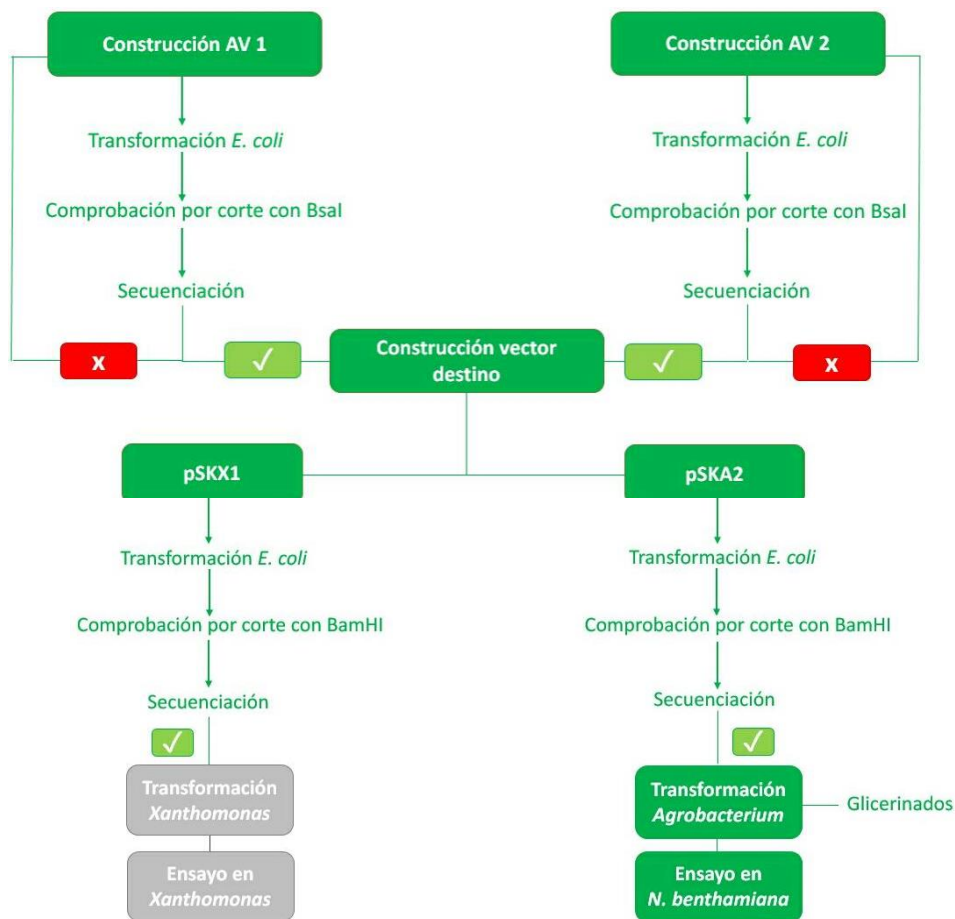


Figura 5. Flujo de trabajo seguido desde la construcción inicial modular hasta el ensayo del efector en el organismo destino.

4.1.2 Ejemplo de la construcción de un TALE sintético

Para ilustrar el proceso de construcción de un efector TAL sintético, se muestra como ejemplo el proceso de construcción del TALE 6, compuesto por las repeticiones con las siguientes RVDs en este orden: NI N* NG NH HD HD NG NG. Para ello, es necesaria la construcción de dos vectores de ensamblado, ya que este efector contiene 8 repeticiones, y cada uno de ellos admite un máximo de 6 repeticiones. Por tanto, se construye, por un lado, el vector de ensamblado 6 (AV-6) de tipo LA y por otro, el vector de ensamblado 9 (AV-9) de tipo AR, tal y como se representa en la Figura 6. Cada uno de ellos está compuesto por 4 repeticiones diferentes, el AV-6 por NI N* NG Y NH, y el AV-9 por HD HD NG NG. Una vez se han construido los dos vectores de ensamblado AV, se lleva a cabo la segunda reacción de ensamblado en el vector destino, pSKA2 en este caso, donde se combinan ambos vectores de ensamblado para dar lugar a la construcción del TALE final.

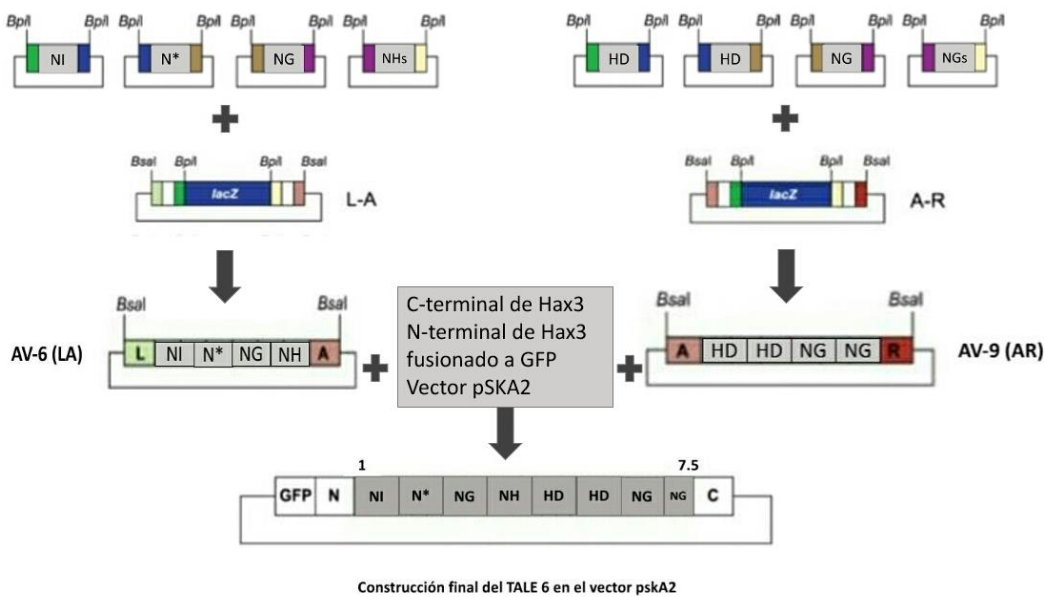


Figura 6. Esquema de la construcción del TALE 6, de 7.5 repeticiones. (Modificado de Geissler *et al.*, 2011).

4.1.3 Construcciones TALE realizadas en este trabajo

De acuerdo al ejemplo descrito en el apartado anterior, se han construido un total de 42 efectores TAL, cuya composición de RVDs se ve reflejada en la Tabla 3 de Materiales y métodos. Cada uno de los TALEs está compuesto por una combinación diferente de RVDs, correspondiendo cada una de esas RVDs a una pareja de aminoácidos, y presentando una afinidad diferente por cada uno de los cuatro nucleótidos del DNA, tal y como se muestra en la Tabla 5.

RVD (nomenclatura 2 letras)	RVD (nombre completo)	Nucleótido de mayor afinidad
HD	Histidina + Aspártico	C
NG	Asparagina + Glicina	T
NH	Asparagina + Histidina	G
NI	Asparagina + Isoleucina	A
NN	Asparagina + Asparagina	G, A >> C, T
NS	Asparagina + Serina	A, C, T, G
N*	Asparagina	C/T

Tabla 5. Nomenclatura de las RVDs y nucleótido/s de mayor afinidad de cada una de ellas.

Las construcciones finales de los TALEs han pasado a lo largo de su ensamblado por diferentes etapas durante el desarrollo de este trabajo: la construcción del vector de ensamblado, clonado en el vector destino (pSKA2 o pSKX1) y transformación en *A. tumefaciens* de las construcciones para *N. benthamiana*. La mayoría de las construcciones ha alcanzado el estado final, tal y como se muestra en la Tabla 6. En ella se verifica que cada construcción ha pasado por todos los estados hasta estar lista para su ensayo en *N. benthamiana*. Además, se muestra el estado de las construcciones para expresión en *Xanthomonas*. Las construcciones TALE 1–TALE 26 fueron realizadas de forma previa al inicio de este trabajo en el laboratorio del Dr. Jens Boch por la Dra. Roxana Roeschlin, en la Universidad de Leibniz (Hannover, Alemania). Estas construcciones ya realizadas fueron introducidas en *A. tumefaciens* durante la realización de este trabajo.

TALE	Vector de ensamblado	Clonado pskA2	Transformación <i>A. tumefaciens</i>	Clonado pskx1 (Hax3)	Clonado pskx1 (Xoo)
1	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓
21	✓	✓	✓	✓	✓
22	✓	✓	✓	✓	✓
23	✓	✓	✓	✓	✓
24	✓	✓	✓	✓	✓
25	✓	✓	✓	✓	✓
26	✓	✓	✓	✓	✓
27	✓	✓	✓	✓	✓
28	✓	✓	✓	✓	✓
29	✓	✓	✓	✓	✓
30	✓	✓	✓	✓	✓
31	✓	✓	✓	✓	✓
32	✓	✓	✓	✓	✓
33	✓	✓	✓	✓	✓
34	✓	✓	✓	✓	✓
35	✓	✓	✓	✓	✓
36	✓	✓	✓	✓	✓
37	✓	✓	✓	✓	✓
38	✓	✓	✓	✓	✓
39	✓	×	×	×	×
40	✓	×	×	×	×
41	✓	✓	×	×	×

42	✓	×	×	×	×
----	---	---	---	---	---

Tabla 6. Estado de las construcciones de los TALEs 1- 42. Las casillas marcadas en rojo hacen referencia a los procedimientos que fueron realizados previamente al inicio de este trabajo. Las casillas marcadas en verde muestran procedimientos realizados durante este trabajo. Las cruces indican los pasos no concluidos.

4.1.4 Metodología de los ensayos biológicos en *Nicotiana benthamiana*.

Tras la generación de las construcciones en el vector destino pSKA2, se llevó a cabo la transformación de *A. tumefaciens* de todos los TALEs. Para cada TALE, se conservaron varios clones independientes.

Inicialmente, se infiltró *Agrobacterium* sin ninguna construcción, para corroborar que no causaba ningún efecto en la planta (Figuras 7a y 7b). Para la infiltración de todos los TALEs, se utilizó el un clon de cada construcción, excepto del TALE 1, del que se utilizaron 4 clones. Las construcciones se separaron en dos bloques: de la 2 a la 20 y de la 21 a la 38. Cada bloque se dividió en dos hojas pertenecientes a la misma planta (Figura 7c). Se infiltraron 5 hojas con cada efector, empleando un tamaño de hoja similar en todas las infiltraciones, tal y como se observa en la Figura 7d.

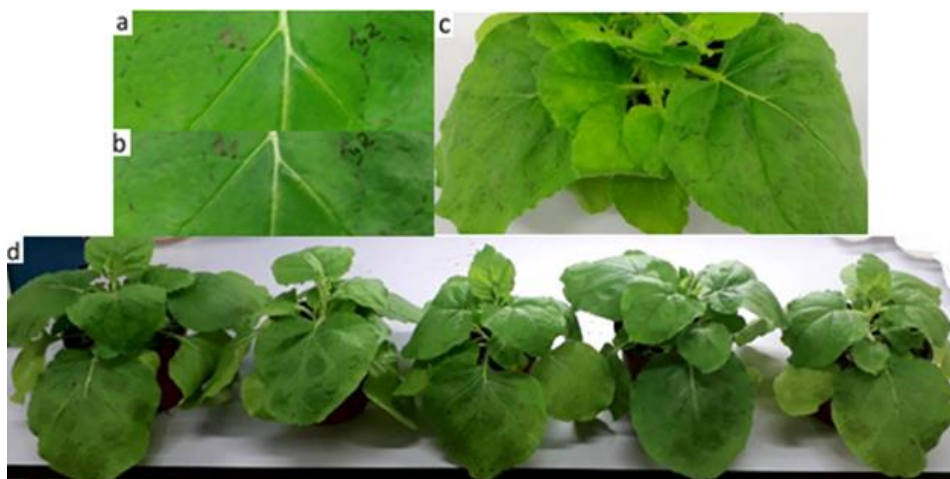


Figura 7. Detalle del diseño experimental. (a) y (b) 48 h post- infiltración con *Agrobacterium* y 96 h post- infiltración con *Agrobacterium* (c) Infiltración de 2 hojas de tamaño similar por planta (d) Réplicas biológicas utilizadas en cada ensayo de infiltración, en las que se aprecian los puntos de infiltración.

4.2 Expresión de las construcciones en planta

Para comprobar que las construcciones funcionan y los efectores se expresan correctamente en plantas de *N. benthamiana*, se realizaron infiltraciones con cada una de las diferentes construcciones y se extrajeron proteínas totales 48h después de la infiltración. La expresión de la proteína de fusión GFP-TALE se realizó con la técnica del Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-GFP. En la Figura 8 se puede observar la presencia una banda en todos los carriles correspondientes a las muestras a una altura de unos 125 KDa, que indican la presencia de la proteína de fusión GFP-TALE. En los TALE 23, 28 y 36, la banda es muy tenue y únicamente se observa cuando se sobreexpone la membrana (no presentado), con lo que la expresión de estos efectores en planta deberá ser comprobada en un nuevo Western Blot. De todos modos, estos efectores provocan HR, lo que sugiere que están siendo expresados.

Adicionalmente, se llevó a cabo la tinción de las membranas con el reactivo Direct Blue (Anexo I). La expresión de las construcciones de la 1 a la 20, a excepción del TALE 5, ya se había demostrado antes del inicio de este trabajo.

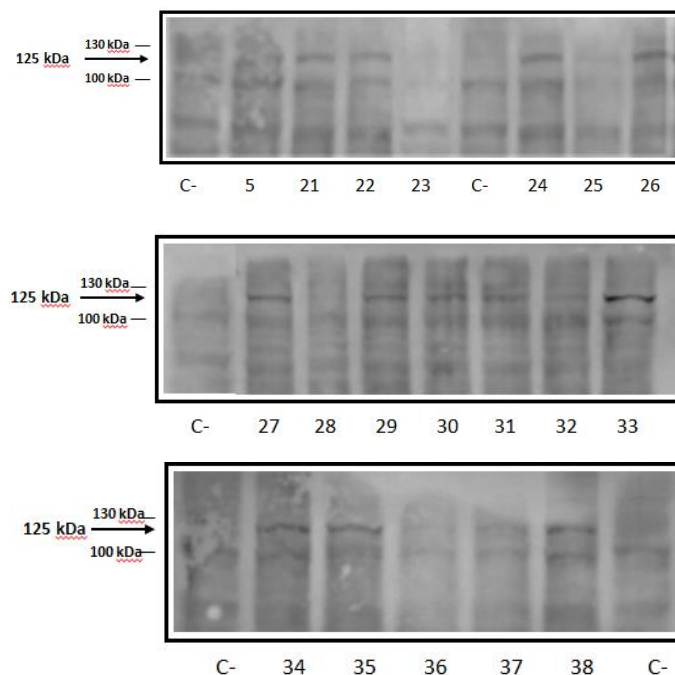


Figura 8. Resultados Western Blot con el anticuerpo anti-GFP. Membranas incubadas con el anticuerpo anti-GFP.

4.3 Construcción de un efector pthA4^{AT} sintético utilizando módulos de biología sintética. Estimación del tiempo de aparición de la HR.

De modo previo al inicio de este trabajo se construyó un efector pthA4^{AT} sintético mediante el sistema de clonado con módulos de biología sintética, Golden TAL, conteniendo exactamente el mismo número y tipo de repeticiones que pthA4^{AT}. Este efector sintético es el denominado en este trabajo como TALE 1. Se comprobó que el efector natural pthA4^{AT} y el efector sintético TALE 1 tenían la misma capacidad para desencadenar la respuesta hipersensible (HR) en la planta, tal y como se observa en la Figura 9a. En este trabajo, además de confirmar la capacidad del TALE 1 para provocar la HR, se pretendía estimar el tiempo de aparición de la misma. Para ello, se infiltraron 4 clones de esta construcción en *N. benthamiana*.

Se examinó la HR a las 48, 72 y 96 horas tras la infiltración, tal y como se observa en la Figura 9b. A las 48 horas, únicamente dos de los clones mostraron un inicio en la aparición de la HR. Con el paso de las horas, se podía apreciar respuesta hipersensible (HR) en los cuatro clones (72 horas), siendo más marcada en los dos clones donde apareció inicialmente. En la última observación, a las 96 horas, los 4 clones mostraron una HR muy marcada.



Figura 9. Comprobación de la eficacia del TALE 1 sintético en el disparo de la HR. (a) Expresión de cuatro clones del TALE 1 en *N. benthamiana* a diferentes tiempos. (a) (b) (c), 48, 72 y 96 horas post-infiltración, respectivamente.

Estos datos sugieren que la HR aparece igualmente en el TALE 1 sintético y en el TALE natural pthA4^{AT}, y que ésta aparece entre las 48h y las 72 horas, siendo la respuesta bastante similar en los diferentes clones ensayados. De todos modos, este experimento evidenció que existe un efecto dependiente del clon de *Agrobacterium* empleado y de la hoja infiltrada, que conviene tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados posteriores. Así, para los experimentos indicados a partir de ahora, compararemos para cada hoja/planta ensayada, el tiempo de aparición de la HR en cada efector ensayado respecto al tiempo en el que aparece la HR en el TALE 1.

4.4 Evaluación de la especificidad de reconocimiento del efector TALE 1.

Para evaluar en primer lugar que el efecto de la HR provocada en *N. benthamiana* por pthA4^{AT} se debe a su especificidad de reconocimiento de secuencia en el DNA, se modificaron algunas de las repeticiones (cambiando sus RVDs) con el fin de redirigir el efector a otros sitios del genoma de *N. benthamiana*. Teóricamente, al no reconocer ya las dianas originales del efector TALE 1 (similar en RVDs a pthA4^{AT}, desde ahora se utilizará el término TALE 1 para referirse a este efector), cada uno de estos nuevos efectores no debe disparar la HR. Con este fin, se evaluaron los TALEs 10 al 16, en los que se modificó una de las RVDs respecto al efector original (TALE 1), tal y como se observa a continuación:

TALE 1: NI N* NG NS HD HD NG NG
 TALE 10: HD N* NG NS HD HD NG NG
 TALE 11: NI NN NG NS HD HD NG NG
 TALE 12: NI N* NI NS HD HD NG NG
 TALE 13: NI N* NG NS NN HD NG NG
 TALE 14: NI N* NG NS HD NN NG NG
 TALE 15: NI N* NG NS HD HD NN NG
 TALE 16: NI N* NG NS HD HD NG NN

El TALE 10 ve modificada su primera RVD respecto al TALE 1, cambiando de NI a HD, y con ello la afinidad por el nucleótido (de A a C). La infiltración de este efector provocó la HR en *Nicotiana* (Figura 10), pero más suave que el TALE 1, lo que hace pensar que la primera posición del sitio de reconocimiento del efector (EBE) es A en el gen diana responsable de la HR, pero que, al tratarse de la primera posición, admitiría un desemparejamiento erróneo de nucleótidos (*missmatch*) en su estructura, de forma que un efector con RVD HD en esa

posición también se uniría. Alternativamente, podrían existir dos dianas responsables de la HR (una que contiene A a la posición 1 de su sitio de unión, y otra que contiene C).

La evaluación de los TALEs 11 al 15, en los que se modificó una de las RVDs centrales respecto al TALE 1, mostró que ninguna de estas construcciones generaba HR en la planta (Figura 10). Por último, dentro de este bloque, se observó que el TALE 16, con una sustitución de la última RVD, cambiando de NG a NN, y con ello la afinidad de T a G, también generaba HR (Figura 10), aunque en menor medida que el TALE 1.

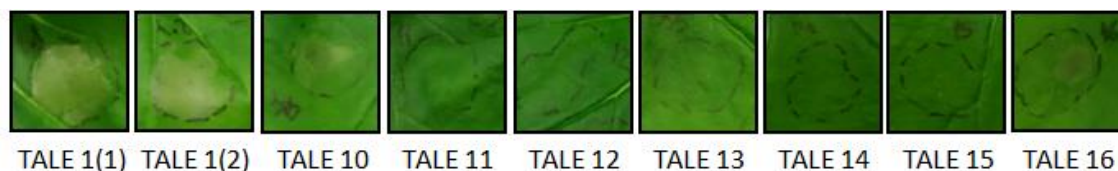


Figura 10. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 10 – 16. De izquierda a derecha se observa la HR presente en las hojas 72 h después de ser infiltradas con los TALEs 1 (clon 1), 1 (clon 2), 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16, respectivamente.

De este bloque de construcciones se puede concluir que el reconocimiento por parte del efector es específico. El cambio en el reconocimiento molecular al variar la mayoría de las posiciones evita la aparición de HR. Las únicas construcciones que no comparten estos resultados son TALE 10 y TALE 16, en las que se ha modificado una de las posiciones de los extremos. Estos resultados se pueden deber a la capacidad de aceptar un *missmatch* en la secuencia de reconocimiento del efector en las posiciones de los extremos de la unión DNA-efector. De todos modos, se observa que el código del TALE 1 (con NI en la primera posición y NG en la última) podría ser más específico al ocurrir la HR más tempranamente que en los TALEs 10 y 16.

4.5 Evaluación de la segunda repetición (N*) del TALE 1: reconocimiento a C versus T

Dado el pequeño tamaño del efector pthA4^{AT} (7,5 repeticiones frente a las 15,5 o más de la mayoría de los efectores TAL descritos), la predicción de genes diana del mismo (en base a la existencia del EBE o sitios de reconocimiento del efector en sus promotores) es complicada, dado que el número de dianas putativas será mayor cuanto menor sea la longitud del TALE. La predicción informática de dianas es compleja debido a la existencia de varias RVDs con posibilidades dobles (N*) o cuádruples (NN) en dicho TAL. La posición 2 del TALE original (TALE 1) contiene la RVD N*, que muestra afinidad por más de un nucleótido (C o T). Con el fin de conocer si el gen diana responsable de la HR contiene a esta posición del sitio de reconocimiento una C o una T, se evaluaron diferentes construcciones:

TALE 1: NI N* NG NS HD HD NG NG
 TALE 2: NI HD NG NS HD HD NG NG
 TALE 3: NI NG NG NS HD HD NG NG
 TALE 11: NI NN NG NS HD HD NG NG

Por un lado, se comparó la respuesta hipersensible (HR) en los TALEs 2 y 3 frente al TALE 1 (Figura 11), que contiene N* en la posición 2. El TALE 2 sustituye N* por HD (afinidad por C) y el TALE 3 lo hace por NG (afinidad por T). De estas dos construcciones, únicamente se observó HR al infiltrar *Nicotiana* con el TALE 3. De esto se puede deducir que la segunda

posición del sitio de reconocimiento del gen diana responsable de la HR debe estar ocupada por una T, pero no por una C, ya que el TALE 2 no provocó el disparo la HR.

Por otro lado, se estudió la respuesta del TALE 11 (Figura 11), en el que se cambió la segunda RVD del TALE 1(N*) por NN, afín por G. Con este cambio en la segunda posición del efector, tampoco hubo HR en la planta, lo que confirmó que el gen diana responsable de la HR debe contener T en la posición 2 del sitio de reconocimiento del efector en su promotor.

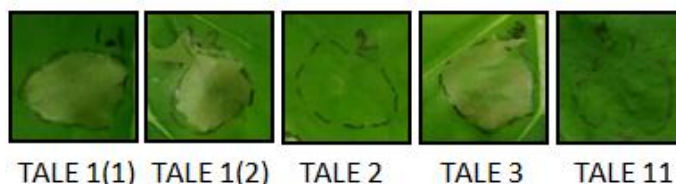


Figura 11. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 2, 3 y 11. De izquierda a derecha se observa la HR presente en las hojas 72 h después de ser infiltradas con los TALEs 1 (clon 1), 1 (clon 2), 2, 3 y 11, respectivamente.

4.6 Evaluación de la cuarta repetición (NS) del TALE 1: reconocimiento de A, C, G o T.

Del mismo modo, el TALE 1 presenta en la posición 4 la repetición NS, afín por los cuatro nucleótidos del DNA. Para evaluar la posición 4 del TALE en relación al reconocimiento del gen diana responsable de la HR, se construyeron los TALEs 4 al 8. Cada uno de ellos presenta una RVD diferente en la posición 4, de modo que su afinidad nucleotídica es ahora distinta. El TALE 4 presenta la repetición NI (afinidad por A), el TALE 5 tiene HD (afinidad por C), el TALE 7 tiene NG (afín por T) y los TALEs 6 y 8 tienen NH y NN respectivamente (ambas afines por G), tal y como se observa en las construcciones siguientes:

TALE 1: NI N* NG NS HD HD NG NG
 TALE 4: NI N* NG NI HD HD NG NG
 TALE 5: NI N* NG HD HD HD NG NG
 TALE 6: NI N* NG NH HD HD NG NG
 TALE 7: NI N* NG NG HD HD NG NG
 TALE 8: NI N* NG NN HD HD NG NG

Se evaluó la HR de cada uno de ellos, pudiéndose observar que el TALE 4 no provocó el desencadenamiento de la HR, mientras que los otros 4 efectores sí que lo hicieron, aunque con diferente intensidad, siendo el TALE 7, y sobre todo el TALE 5, los que provocaron una respuesta más intensa y temprana, tal y como se observa en la Figura 12.

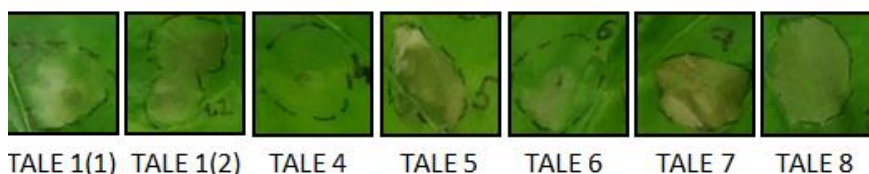


Figura 12. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 4 - 8. De izquierda a derecha se observa la HR presente en las hojas 72 h después de ser infiltradas con los TALEs 1 (clon 1), 1 (clon 2), 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

La primera conclusión que se puede extraer del estudio de este grupo de TALEs es que el gen diana responsable de la HR no presenta una A en la cuarta posición de su sitio de reconocimiento, ya que el TALE 4 presenta NI (afín por A en esta posición) y en las plantas

infiltradas con este efector no se observó HR. Respecto a las otras 3 bases que pueden ocupar la posición 4 del sitio de reconocimiento, no se puede definir una única base para esa posición en el gen diana responsable de la HR, ya que todas las plantas infiltradas con los efectores correspondientes a los TALEs 5-8 provocaron HR en mayor o menor medida. Esto hace pensar que la posición 4 del sitio de reconocimiento de gen diana responsable de la misma, podría ser C, G o T. El TALE 5 mostró una HR mucho más intensa y temprana que los otros efectores, de modo que tal vez C sea el nucleótido que contiene el gen responsable de la HR. Alternativamente, tanto C, como G o T podrían estar en la región de reconocimiento del gen o los genes que desencadenan la HR.

4.7 Extensión del efector TALE 1 a 9 RVDs para definir su secuencia de reconocimiento.

Para acotar aún más la especificidad de reconocimiento del efector TALE 1 en relación al disparo de la HR, se extendió el mismo por su extremo C-terminal, añadiendo una RVD más. Este procedimiento se plasmó en los TALEs 17 al 20, a los que se añadió, respectivamente, NI, HD, NN y NG, bases afines por A, C, G y T, en este orden:

TALE 1: NI N* NG NS HD HD NG NG
 TALE 17: NI N* NG NS HD HD NG NG NI
 TALE 18: NI N* NG NS HD HD NG NG HD
 TALE 19: NI N* NG NS HD HD NG NG NN
 TALE 20: NI N* NG NS HD HD NG NG NG

En este caso, todas las construcciones provocaron HR en la planta (Figura 13). De este resultado sorprendente se puede concluir que el efector podría ser capaz de reconocer 4 genes diana para disparar la HR. Sin embargo, también podría tratarse de un único gen responsable del disparo de la HR, que aceptaría en su secuencia de reconocimiento la presencia de RVDs para cualquiera de los 4 nucleótidos, es decir, aceptaría la presencia de un *missmatch*. En este último caso, estas construcciones no habrían aportado nueva información, ya que no han permitido acotar el sitio de reconocimiento. En el extremo 3' (C-terminal) es más complejo acotar las dianas, ya que mientras que las repeticiones en N-terminal suelen contribuir más a la afinidad de la unión de los TALEs, el extremo C-terminal es capaz de aceptar *missmatches* (Meckler *et al.*, 2013). En nuestro caso, estos efectores se unirían a cualquier diana coincidente hasta la última base reconocida por el último RVD (NG), independientemente de cuál fuera el siguiente nucleótido.



Figura 13. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 17 - 20. De izquierda a derecha se observa la HR presente en las hojas 72 h después de ser infiltradas con los TALEs 1 (clon 1), 1 (clon 2), 17, 18, 19 y 20, respectivamente.

Por otro lado, se ha observado que todos los TALEs que provocan HR y tienen como última repetición NG (TALEs 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 18, 19, 20), afín por T, dan una respuesta más marcada que el TALE 16, cuya última RVD es NN (afín por G). Este hecho da más consistencia a la idea de que la base correspondiente a esta posición en el sitio de reconocimiento del gen

diana responsable de la HR es una T (correspondiente a la RVD NG). De todos modos, esta conclusión debe confirmarse con futuros experimentos utilizando múltiples clones por efector.

4. 8 Extensión del efector TALE 1 a 10 RVDs para definir su secuencia de reconocimiento.

Con el fin de definir en mayor medida la especificidad de unión del efector al gen responsable de la HR, se extendieron los TALEs 17, 18, 19 y 20, añadiéndose una RVD más a cada uno de ellos, para los cuatro casos posibles de unión a un nucleótido. Las construcciones que extienden el TALE 17 no se han analizado en este trabajo. Se obtuvieron así los TALEs 21–24, 29-32 y 39-42. En este trabajo se estudiaron los TALEs 21-24 y 29-32, así como los TALEs 25-28, similares en cuanto a afinidad con aquellos provenientes del TALE 19, pero presentando en la novena posición la RVD NH (afín por G) en lugar de NN (afín por G y A), tal y como se puede observar a continuación:

TALE 21: NI N* NG NS HD HD NG NG HD NI	TALE 25: NI N* NG NS HD HD NG NG NH NI
TALE 22: NI N* NG NS HD HD NG NG HD HD	TALE 26: NI N* NG NS HD HD NG NG NH HD
TALE 23: NI N* NG NS HD HD NG NG HD NN	TALE 27: NI N* NG NS HD HD NG NG NH NN
TALE 24: NI N* NG NS HD HD NG NG HD NG	TALE 28: NI N* NG NS HD HD NG NG NH NG
TALE 29: NI N* NG NS HD HD NG NG NN NI	
TALE 30: NI N* NG NS HD HD NG NG NN HD	
TALE 31: NI N* NG NS HD HD NG NG NN NN	
TALE 32: NI N* NG NS HD HD NG NG NN NG	

Tras la infiltración de *N. benthamiana* con este set de TALEs, se pudo observar una similitud en el comportamiento de los TALEs 21, 25 y 29, así como en los TALEs 24, 28 y 32. El primer grupo no disparó la HR o fue muy suave y tardía (en el caso del TALE 21), mientras que los efectores del segundo grupo citado provocaron una HR con una intensidad mucho mayor incluso que el TALE 1 (Figura 14). La infiltración de las plantas con el resto de construcciones de este set de TALEs también provocó la HR, pero en menor medida que los TALEs 24, 28 y 32.

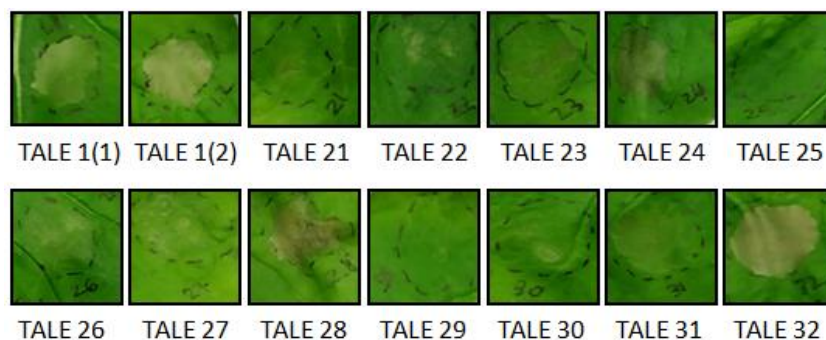


Figura 14. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 21 - 32. De izquierda a derecha se observa la HR presente en las hojas 72 h después de ser infiltradas con los TALEs 1 (clon 1), 1 (clon 2), y en los TALEs 21 - 32, respectivamente.

De estas observaciones podemos extraer dos conclusiones. La primera de ellas es que la posición 10 del sitio de reconocimiento del gen diana responsable de la HR no corresponde con una A, ya que los plantas infiltradas con los tres TALEs cuya última RVD era afín por A (21, 25 y 29), no mostraron HR. Por otro lado, la respuesta fue muy temprana e intensa en el caso de las plantas infiltradas con las construcciones correspondientes a los TALEs 24, 28 y 32,

coincidentes en su última RVD (NG), afín por T, hace pensar que la posición 10 del sitio de reconocimiento del gen diana responsable de la HR pueda estar ocupada por una T. En este caso, se permitiría un *missmatch*, y efectores con RVDs distintas a NG también podrían activar el gen.

4.9 Redefinición final de la secuencia de reconocimiento del TALE 1.

La construcción de los TALEs 33-38 se llevó a cabo con el fin de corroborar los resultados obtenidos acerca de la especificidad de reconocimiento para el TALE 1 en el promotor del gen responsable de la HR, concretamente en las posiciones 2 y 4 del sitio de unión. En estos 6 efectores tipo TAL se variaron las RVDs correspondientes a las posiciones 2 y 4, tal y como se refleja a continuación:

TALE 33: NI HD NG NH HD HD NG NG
 TALE 34: NI NG NG NH HD HD NG NG
 TALE 35: NI HD NG NG HD HD NG NG
 TALE 36: NI NG NG NG HD HD NG NG
 TALE 37: NI HD NG NN HD HD NG NG
 TALE 38: NI NG NG NN HD HD NG NG

De acuerdo a los resultados obtenidos en los apartados 4.5 y 4.6, la infección de *N. benthamiana* con las construcciones correspondientes a los TALEs 34, 36 y 38 dio lugar a HR (Figura 15). Esto permite confirmar que la posición 2 del sitio de reconocimiento del gen diana responsable de la HR debe ser T, ya que la segunda posición del efector en estas tres construcciones corresponde a la RVD HD (afín por T). Por el contrario, en las plantas infiltradas con los TALEs 33, 35 y 37, no se observó HR (Figura 15), hecho que confirma que la segunda posición del sitio de reconocimiento del gen diana causante de la HR no está ocupada por una C, ya que la RVD de estas construcciones es HD (afín por C).

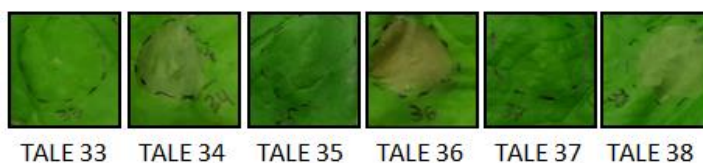


Figura 15. Aparición de HR en el TALE 1 y los TALEs 33 - 38. De izquierda a derecha se observa la HR presente en las hojas 72 h después de ser infiltradas con los TALEs 1 (clon 1), 1 (clon 2), 33, 34, 35, 36, 37 y 38, respectivamente.

Por otro lado, las 3 RVDs que están presentes en la posición 4 de los TALEs de este set, habían dado lugar a HR al ser infiltradas las plantas, tal y como se describe en el apartado 4.6. En este caso, en función del RVD de la posición 4, todas las plantas infiltradas con cada una de las construcciones de este set de TALEs deberían dar HR. Vemos que eso es lo que sucede si la especificidad de la posición 2 del sitio de reconocimiento del gen diana es la correcta (NG).

4.10. Propuesta de una diana del sitio de reconocimiento del gen responsable de la HR acorde a los resultados obtenidos.

De acuerdo a los diferentes planteamientos que se han desarrollado en este trabajo con el fin de disminuir la ambigüedad de las secuencias de reconocimiento del gen responsable de la HR, así como para incrementar la especificidad del efector para este gen, se ha

conseguido eliminar o reducir la ambigüedad de reconocimiento en las posiciones 2 y 4 del efector y se ha definido una posible base de reconocimiento para la posición 10 del EBE del gen diana responsable de la HR. Como resultado, se ha propuesto la siguiente secuencia para un efector más específico que dispare HR en *Nicotiana*:

NI NG NG HD (NG/NH/NN) HD HD NG NG XX NG (HD/NN)

Y la secuencia de gen diana responsable de la HR:

ATACCCTTXT

5. Discusión

La cancrrosis de los cítricos afecta a grandes extensiones cultivadas alrededor del mundo, siendo causante de grandes pérdidas económicas en el sector de los cítricos. La magnitud de este problema está directamente relacionada con el hecho de que no hay ningún gen R identificado asociado al género *Citrus* (Vojnov et al., 2010; Roeschlin et al., 2017).

Los efectores tipo TAL son proteínas secretadas por bacterias patogénicas del género *Xanthomonas* al interior de las células vegetales, donde son translocados al núcleo y provocan la activación transcripcional de ciertos genes (Mak et al., 2013). Hay ocasiones en que el mecanismo de acción de los TALEs es utilizado por la planta como trampa con el fin de disparar la transcripción de un gen que activa las defensas celulares (gen R) (Yang y White, 2004; Zhang et al., 2015). En este contexto, se ha visto que pthA4^{AT}, un efector bacteriano tipo TAL de corta longitud (7,5 repeticiones), es reconocido por un gen de resistencia (gen R) de *N. benthamiana*, todavía desconocido, y de este modo es capaz de provocar el desarrollo de la HR en *Nicotiana*. Roeschlin y colaboradores demostraron que la pre-inoculación de este efector tipo TAL confería resistencia frente a la cepa patogénica *X. citri*, y por tanto, frente a la cancrrosis. Este descubrimiento abre por tanto muchas puertas en la investigación para controlar el desarrollo de la cancrrosis en cítricos.

Anteriormente se habían observado TALEs de menor longitud como el de 1,5 repeticiones caracterizado por Wu y colaboradores (2007), pero estos efectores tan cortos no eran capaces de provocar la activación transcripcional en la célula vegetal, y eran reconocidos en el citoplasma de la célula. El caso de este efector de 7,5 repeticiones es diferente, ya que es el primer caso en el que un efector de un tamaño tan reducido es capaz de alcanzar el núcleo celular e interactuar con el transcriptoma de la célula vegetal, generando el mismo efecto que un TALE clásico de mayor longitud (Roeschlin et al., 2019). Sin embargo, el hecho de que el TALE sea tan corto supone un obstáculo a la hora de determinar el gen R causante de la respuesta observada en la planta, ya que este efector, debido a su longitud, es capaz de unirse a un número muy elevado de sitios en el genoma de la planta, por lo que el número de genes candidatos a ser el gen R responsable de la HR es muy elevado.

La aplicación de la biología sintética para el diseño de efectores tipo TAL permite sintetizar una cantidad de TALEs enorme, cada uno de ellos siendo capaz de reconocer de forma específica las dianas del genoma deseadas. Esta aplicación de la biología sintética además de en el genoma vegetal, se aplica en muchos otros ámbitos, como el estudio de las células humanas (Geissler et al., 2011). La predicción de posibles genes diana dentro del genoma vegetal puede ser abordada de diferentes maneras gracias a las metodologías existentes actualmente. Una estrategia para la predicción de genes diana es el empleo de programas informáticos que permitan recorrer los genomas completos para la predicción de dianas. Un ejemplo es "TALgetter", desarrollado por Grau y colaboradores (2013), que diseñado con el fin de predecir dianas de los efectores TAL de *Xanthomonas* permitió la determinación de sitios diana en arroz y naranja. Otro programa informático que permite el diseño de efectores, así como la predicción de los sitios de unión de los efectores tipo TAL en cualquier tipo de secuencia dada es "TALE-NT 2.0", diseñado por Doyle y colaboradores (2012).

En el presente trabajo, con el fin de reducir el número de genes candidatos a ser el gen R responsable de la HR, se ha utilizado la tecnología “Golden TAL” (Geissler *et al.*, 2011), basada en la biología sintética, que permite la construcción de efectores tipo TAL a partir de repeticiones individuales modulares, lo que posibilita el diseño de un número de construcciones diferentes muy elevado. Todas las construcciones de los diferentes sets de TALEs que se han citado fueron ensayados en *N. benthamiana*, ya que previamente se había comprobado que el sistema de efectores funcionaba correctamente en esta especie vegetal modelo (Roeschlin *et al.*, 2019). La construcción de los diferentes TALEs con variaciones respecto al TALE 1 (efector sintético de 7,5 repeticiones que desencadena la HR en la *N. benthamiana*) se llevó a cabo, por un lado, con el fin de eliminar ambigüedad en la secuencia de reconocimiento del mismo, ya que en su estructura contiene RVDs afines por más de un nucleótido de la secuencia del gen diana responsable de la HR. De acuerdo a este objetivo, se construyeron varios sets de TALEs para definir las posiciones 2 y 4 de la secuencia de reconocimiento. La posición 2 quedó definida, mientras que en la posición 4 no se pudo definir una única base, pero sí que se redujeron las posibles bases presentes en la secuencia de reconocimiento.

El otro objetivo principal del trabajo era acotar en mayor medida la secuencia de reconocimiento en el promotor del gen diana desencadenante de la HR, para lo que se extendió en una o dos RVDs por su extremo C-terminal. Esta extensión del efector sintético tiene el objetivo de aumentar la especificidad de la secuencia del gen diana en el genoma de *N. benthamiana*. Inicialmente se diseñó un set de TALEs a los que se les añadió una RVD extra en el C-terminal, pero el ensayo en planta de todos ellos dio lugar a HR en las mismas. Este resultado no permitió identificar la base que el promotor del gen responsable de la HR tiene en esa posición. Este resultado, sin embargo, no es sorprendente, ya que concuerda con la idea planteada por Meckler y colaboradores (2013) de que las modificaciones en el extremo 5' de los efectores TAL disminuyen considerablemente la afinidad de unión al sitio de reconocimiento del gen diana responsable de la HR, mientras que en el extremo 3' no sucede así, se aceptan los *missmatches*, la afinidad por las cuatro bases. Aún así, una de las posibles bases quedó descartada, y otra ganó fuerza como posible base de la secuencia de reconocimiento para la posición dada, ya que la respuesta que provocó en *N. benthamiana* fue notablemente mayor que las otras construcciones.

El ensayo de los efectores tipo TAL en *N. benthamiana* tiene el objetivo de identificar el gen R responsable de la HR en esta especie modelo. Este mecanismo puede similar al que ocurre en cítricos, o bien identificar genes diana diferentes causantes de HR. Para comprobarlo, todas las construcciones se han clonado en vectores de expresión de *Xanthomonas*, y serán ensayadas en cítricos en un futuro. Los ensayos en *N. benthamiana* dieron como resultado construcciones que provocaron la HR en planta y otras que no lo hicieron, lo que permitió establecer una secuencia consenso, tal y como se ha explicado anteriormente. Con esta secuencia consenso el siguiente objetivo sería llevar a cabo la búsqueda de dianas en el genoma junto a un RNA-seq. Se realizaría un análisis transcriptómico de todas estas plantas infiltradas para proceder a la búsqueda de genes diana en base a su presencia en el grupo de plantas con la respuesta hipersensible disparada y su ausencia en las plantas que no dieron respuesta, tal y como plantearon Strauss y colaboradores (2012), en

cuyo caso les permitió identificar un gen R candidato, posteriormente confirmado, encargado del reconocimiento de la proteína efectora tipo TAL AvrBs4 de *Xanthomonas*.

6. Conclusiones

- El clonado de efectores bacterianos mediante los métodos de la biología sintética es más sencillo en comparación a las metodologías de clonado tradicionales, lo que ha permitido que en el presente Trabajo se hayan diseñado 42 efectores tipo TAL sintéticos.
- Los efectores tipo TAL construidos mediante biología sintética son capaces de alcanzar el núcleo de la célula vegetal y provocar una respuesta en la planta del mismo modo que los efectores tipo TAL naturales.
- La construcción de TALEs sintéticos, cada uno de ellos con una RVD modificada respecto al TALE 1, ha permitido concluir que el reconocimiento por parte del efector es específico de secuencia, aunque admite un *missmatch* en las RVDs de los extremos.
- Se ha conseguido acotar los posibles nucleótidos de la secuencia de reconocimiento del gen diana responsable de la HR en las posiciones 2 y 4. Se ha concluido que la posición 2 de este gen diana estaría ocupada por una T y no por una C, mientras que la cuarta posición podría estar ocupada por cualquiera de los cuatro nucleótidos menos por A.
- La extensión de una RVDs más allá de la secuencia del efector natural no ha permitido obtener nueva información acerca de la secuencia de reconocimiento del gen diana responsable de la HR.
- La extensión de dos RVDs más allá de la secuencia del efector natural ha permitido concluir que la posición 10 de la secuencia de reconocimiento del gen diana responsable de la HR no estaría ocupada por una A. Cualquiera de las otras tres bases (C, G o T) podría ocupar esa posición, pero en base a las respuestas observadas en *N. benthamiana*, parece más probable que esa base sea T.
- En resumen, los ensayos en planta de las construcciones generadas han permitido acotar la secuencia del sitio de reconocimiento del gen diana responsable del desencadenamiento de la HR en *N. benthamiana*.

7. Bibliografía

- Bent, A. and Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and RGenes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), pp.399-436.
- Block, A., Li, G., Fu, Z. Q., and Alfano, J. R. 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 11:396-403.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326(5959), pp.1509-1512.
- Boch, J., Bonas, U. and Lahaye, T. (2014). TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist*, 204(4), pp.823-832.
- Bogdanove, A., Schornack, S. and Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), pp.394-401.
- Boller T, Felix G: A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 2009, 60:379-406.
- Brunings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 4:141–157
- Chiesa, M., Siciliano, M., Ornella, L., Roeschlin, R., Favaro, M., Delgado, N., Sendín, L., Orce, I., Ploper, L., Vojnov, A., Vacas, J., Filippone, M., Castagnaro, A. and Marano, M. (2013). Characterization of a Variant of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that Triggers a Host-Specific Defense Response. *Phytopathology*, 103(6), pp.555-564.
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ: Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 2013, 341:746-751.
- Doyle, E., Booher, N., Standage, D., Voytas, D., Brendel, V., VanDyk, J. and Bogdanove, A. (2012). TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), pp.W117-W122.
- Duan, S., Jia, H., Pang, Z., Teper, D., White, F., Jones, J., Zhou, C. and Wang, N. (2018). Functional characterization of the citrus canker susceptibility gene CsLOB1. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), pp.1908-1916.
- Geissler, R., Scholze, H., Hahn, S., Streubel, J., Bonas, U., Behrens, S. and Boch, J. (2011). Transcriptional Activators of Human Genes with Programmable DNA-Specificity. *PLoS ONE*, 6(5), p.e19509.
- Grau, J., Wolf, A., Reschke, M., Bonas, U., Posch, S. and Boch, J. (2013). Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites. *PLoS Computational Biology*, 9(3), p.e1002962.
- Gürlebeck, D., Thieme, F. and Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), pp.233-255.

Hogenhout, S., Van der Hoorn, R., Terauchi, R. and Kamoun, S. (2009). Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(2), pp.115-122.

Jones JDG, Dangl JL: The plant immune system. *Nature* 2006, 444:323-329.

Kanyuka, K. and Rudd, J. (2019). Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, pp.1-8.

Kay, S. and Bonas, U. (2009). How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), pp.37-43.

Keen, N. (1990). Gene-For-Gene Complementarity In Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review of Genetics*, 24(1), pp.447-463.

Long, J., Song, C., Yan, F., Zhou, J., Zhou, H. and Yang, B. (2018). Non-TAL Effectors From Xanthomonas oryzae pv. oryzae Suppress Peptidoglycan-Triggered MAPK Activation in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Mak, A., Bradley, P., Bogdanove, A. and Stoddard, B. (2013). TAL effectors: function, structure, engineering and applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(1), pp.93-99.

Meckler, J., Bhakta, M., Kim, M., Ovadia, R., Habrian, C., Zykovich, A., Yu, A., Lockwood, S., Morbitzer, R., Elsässer, J., Lahaye, T., Segal, D. and Baldwin, E. (2013). Quantitative analysis of TALE–DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Research*, 41(7), pp.4118-4128.

Moscou MJ, Bogdanove AJ: A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009, 326:1501. Using a computational approach, the authors decipher TALE–DNA recognition.

Mücke, S., Reschke, M., Erkes, A., Schwietzer, C., Becker, S., Streubel, J., Morgan, R., Wilson, G., Grau, J. and Boch, J. (2019). Transcriptional Reprogramming of Rice Cells by Xanthomonas oryzae TALEs. *Frontiers in Plant Science*, 10.

Murata, M., Omar, A., Mou, Z., Chase, C., Grosser, J. and Graham, J. (2019). Novel Plastid-Nuclear Genome Combinations Enhance Resistance to Citrus Canker in Cybrid Grapefruit. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Paulus JK, van der Hoorn RAL: Tricked or trapped - two decoy mechanisms in host-pathogen interactions. *PLoS Pathog* 2018, 14:e1006761.

Roeschlin, R., Favaro, M., Chiesa, M., Alemano, S., Vojnov, A., Castagnaro, A., Filippone, M., Gmitter, F., Gadea, J. and Marano, M. (2017). Resistance to citrus canker induced by a variant of Xanthomonas citri ssp. citri is associated with a hypersensitive cell death response involving autophagy-associated vacuolar processes. *Molecular Plant Pathology*, 18(9), pp.1267-1281.

Roeschlin, R., Uviedo, F., García, L., Molina, M., Favaro, M., Chiesa, M., Tasselli, S., Franco-Zorrilla, J., Forment, J., Gadea, J. and Marano, M. (2019). PthA4 AT, a 7.5-repeats transcription activator-like (TAL) effector from Xanthomonas citri ssp. citri, triggers citrus canker resistance. *Molecular Plant Pathology*. Ryan, R., Vorhölter, F., Potnis, N., Jones, J., Van Sluys, M., Bogdanove, A. and Dow, J. (2011). Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), pp.344-355.

Ryan, R., Vorhölter, F., Potnis, N., Jones, J., Van Sluys, M., Bogdanove, A. and Dow, J. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), pp.344-355.

Scholze, H. and Boch, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), pp.47-53.

Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F. (1999). The *Arabidopsis* *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11, 191-206.

Stall RE. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. USSingh RPS, Kohmoto K, editors. Pathogenesis and host–parasite specificity in plant diseases. Prokaryotes, vol. I. Tarrytown, NY: Pergamon, Elsevier Science Inc.; 1995. p. 167–84.

Stall RE, Seymour CP (1983) Canker, a threat to citrus in the Gulfcoast states. *Plant Dis* 67:581–585

Strauss, T., van Poecke, R., Strauss, A., Romer, P., Minsavage, G., Singh, S., Wolf, C., Strauss, A., Kim, S., Lee, H., Yeom, S., Parniske, M., Stall, R., Jones, J., Choi, D., Prins, M. and Lahaye, T. (2012). RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), pp.19480-19485.

Vojnov, A., Morais do Amaral, A., Dow, J., Castagnaro, A. and Marano, M. (2010). Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), pp.467-477.

Wu, X., Li, Y., Zou, L. and Chen, G. (2007). Gene-for-gene relationships between rice and diverse *avrBs3/pthA* avirulence genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology*, 56(1).

Yang B, White FF. 2004. Diverse members of the *AvrBs3/PthA* family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1192–1200.

Zhang, J., Yin, Z. and White, F. (2015). TAL effectors and the executor R genes. *Frontiers in Plant Science*, 6.

Zhang, R., Zheng, F., Wei, S., Zhang, S., Li, G., Cao, P. and Zhao, S. (2019). Evolution of Disease Defense Genes and Their Regulators in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), p.335. ETI Y PTI 2

Anexos

Anexo I: tinción de las membranas con el reactivo Direct Blue.

