



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Localización de la proteína SOL1, involucrada en
autoinmunidad, en maíz y en un sistema
heterólogo.**

Tesis que presenta

Laura Esperanza González Vázquez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. María Jazmín Abraham Juárez

San Luis Potosí, S.L.P., septiembre de 2022



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Localización de la proteína SOL1, involucrada en autoinmunidad, en maíz y en un sistema heterólogo**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Laura Esperanza González Vázquez** y aprobada el **27 de septiembre de 2022** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Codirector de la tesis

Dra. María Jazmín Abraham Juárez

Codirector de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

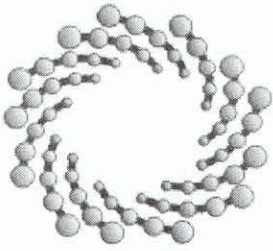
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica de Frutos, Plantas y Levaduras y en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. María Jazmín Abraham Juárez y el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No.1079988 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Así como apoyo de recursos fiscales del IPICYT.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

La Secretaria Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 238 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de octubre del año 2022, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dra. María Jazmín Abraham Juárez	Sinodal externo	CINVESTAV

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Laura Esperanza González Vázquez

sobre la Tesis intitulada:

Localización de la proteína SOL1, involucrada en autoinmunidad, en maíz y en un sistema heterólogo

que se desarrolló bajo la codirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dra. María Jazmín Abraham Juárez (CINVESTAV)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:57 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaria Académica del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de octubre de 2022.


Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Secretaria Académica


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

A mis padres

Pablo y Esperanza, por su cariño y todo su esfuerzo.

A mis Hermanos

Pablo, Ignacio, Francisco, especialmente a Salvador y Ana; por creer en mí y darme su apoyo incondicional para cumplir mis metas.

Familia y amigos

A Jorge Humberto por brindarme siempre su apoyo y a Yazmín Contreras por ser parte de esta experiencia y convertirla en una de las mejores etapas.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por las facilidades otorgadas para la realización del posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental, por todas las facilidades otorgadas.

A la Dra. Jazmín Abraham por su apoyo, asesoría y sobre todo por recibirme en su laboratorio y promover en mí el interés por la ciencia.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por su valiosa asesoría y apoyo en este trabajo de tesis.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, miembro de mi comité tutorial, por sus aportaciones y sugerencias durante la escritura de esta tesis.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda, por permitirme un espacio en su laboratorio durante la realización de mis experimentos.

Al Dr. Alfredo Guzmán por su apoyo y contribución en la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo, al Biól. Salvador Ambriz Granados y a la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano por las facilidades que me permitieron desarrollar algunos de los experimentos de esta tesis.

A todos los integrantes del laboratorio 10 por su compañía y apoyo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1.Introducción	1
1.1 Sistema inmune de las plantas	1
1.1.1 Genes relacionados con la patogénesis	3
1.2 Autoinmunidad	4
1.2.1 Causas y efectos	4
1.3 Mutantes autoinmunes es especies económicamente importantes	6
1.3.1 <i>Liguleless narrow</i> : una mutante autoinmune de maíz	7
1.3.2 El modificador <i>Sol-M</i> rescata el fenotipo <i>Lgn-R</i> en función de la temperatura	9
1.3.3 SOL1 es un ortólogo de EDR4	10
1.3.4 LGN desencadena un síndrome autoinmune	11
1.4 Anticuerpos como herramientas para detectar proteínas	13
2.Objetivos	16
2.1 General	16
2.2 Específicos	16
3.Resultados	17
3.1 Producción y purificación de proteína recombinante	17
3.1.1 La etiqueta GST se escinde de SOL1 durante el proceso de purificación	17
3.1.2 Purificación de SOL1 con etiqueta 6HIS en condiciones no desnaturalizantes	19
3.1.3 La purificación de SOL1 es más eficiente por afinidad a etiqueta 6His en condiciones desnaturalizantes	20
3.2 Búsqueda de una región para sintetizar un péptido específico para la purificación de un anticuerpo anti-SOL1	21
3.3 Validación y prueba de anticuerpos en tejidos de maíz	24

3.3.1 Tejidos de maíz con mayor abundancia de SOL1	25
3.3.2 Detección por inmunolocalización de SOL1 en tejidos de maíz	27
3.3.3 Detección por Western blot de SOL1 en tejidos de maíz	28
3.4 <i>N. benthamiana</i> como sistema heterólogo para expresar <i>Sol1</i>	30
3.4.1 Obtención de plantas transgénicas de <i>N. benthamiana</i> con expresión transitoria de SOL1	30
3.4.2 Anticuerpo Anti-SOL1 renaturalizada detecta a SOL1 expresada en tejidos de <i>N. benthamiana</i>	31
3.4.4 Plasmólisis para determinar localización de SOL1 en células de <i>N. benthamiana</i>	32
4. Discusión	34
4.1 Producción y purificación de proteína recombinante	34
4.2 Búsqueda de una región para sintetizar un péptido específico para la re-purificación de un anticuerpo anti-SOL1	35
4.3 Validación y prueba de anticuerpos en tejidos de maíz	36
4.4 <i>N. benthamiana</i> como sistema heterólogo para expresar <i>Sol1</i>	39
5. Materiales y métodos	42
5.1 Transformación de <i>E. coli Rosetta</i> con el gen <i>Sol1</i>	42
5.2 Inducción de la proteína recombinante	42
5.3 Análisis de proteínas recombinantes por SDS-PAGE	42
5.4 Purificación de la proteína recombinante con etiqueta GST	43
5.5 Purificación de proteína la recombinante con etiqueta 6HIS	43
5.6 Purificación de anticuerpo específico	44
5.7 Western blot	45
5.8 Dot blot	46
5.9 Inmunolocalización de proteínas en maíz, asistida por recuperación de epítopos inducida por calor	46
5.10 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico	48
5.11 Amplificación de un fragmento de <i>Sol1</i>	48
5.12 Material vegetal	48
5.13 Agroinfiltración	48
5.14 Obtención de tejido infiltrado de <i>N. benthamiana</i>	49
5.16 Plasmólisis	49
6. Conclusiones	50

7.Perspectivas	51
Bibliografía	52

Lista de figuras

1. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de SOL1 con etiqueta GST en condiciones nativas	18
2. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de SOL1 con etiqueta 6HIS en condiciones nativas	19
3. Análisis de las eluciones de las proteínas desnaturalizadas y renaturalizadas	20
4. Región seleccionada de SOL1 para síntesis del péptido sintético	22
5. Predicción de epítomos lineales en la secuencia de SOL1	23
6. Localización de la región del péptido en la estructura terciaria de SOL1	24
7. Análisis de especificidad de los anticuerpos contra SOL1 recombinante	25
8. Esquema de la abundancia del ARNm de SOL1 en diferentes tejidos de maíz	26
9. Detección de SOL1 en tejidos de espiga joven de maíz por inmunolocalización con distintos anticuerpos	28
10. Análisis del extracto total de proteína de meristemo apical por Western blot con el anticuerpo purificado con la proteína renaturalizada	29
11. Amplificación de una región de <i>Sol1</i>	30
12. Expresión transitoria de SOL1 en <i>N. benthamiana</i>	31
13. Western blot en tejidos de <i>N. benthamiana</i>	32
14. Microscopía confocal: SOL1 localizada en la membrana plasmática en células de <i>N. benthamiana</i>	33

Resumen

Localización de la proteína SOL1, involucrada en autoinmunidad, en maíz y en un sistema heterólogo.

Las plantas cuentan con una regulación estricta para evitar la activación, en momentos no requeridos, de los procesos desencadenados por el sistema inmune; sin embargo, mutaciones en los receptores del sistema inmunes activan de manera constitutiva la respuesta inmune aún sin la presencia de patógenos, originando así autoinmunidad en la planta y produciendo fenotipos anormales. Estas mutantes se caracterizan por enanismo, niveles elevados de ácido salicílico, expresión constitutiva de genes de defensa como por ejemplo los relacionados con la patogénesis generando una resistencia mejorada a patógenos. Las mutantes autoinmunes proveen un sistema útil para el estudio de la respuesta inmune de las plantas, ya que aportan una perspectiva más profunda de los mecanismos de señalización involucrados en la defensa. El estudio de una de las proteínas que codifican uno de esos genes mutados en maíz, como de sus posibles interactores, podría ayudar a entender mejor el mecanismo de defensa en gramíneas. La identificación de *Sol1* entre variedades endogámicas, así como la información generada acerca de los mecanismos moleculares que ocurren en respuesta a estrés biótico y abiótico en estas especies, será de gran utilidad en el diseño de estrategias para mitigar los daños ocasionados en las plantas cultivadas. En este trabajo logramos purificar un anticuerpo Anti-SOL1 a partir de un antisuero producido en conejo, del cual obtuvimos tres lotes diferentes de anticuerpos purificados por afinidad: uno usando la proteína desnaturalizada, otro la proteína renaturalizada y el último, un péptido sintético específico de SOL1. Estos anticuerpos se validaron por Western blot usando las proteínas recombinantes y se probó su utilidad en experimentos de inmunolocalización en tejidos de maíz, detección por Western blot en extractos de tejidos de maíz y para determinar la localización de la proteína SOL1 etiquetada con YFP expresada en *N. benthamiana*.

PALABRAS CLAVE: Respuesta inmune en plantas, modificadores genéticos, rescate del fenotipo, anticuerpos específicos.

Abstract

Localization of the SOL1 protein, involved in autoimmunity, in maize and in a heterologous system.

Plants have a strict regulation to avoid the activation, at times not required, of the processes triggered by the immune system; however, mutants in the immune receptors constitutively activate the immune response even without the presence of pathogens, thus causing autoimmunity in the plant and producing abnormal phenotypes. These mutants are characterized by dwarfism, high levels of salicylic acid, constitutive expression of defense genes such as those related to pathogenesis, generating improved resistance to pathogens. The autoimmune mutants provide a useful system for studying the immune response of plants, they provide a deeper perspective of the signaling mechanisms involved in defense. The study of one of the proteins that encodes one of these mutated genes in maize, as well as its possible interactors, could help to better understand the mechanism of grass defense. The identification of *So11* among inbred varieties, as well as the information generated about the molecular mechanisms that occur in response to biotic and abiotic stress in these species, will be very useful in the design of strategies to reduce the damage caused in cultivated plants. In this work, we purified an Anti-SOL1 antibody from rabbit serum, from which we obtained three different batches of purified antibodies by affinity: one to denatured protein, other to renatured protein and the last one to a synthetic peptide specific of SOL1. These antibodies were validated by Western blot using recombinant proteins. We tested their utility in experiments of immunolocalization on maize tissues, Western blot detection in maize tissue extracts and to determine the localization of the YFP-tagged SOL1 protein expressed in *N. benthamiana*.

KEY WORDS: Immune response in plants, genetic modifiers, phenotype rescue, specific antibodies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema inmune de las plantas

Las plantas se enfrentan constantemente a estrés producido por el ataque de patógenos y por condiciones ambientales que afectan su desarrollo. Para sobrevivir utilizan diversos mecanismos de defensa, los cuales han coevolucionado ante dichas amenazas y les ayudan a combatir o adaptarse a estas situaciones a través de una respuesta inmune adecuada (Rodríguez *et al.*, 2018).

El sistema inmune de las plantas está constituido por dos barreras principales, la primera actúa al exterior de la célula y consiste en receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs, respectivamente por sus siglas en inglés) y desencadenan la inmunidad activada por PAMP, PAMP-Triggered Immunity (PTI) o MAMP, MAMP Triggered Immunity (MTI), esta respuesta corresponde a una defensa general no específica que proporciona a la planta una resistencia basal que funciona para controlar patógenos con estrategias menos evolucionadas (Chinchilla *et al.*, 2006). PTI lleva a las células a un estado defensivo, activando cascadas de señalización, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cierre de estomas para prevenir la colonización de la planta (Rodríguez *et al.*, 2018). Además, fitohormonas como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA) son componentes importantes en la señalización para activar el sistema inmune (Nejat & Mantri, 2017). La liberación extracelular de ROS actúa como una señal antimicrobiana que fortalece la pared de la célula vegetal a través de la reticulación

oxidativa y ejerce un papel como mensajero local y sistémico que funciona para inducir respuestas inmunes (Zhang *et al.*, 2018).

La segunda barrera de defensa actúa dentro de la célula, y se basa en la activación de genes de resistencia (R), que reconocen efectores específicos codificados por los genes de avirulencia (Avr) desplegados por patógenos, y se encargan de desencadenar la respuesta inmune para limitar la propagación de la infección en la planta; este es el modelo conocido como “gen por gen” (Pizarro *et al.*, 2020). Los efectores del patógeno tienen la capacidad de modificar o remover proteínas del huésped y promover la colonización (Lolle *et al.*, 2017). Estos efectores, al interferir con la respuesta PTI, producen la susceptibilidad activada por efectores (ETS). Sin embargo, si un efector específico es reconocido por una de las proteínas R, se produce la inmunidad activada por efectores (ETI), o respuesta PTI acelerada y amplificadas que otorga resistencia a enfermedades que generalmente involucra muerte celular, también conocida como respuesta hipersensible (HR), en el sitio de la infección. Luego de que ocurre muerte celular local, la resistencia sistémica adquirida (SAR) puede ser inducida por el SA producido y así estimular la inmunidad en partes no infectadas de la planta, fenómeno conocido como priming en el que un estímulo conlleva a la respuesta de otro estímulo actuando como un mecanismo de memoria. Las respuestas HR y SAR están reguladas por SA (Rodríguez *et al.*, 2018). Estas respuestas están representadas con el modelo de “zig-zag-zig”, en el que, además, se muestra como a través de una regulación positiva de los componentes de señalización, la respuesta ETI mejora las respuestas de defensa PTI que fueron atenuadas por los efectores (Ngou *et al.*, 2021). En este sentido, las plantas detectan el ataque de patógenos a través de

receptores que se encuentran en la superficie y en el interior de sus células (Cui *et al.*, 2017).

1.1.1 Genes relacionados con la patogénesis

SAR se caracteriza principalmente por una alta expresión de genes PR (relacionados con la patogénesis, por sus siglas en inglés). Los genes PR se clasifican generalmente en 17 familias de acuerdo con propiedades bioquímicas, biológicas y moleculares. La mayoría de estos genes son inducidos a través de hormonas como SA, JA y ET; de esta manera el nivel basal de expresión de genes PR se incrementa luego de una infección patógena (Seo *et al.*, 2008). Entre las proteínas PR más caracterizadas se encuentran PR1 (antiomiceto y antifúngico), PR2 (beta- 1,3-glucanasas), PR3 (quitinasas), PR4 (antifúngico) y PR6 (inhibidores de proteasas). Existen numerosas isoformas de cada proteína PR en diversas plantas huésped (Agrios, 2005). Varios de los genes PR están regulados por procesos de desarrollo como maduración del polen y senescencia de las hojas y también por factores ambientales como estrés osmótico, frío y la luz (Seo *et al.*, 2008).

Las proteínas codificadas por los genes PR son de bajo peso molecular y llevan a cabo una serie de funciones variadas, ya que pueden actuar como peroxidasas, quitinasas, hidrolasas, inhibidores de proteasas entre otras más, y se encuentran presentes tanto en espacios extracelulares como intracelulares de las células vegetales, específicamente en paredes celulares de diversos tejidos, están distribuidas en pequeñas cantidades, luego de un ataque por patógenos o estrés ambiental las concentraciones aumentan. Algunas de las funciones que realizan las

proteínas PR son inhibir la liberación de esporas, fortalecer la pared celular del huésped, mientras que otras al difundirse afectan y descomponen la estructura de la pared celular de varios de los hongos patógenos que afectan a las plantas (Agrios, 2005).

1.2 Autoinmunidad

Los mecanismos de inmunidad en las plantas están estrictamente controlados por reguladores que evitan la activación innecesaria de la defensa, estos reguladores se encuentran inactivos en ausencia de patógenos y deben activarse únicamente ante la presencia de patógenos (Noutoshi *et al.*, 2005). CPK28 se ha descrito como un regulador negativo de la respuesta inmune en las plantas, la pérdida de su función resulta en una respuesta mejorada activada por PAMP y la sobreexpresión de éste, inhibe la inmunidad activada por PAMP. Por otro lado, se han descrito múltiples ejemplos de plantas con una activación constitutiva de las respuestas inmunes sin la presencia de infección por patógenos, a este tipo de plantas se les conoce como mutantes autoinmunes, algunas también presentan muerte celular bajo algunas condiciones ambientales, como la humedad, luz y temperatura, a los que se les conoce como imitadores de lesiones (Hua *et al.*, 2001; Noutoshi *et al.*, 2005).

1.2.1 Causas y efectos

Las proteínas conocidas como receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs, por sus siglas en inglés) actúan como sensores de

posibles ataques de patógenos, de la misma forma que los receptores tipo toll (TLRs, por sus siglas en inglés); ambos receptores son parte fundamental de la respuesta inmune innata actuando de manera intracelular y extracelular respectivamente. La regulación inadecuada de estos receptores es la principal causa del llamado “síndrome de autoinmunidad” en las plantas. Un gran número de mutantes autoinmunes se deben a mutaciones de pérdida de función en los reguladores negativos y mutaciones en los receptores inmunes de la planta (Kong *et al.*, 2012).

Un mecanismo que desempeña un papel de gran importancia en la inmunidad de las plantas son las cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP) son uno de los primeros eventos que se activan luego de que la planta detecta la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (Meng & Zhang, 2013). Una cascada de MAP cinasas se compone por una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), una MAP cinasa cinasa (MKK) y una MAP cinasa (MPK), las señales de los receptores ascendentes se transducen y amplifican a través de esta cascada; es por esto, por lo que muchos efectores que liberan los patógenos suelen tener como objetivo principal las vías MAP cinasa (Kong *et al.*, 2012).

Se ha descrito que la señalización del calcio tiene un papel importante en la respuesta inmune de las plantas, el incremento en la concentración de calcio citoplásmico es una de las primeras respuestas de defensa inducida por PAMP, las proteínas cinasas dependientes de calcio (CPK) son proteínas monitoras del calcio que detectan los cambios en la concentración intracelular y transmiten señales a través de la fosforilación de proteínas que inducen respuestas corriente-abajo. Las proteínas CPK median y transmiten señales de defensa en respuesta a PAMP y a

los efectores patógenos. Se han caracterizado varios sensores de calcio que se usan para transmitir señales de calcio inducidas por patógenos como CPK4, 5, 6 y 11 que están involucrados en la señalización de flg22, un péptido conservado de 22 aminoácidos derivado de la flagelina bacteriana (Liu *et al.*, 2017). También se ha planteado que la señalización anormal del calcio es una causa de autoinmunidad, ya que algunas mutantes autoinmunes tienen defectos en esta vía (Yuan *et al.*, 2018). Además, firmas distintivas de calcio se inducen rápidamente luego de la invasión de patógenos y al alterar los canales putativos de calcio las respuestas inmunes se ven afectadas o mejoradas (Yang *et al.*, 2017). La activación constitutiva de la respuesta inmune deriva en efectos perjudiciales en el crecimiento y desarrollo de la planta (Kong *et al.*, 2012). Típicamente, las mutantes autoinmunes se caracterizan por fenotipos asociados al enanismo, lesiones espontáneas, letalidad en las plántulas, muerte celular espontánea y una mayor resistencia a enfermedades (Yuan *et al.*, 2018).

1.3 Mutantes autoinmunes es especies económicamente importantes

Aunque la mayoría de los estudios acerca de mutantes autoinmunes en plantas se han realizado en especies modelo no cultivables, como *Arabidopsis thaliana*, existe información reciente acerca del estudio de este tipo de mutantes en gramíneas, por ejemplo, en maíz (*Zea mays*), una de las especies más importantes económicamente a nivel mundial.

El maíz es considerado como una planta que ofrece ventajas para estudiar el desarrollo de diversos tejidos a nivel molecular debido al acomodo en sus estructuras y órganos. Existen múltiples mutantes en maíz relacionadas a autoinmunidad, entre las que está la mutante *narrow odd dwarf (nod)* que muestra fenotipos pleiotrópicos que afectan el desarrollo vegetativo y reproductivo. La mutante *nod* codifica a CNR13 (cell number regulator), familia de genes identificados a través de homología en tomate (*Solanum lycopersicum*). Esta mutante muestra una reducción general en cuanto al tamaño y defectos en el patrón de órganos, estos fenotipos se derivan de fallas y defectos en la división, expansión y diferenciación celular, además parece tener una regulación constitutiva de inducción de vías de respuesta a patógenos. Se ha descrito a *nod* como una mutante con órganos más pequeños debido a que tienen menos células, además de que son notablemente más pequeñas que en las plantas de tipo silvestre (Rosa *et al.*, 2017).

1.3.1 *Liguleless narrow*: una mutante autoinmune de maíz.

La mutante de maíz *Liguleless narrow1 (Lgn)* codifica una cinasa localizada en la membrana plasmática, requerida para el desarrollo de tejidos como la lígula y la vaina en la planta de maíz, así como la formación de la hoja, alargamiento de entrenudo y fertilidad. La mutación semi-dominante (*Lgn-R*), producida por una mutación puntual inducida con metanosulfonato de etilo, entre una serina/treonina de un dominio en la proteína, elimina su función cinasa. La lígula es una estructura adaxial que se ubica entre el límite de la vaina, la función principal que desempeña es impedir que entre agua en el espacio ubicado entre la vaina y el tallo donde se

forman las yemas axilares. *Lgn-R* muestra un fenotipo pleiotrópico; en individuos heterocigotos las hojas son cortas, estrechas y las inflorescencias tienen ramificaciones reducidas; mientras que en homocigotos los efectos son aún más severos y las inflorescencias no se presentan (Moon *et al.*, 2013).

El fenotipo producido por *Lgn-R* se ha evaluado en diferentes ambientes y con diferentes fondos genéticos y existe registrada una diversidad de expresión en función de éstos. Entre las líneas endogámicas en las que se ha evaluado este fenotipo mutante están B73, que produce fenotipos severos a temperaturas frías y en temperaturas más cálidas tienen una mayor tasa de mortalidad y Mo17 en el que a temperaturas cálidas hay una mayor supervivencia y fenotipos severos mientras que en temperaturas frías los fenotipos son casi idénticos a los de plantas no mutantes (Anderson *et al.*, 2019). La expresividad fenotípica dependiente de fondo genético y temperatura se ha visto a menudo en mutantes autoinmunes que han sido descritas en otras plantas (Van Wersch & Zhang, 2016). A partir del efecto que produce el fondo genético Mo17 en el fenotipo mutante *Lgn-R*, se realizó un análisis de locus de rango cuantitativo (QTL) mediante el cual identificaron un modificador de segundo sitio entre las líneas B73 y Mo17: *Sympathy for the ligule (Sol)*. La expresividad de un fenotipo mutante a menudo depende de más de un gen, estos son llamados modificadores de segundo sitio. El maíz es particularmente rico para identificar este tipo de modificadores debido a la alta variación genética entre líneas endogámicas (Anderson *et al.*, 2019).

La identificación de modificadores de segundo sitio es una herramienta muy útil para dilucidar vías involucradas en algún proceso específico celular o de desarrollo, así como para la identificación de genes involucrados que podrían interactuar tanto

funcional como físicamente con otro gen de interés (LaJeunesse *et al.*, 2001). Las líneas casi isogénicas (NILs, por sus siglas en inglés) se usan frecuentemente como material para realizar mapeo de alta resolución. NIL consiste en individuos que se generan a través de auto-polinizaciones donde es posible cruzar una mutación de interés en líneas interrelacionadas a partir de retrocruzadas repetidas seleccionando el rasgo de interés para finalmente obtener una línea con una mayor proporción del fondo genético proveniente del progenitor retrocruzado y pequeños fragmentos del otro progenitor donde se incluye el QTL de interés (Sood *et al.*, 2014). En este caso, se utilizó una línea B73 x Mo17 interrelacionada (IBM, por sus siglas en inglés) para estudiar la diferencia entre los fenotipos de *Lgn-R* en los fondos B73 y Mo17 crearon una línea NIL en la que el fondo B73 es predominante y tiene pequeñas porciones del fondo Mo17 incluyendo la región donde se encuentra el modificador *Sol1*, así evaluaron los fenotipos en plantas *Lgn-R* heterocigotas *Sol-M/Sol-B* (NIL) o *Sol-B/Sol-B* (B73) usando para el locus *Sol1* de B73 (*Sol-B*) y para el locus *Sol1* de Mo17 (*Sol-M*) (Anderson *et al.*, 2019).

1.3.2 El modificador *Sol-M* rescata el fenotipo *Lgn-R* en función de la temperatura.

Las plantas NIL muestran fenotipos donde solo la altura y el ancho de las hojas se ven alteradas, presentan una formación normal de la lígula por lo que se ven mucho menos afectadas que las plantas que son exclusivamente B73 en las que nunca se desarrolló lígula o aurícula, con esto determinaron que una copia de *Sol-M* es capaz de mejorar el fenotipo de mutantes *Lgn-R*. Además, evaluaron el efecto de la temperatura en la severidad de los fenotipos sometiendo a las plantas a dos rangos

diferentes de temperatura 15°C-32°C y 11°C-21°C en cámaras de crecimiento, donde las plantas *Lgn-R* NIL se vieron afectadas en temperaturas más cálidas pero se recuperan a temperaturas bajas; mientras que las plantas B73 no se recuperaron ya que los fenotipos *Lgn-R* son más severos en temperaturas altas y a temperaturas bajas y en presencia del alelo *Sol1* de Mo17 el fenotipo *Lgn-R* es restaurado (Buescher *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2019).

1.3.3 SOL1 es un ortólogo de EDR4.

La proteína ENHANCED DISEASE RESISTANCE4 (EDR4) de *A. thaliana* se localiza principalmente en la membrana plasmática y en compartimentos endosomales. Se ha descrito que EDR4 interactúa con EDR1 en la misma vía encargada de regular la resistencia al oídio y la muerte celular; EDR1 se localiza en el citosol y retículo endoplásmico y es reclutado a la membrana plasmática es aquí donde EDR4 interactúa físicamente con EDR1 ya que ambos se acumulan en el sitio de penetración de *Erysiphe cichoracearum* (mildiú polvoroso). EDR1 posiblemente actúa al inicio de una cascada de MAP cinasas que regula negativamente las respuestas que se inducen por SA. Estudios en mutantes *edr4* de *A. thaliana* muestran una reducción en la tasa de endocitosis, debido a estos datos se sugiere que EDR4 también interactúa con CLATHRIN HEAVY CHAIN2 (CHC2) y controlan la inmunidad de la planta a través de la regulación de la relocalización de EDR1 (Wu *et al.*, 2015; Frye *et al.*, 2001). De un análisis por BLASTp, para encontrar proteínas similares a EDR4, se identificó que *Sol1* es un homólogo de *A. thaliana*, EDR4 y SOL1 se encuentran en un clado filogenético cercano, por otro lado, realizaron un tratamiento para probar si de la misma forma

que EDR4, SOL1 se induce con elicitores patógenos, por RT-qPCR determinaron que luego de 1 hora de tratamiento con quitina (elicitador fúngico) los niveles de transcripción de *Sol1* se incrementan (Anderson *et al.*, 2019).

1.3.4 LGN desencadena un síndrome autoinmune.

En la búsqueda de vías afectadas por *Lgn-R*, a través de análisis transcriptómicos se identificaron 1,568 genes expresados diferencialmente (DEGs), de los cuales 1,119 son inducidos y 448 están reprimidos; la mayoría de estos genes están relacionados con la resistencia a enfermedades, inducción de genes que codifican cinasas similares a receptores, factores de transcripción WRKY, además de proteínas relacionadas con la patogénesis. Todo lo anterior apunta a que una cascada de señalización de inmunidad innata se activa en las mutantes *Lgn-R* sin que se presente una infección por patógenos. Debido a esto, Anderson *et al.* (2019), sugieren que al perderse la actividad de LGN se desencadena un síndrome autoinmune con consecuencias en el desarrollo. Se ha descrito que los cambios de temperatura juegan un papel importante en la activación y represión de la inmunidad de las plantas, la respuesta PTI generalmente se activa a temperaturas medianamente altas (23-32°C) mientras que la señalización ETI se activa a temperaturas más bajas (10-23°C); estos cambios pueden relacionarse a que con temperaturas elevadas se inhibe la secreción del efector bacteriano, sin embargo, se favorece su proliferación (Cheng *et al.*, 2013). En este sentido, se ha reportado que en otras mutantes autoinmunes producidas por mutaciones en genes NLR como *bonsai*, *caps 3-1* y *rpp4* de *A. thaliana*, así como *Rp1-D21* en maíz, muestran fenotipos severamente afectados a bajas temperaturas mientras que a altas

temperaturas estos fenotipos son rescatados. Ahora bien, *Lgn-R* presenta un patrón opuesto al de estas mutantes, por esta razón Anderson *et al.* (2019), sugieren que esto puede deberse a que la activación de las distintas redes de señalización en las plantas que son mediadas por NLR suelen activarse a bajas temperaturas y suprimirse a temperaturas más elevadas, por el contrario las defensas que dependen de MAPK se activan a altas temperaturas y se suprimen a temperaturas más bajas; con esto se sustenta la idea de que *Lgn-R* es una mutación que afecta la inmunidad activada por patrones moleculares.

Todas estas correlaciones proponen que *Sol1* puede funcionar interactuando en una cascada de señalización MAPK relacionada con la inmunidad que se activa en la mutante *Lgn-R*. Se ha sugerido que LGN reprime la respuesta inmune a través de fosforilación río arriba de una cascada de transducción de señales de defensa biótica, además de funcionar para promover el desarrollo de las hojas a través de otra red de señalización, quizá LGN afecta múltiples vías MAPK, algunas conducen a respuestas autoinmunes y otras a eventos de desarrollo. SOL1 ubicado río abajo de la vía que controla LGN se induce en el fondo mutante. SOL-M tiene una función similar a EDR4 y suprime la respuesta inmune mientras que SOL-B no rescata el fenotipo quizá porque no puede suprimir la respuesta inmune (Anderson *et al.*, 2019).

En general las mutantes autoinmunes proveen un sistema útil para el estudio de la respuesta inmune de las plantas, ya que es posible tener una perspectiva más profunda de los mecanismos de señalización involucrados en la defensa (Yuan *et al.*, 2018). La identificación de *Sol1* con sus firmas genéticas y moleculares entre variedades endogámicas podría orientar esfuerzos para equilibrar defensa contra

patógenos con el crecimiento y rendimiento general. La información generada acerca de los mecanismos moleculares que ocurren en respuesta a estrés biótico y abiótico en estas especies, será de gran utilidad en el diseño de estrategias para mitigar los daños ocasionados en las plantas cultivadas por efectos de la respuesta inmune.

1.4 Anticuerpos como herramientas para detectar proteínas.

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas, constituyen uno de los principales efectores del sistema inmune adaptativo. Son proteínas del hospedero que se encuentran en el suero sanguíneo, y son producidos en respuesta a moléculas u organismos para neutralizarlos y eliminarlos. Están compuestos por polipéptidos en dos cadenas pesadas de 55 kDa y dos cadenas ligeras de 25 kDa; estas cadenas están unidas por puentes disulfuro. Actualmente los anticuerpos representan una herramienta de gran utilidad en distintas áreas de la ciencia y la investigación gracias a la capacidad que tienen para unirse a un antígeno con un grado de afinidad y especificidad considerablemente alto (Lipman *et al.*, 2005). Los anticuerpos pueden dividirse en policlonales: aquellos derivados de múltiples clones de células B, capaces de reconocer múltiples epítomos del antígeno; y monoclonales: aquellos obtenidos a partir de una sola célula B por lo que solo reconocen un epítomo del antígeno (Wootla *et al.*, 2014).

La unión de un anticuerpo a su epítomo es reversible y la fuerza de la interacción entre los mismos puede ser alterada por cambios en la estructura del antígeno, debido a ésto, en los epítomos de proteínas nativas la afinidad de unión de la mayor

parte de los anticuerpos está dada por determinantes conformacionales por lo que posiblemente los anticuerpos no puedan unirse a la proteína en un estado desnaturalizado; esta situación es aplicada para los anticuerpos monoclonales que solo se unen a un epítopo, sin embargo, para los anticuerpos policlonales el cambio en la estructura de la proteína es menos importante ya que, al reconocer múltiples epítopos posiblemente algunos sean lineales, así pues los cambios conformacionales no afectan en el mismo grado (Lipman *et al.*, 2005).

El análisis de la localización de proteínas en extractos celulares y subcelulares representa una herramienta clave para complementar datos de expresión génica, así como para dilucidar redes genéticas y evaluar la función e interacción de proteínas, si bien las proteínas de fusión con GFP o GUS proporcionan un enfoque útil, no es un procedimiento factible para todas las especies de plantas, además de que la localización y actividad de la proteína puede verse afectada y no ser idéntica en comparación al comportamiento tipo silvestre, por esto técnicas de inmunolocalización de proteínas nativas es una estrategia que ofrece una solución a este tipo de problemas (Sauer *et al.*, 2010).

En nuestro grupo de trabajo se produjo un antisuero de conejo inmunizando con la proteína completa SOL1 de maíz, el cuál puede ser utilizado para la purificación de anticuerpos específicos contra SOL1, que posteriormente serán utilizados para inmunoprecipitar la proteína a partir de tejidos de maíz e identificar interactores. Por lo que en este trabajo se propone la purificación de estos anticuerpos con la proteína desnaturalizada, no desnaturalizada y con un péptido sintético específico de una región de SOL1, que permita la inmunodetección específica de la proteína nativa en tejidos de maíz por Western blot e inmunolocalización y la inmunoprecipitación del

complejo protéico que interactúa con SOL1. Con esto, se pretende generar información acerca del control del desarrollo y de la respuesta inmune en maíz.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Caracterizar la proteína SOL1 durante el desarrollo de plantas de maíz y generar herramientas para su detección y localización.

2.2 Específicos

1. Obtener un anticuerpo específico contra la proteína SOL1 que sea útil para inmunodetectar e inmunoprecipitar la proteína en condiciones nativas.
2. Determinar la localización a nivel de tejido y nivel subcelular de la proteína SOL1 en tejidos de maíz.
3. Expresar la proteína SOL1 en un sistema heterólogo para probar su inmunodetección.

3. RESULTADOS

3.1 Producción y purificación de proteína recombinante

3.1.1 La etiqueta GST se escinde de SOL1 durante el proceso de purificación.

En el laboratorio se contaba con la construcción del vector de expresión pDEST15 que contiene el gen *Sol1* (pDEST15-*Sol1*), y con este vector se transformaron células de *E. coli Rosetta* y se cultivaron en medio líquido, una vez alcanzada una $DO_{600}=0.5$ el cultivo se separó en dos frascos, uno se indujo con 0.4 mM de IPTG y el otro sin inducir se usó como control. Para la expresión de la proteína, se compararon los extractos celulares de los cultivos inducido y no inducido por electroforesis SDS-PAGE, donde se muestra la separación de las proteínas por peso molecular y se observa la diferencia entre la intensidad de las bandas en los carriles no inducido (NI), e inducido (I) (Fig. 1A). Se esperaba una banda de aproximadamente 94 kDa que corresponde al tamaño de la proteína SOL1 de 68 kDa más la etiqueta GST de 26 kDa. A partir de la mezcla de proteínas obtenidas del cultivo inducido, se purificó SOL1 por cromatografía de afinidad usando la etiqueta de GST, mediante una resina acoplada con glutatión reducido (GSH), de esta purificación se obtuvieron 3 eluciones, las cuales se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y se muestran en la Fig. 1A, sin embargo, en ninguna de éstas se observa una banda del tamaño esperado, entre las bandas obtenidas se encuentra una banda correspondiente al peso molecular de SOL1 y otra del peso molecular de la etiqueta GST (Fig. 1A, recuadros rojos) indicando que probablemente se escinde la etiqueta de GST. Para probar si estas bandas

corresponden a SOL1 y a la etiqueta GST, se analizaron por Western blot utilizando el antisuero Anti-SOL1 que ya se tenía en el laboratorio y un anticuerpo específico contra la etiqueta GST. El Western blot muestra una señal específica para los tamaños de banda esperados: 68 kDa para SOL1 (Fig. 1B) y 26 kDa para GST (Fig. 1C).

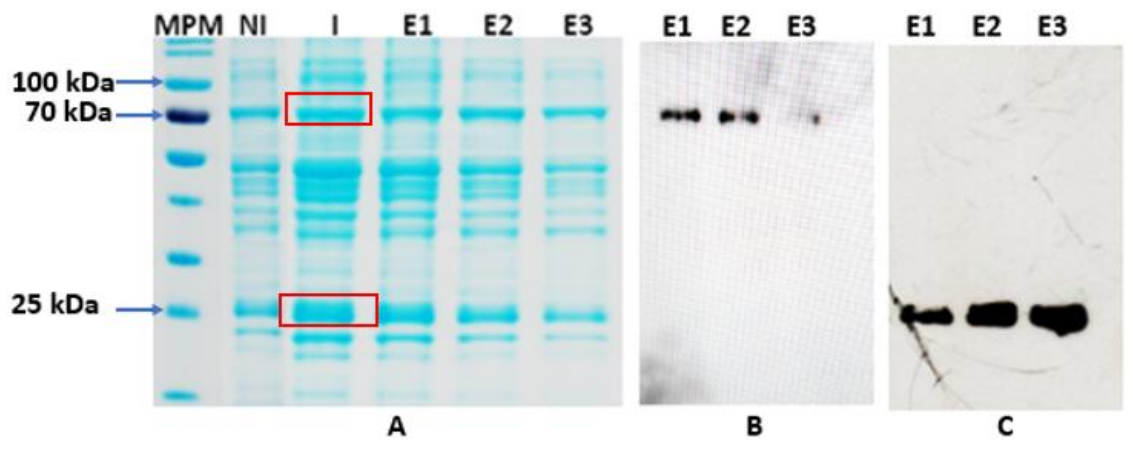


Figura 1. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de SOL1 con etiqueta GST en condiciones nativas. A: SDS-PAGE de muestras de cultivo NI: no inducido; I: inducido y E1-3: eluciones con 10 mM de glutatión reducido; MPM: marcador de peso molecular estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ de 10 a 180 kDa. Los recuadros rojos señalan las bandas del tamaño esperado de SOL1 (68 kDa) y GST (26 kDa). **B:** Western blot usando el antisuero que reconoce la proteína SOL1. **C:** Western blot usando anticuerpo que reconoce la etiqueta GST.

Debido a este resultado se utilizó otra construcción disponible en el laboratorio con el vector pDEST17-*Sol1*, que agrega a la proteína SOL1 una etiqueta de 6 histidinas y de esta manera probar un método de purificación distinto para SOL1 utilizando una etiqueta que sea de menor tamaño.

3.1.2 Purificación de SOL1 con etiqueta 6HIS en condiciones no desnaturalizantes.

A partir de la construcción que se contaba en el laboratorio del vector de expresión pDEST17-*Sol1*, se indujo el cultivo con una $DO_{600}=0.5$ de la misma manera que en el apartado anterior. En la Fig. 2 se muestra en gel de poliacrilamida la diferencia entre el cultivo inducido y no inducido y las eluciones obtenidas luego de la purificación de SOL1 por cromatografía de afinidad (Ni-profinity, BioRad) a partir de la etiqueta de 6His. En los carriles que muestran las eluciones obtenidas mediante gradiente de imidazol, se observa una banda más intensa cercana a un peso de 60 kDa además de un bandeo tenue en el que no se muestra el tamaño de banda esperado.

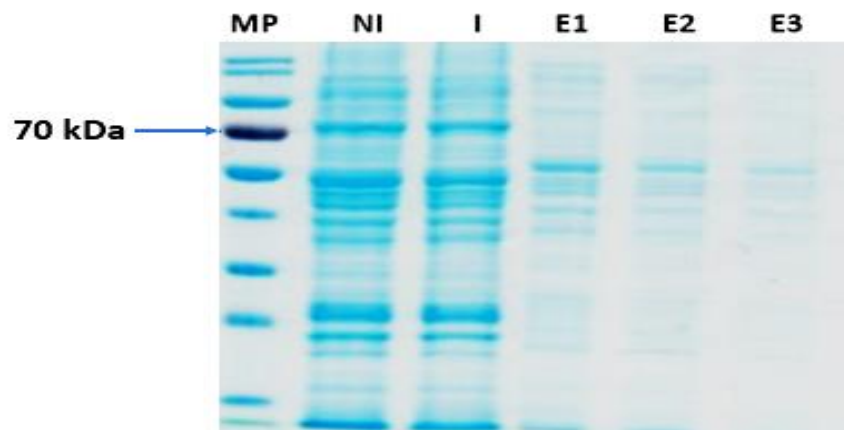


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de SOL1 con etiqueta 6HIS en condiciones nativas. SDS-PAGE de muestras de cultivo NI: no inducido; I: inducido; E1: elución obtenida con imidazol 200 mM, E2: elución obtenida con imidazol 250 mM y E3: elución obtenida con imidazol 300 mM. MP: marcador de peso molecular estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ de 10 a 180 kDa.

A partir de este resultado se optó por realizar la purificación de SOL1 con la etiqueta de 6 histidinas, pero ahora en condiciones desnaturizantes y evaluar la eficiencia de la purificación en este tipo de condiciones.

3.1.3 La purificación de SOL1 es más eficiente por afinidad a etiqueta 6His en condiciones desnaturizantes.

Se obtuvieron 3 eluciones con pH ácido por cromatografía de afinidad (Ni-profinity, BioRad) en condiciones desnaturizantes (Fig. 3A carriles ED1, ED2 y ED3), en las que se muestran bandas del tamaño esperado de 68 kDa en las tres eluciones. Con base en la eficiencia de esta purificación, se usaron las eluciones con la proteína desnaturizada y se sometieron a un tratamiento de renaturalización para favorecer las condiciones que le permitan a la proteína desnaturizada regresar a su estructura nativa. Se analizó la integridad de la proteína en las eluciones luego del tratamiento renaturalizante (Fig. 3A carriles ER1, ER2 y ER3). Se decidió usar tanto la proteína desnaturizada como la renaturalizada para obtener dos lotes de anticuerpos purificados a partir del antisuero.

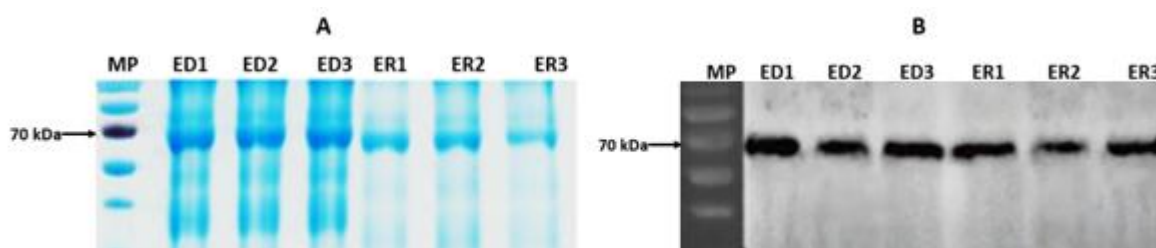


Figura 3. Análisis de las eluciones de las proteínas desnaturizadas y renaturalizadas. A: SDS-PAGE y B: Western blot de las eluciones desnaturizadas y renaturalizadas, donde ED1: elución con proteína desnaturizada obtenida con pH 5.0, ED2: elución con proteína desnaturizada obtenida con pH 4.0 y ED3: elución con proteína desnaturizada obtenida con pH 3.0; ER1: elución con proteína renaturalizada obtenida con imidazol 200 mM, ER2: elución con proteína renaturalizada

obtenida con imidazol 250 mM y ER3: elución de proteína renaturalizada obtenida con imidazol 300 mM. Usando en el Western blot como anticuerpo primario el antisuero Anti-SOL1 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit acoplado a HRP. MP: marcador de peso molecular estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ de 10 a 180 kDa.

3.2 Búsqueda de una región para sintetizar un péptido específico para la purificación de un anticuerpo anti-SOL1

Por otro lado, como una alternativa adicional para purificar un anticuerpo específico del antisuero que teníamos en el laboratorio contra SOL1, buscamos una región de SOL1 para producir un péptido sintético; esto luego de que durante el desarrollo de este proyecto se actualizó a la versión 5 del genoma de maíz en Maize GDB, en la cual se registró la proteína SISTER SOL que comparte un porcentaje de identidad del 64% con SOL1, por lo que para evitar que el anticuerpo reconozca a esta otra proteína, se hizo un alineamiento entre SOL1 y SISTER SOL como se muestra en la Fig. 4A. En el alineamiento se buscó una región específica en la secuencia de SOL1 en la que no compartiera los mismos aminoácidos con SISTER SOL. Además, también se tomaron en cuenta las regiones que se predicen como antigénicas de SOL1, en caso de que se requiera realizar una nueva inmunización de animales con el péptido sintético (Fig. 4B). A partir de estas consideraciones el péptido se definió

del aminoácido 131 al 145 de SOL1 y fue sintetizado por GenScript (EUA).



Figura 4. Región seleccionada de SOL1 para síntesis del péptido sintético. A. BLAST en Maize GDB de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SOL1 y SISTER SOL; el recuadro en rojo señala una región en la que se diferencian las dos proteínas. **B.** Secuencia de aminoácidos de SOL1 donde en azul se resaltan los aminoácidos con las regiones predichas como determinantes antigénicos, los aminoácidos subrayados son predichos como regiones desordenadas (análisis proporcionado por GenScript). El recuadro rojo indica la región de la secuencia que se utilizó para sintetizar el péptido.

Asimismo, en el servidor Bepipred se analizó la predicción de epítomos lineales, tanto para la secuencia completa de SOL1 como para la región que se tomó para sintetizar el péptido. La mayor parte de la secuencia de la proteína SOL1 se predice como epítomos lineales (Fig. 5A). En la Fig. 5B se observa específicamente la región que abarca el péptido.

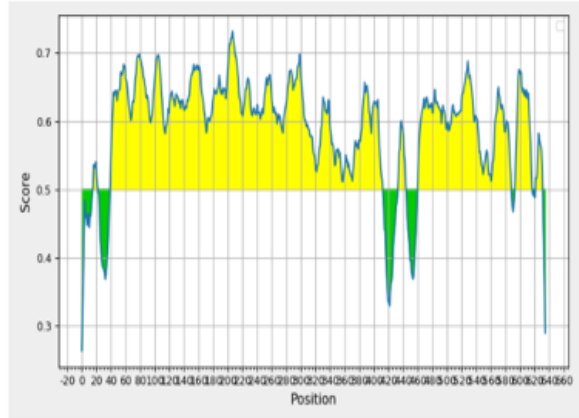
A**Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results**

Input Sequences

```

1 MASTEGFRIV REPKELNEIP EPMVTVYK GGGOTLRAK TRASSGGQNA ATAKQKQDS
63 DSYVATA VSSGPPQNR DQSIQVTE SFDADVASA EHGNGARGG ENGGRPLAQ
123 NV HFEGQD NNTSSREGR AQTRLMANA TYLDGGTEN HTVQZAKK RVSGHVDTE
183 CHLH TSED EPMPSETSIA AVGQKQPKR KEAGGTEHA NKKSLVRLA SKDCLOSDH
243 NLTPH SA RSLGKSPFR ASAPLQKLR SYDELKGD SDFSKRQK KPHHPHPPH
303 PSKSGGR TAAAVTSSA PLAAVPPAE HGGVYSRSL SRSAGLPPP RRGVLSLRYR
363 RHVYVPHIS VQNEVSS ERHECCVNSG QPPCRSCIQ EPSMRRAPV EQVRRPPRR
423 NHELPLVSGA PF VZCSG VSLVQVADP AVPSRARRL RCGACSELLS YSYRDPARR
483 KPSPPFEGE CSTD GYDE IZHQAGAGP ERAGPAVSYV EEVLSFGQD HSTSSSTEG
543 QPLVYSRNS FNTADD GR HGRGKLRHL MYSASSELL RHGDLTFEP DRAPASARH
603 VQKGGVQVY ASRDAAGA RQGAARKRA RSGGLPKMSI LKKGHGLES LKLR

```

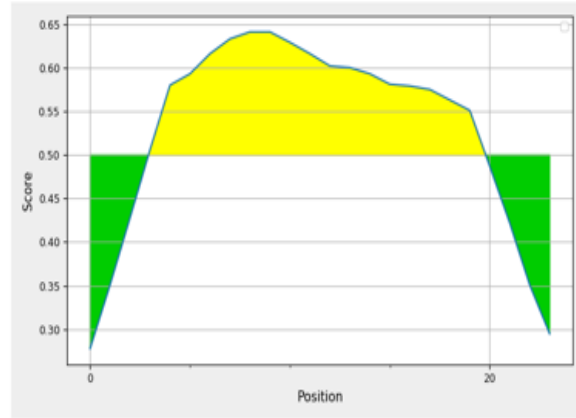
Center position: 4 Threshold: 0.500 

Average: 0.590 Minimum: 0.263 Maximum: 0.732

B**Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results**

Input Sequences

1 GQDHTSSRH EGPAGQTRLI ABAT

Center position: 4 Threshold: 0.500 

Average: 0.530 Minimum: 0.278 Maximum: 0.641

Figura 5. Predicción de epítomos lineales en la secuencia de SOL1.A: Gráfico generado en el servidor Bepired en el que se analizó la secuencia completa de SOL1 para predecir la presencia de epítomos lineales; **B:** Gráfico generado en el servidor Bepired en el que se analizó la región de SOL1 para sintetizar el péptido sintético. En ambos gráficos el color amarillo representa posibles epítomos lineales en la secuencia de aminoácidos, siendo la altura de los picos una mayor probabilidad, mientras que el color verde representa una baja probabilidad de presencia de epítomos lineales.

Adicionalmente, para identificar si la región del péptido sintético se encuentra expuesta en la estructura tridimensional de la proteína, se utilizó el modelo predicho por AlphaFold para ubicar esta región, en la Fig. 6 se muestra que la región del péptido sintético se encuentra en una zona expuesta en la superficie de la estructura de SOL1 en su estructura terciaria.

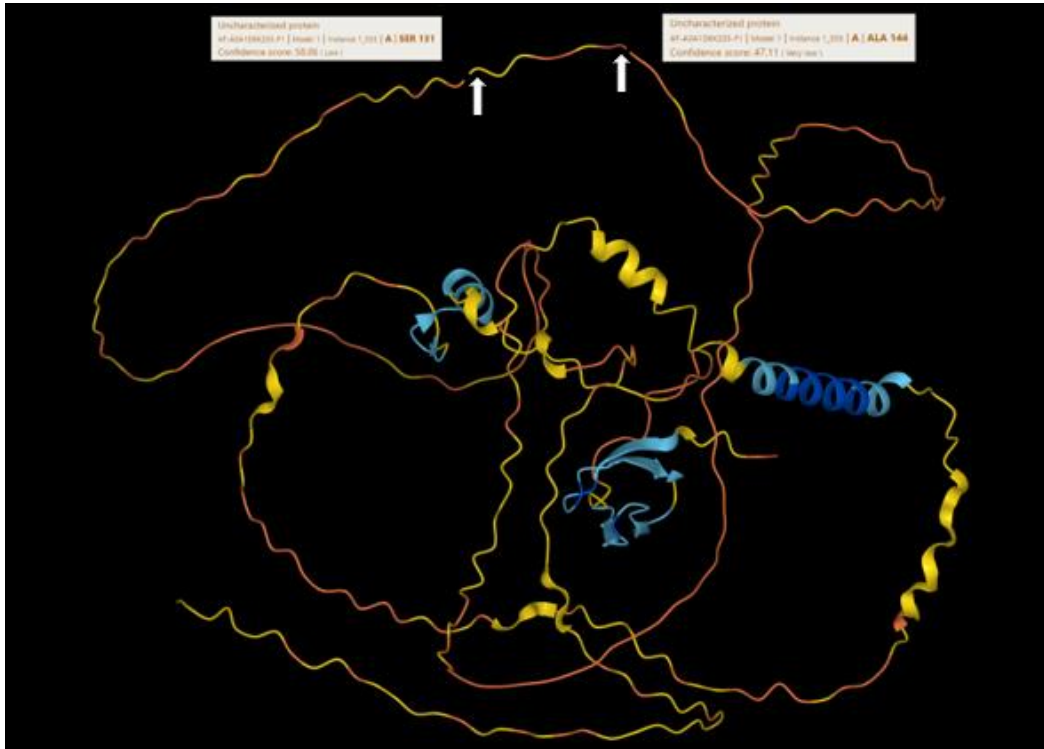


Figura 6. Localización de la región del péptido en la estructura terciaria de SOL1. Modelo de la estructura terciaria de la proteína SOL1 predicho por el programa AlphaFold; las flechas blancas señalan la zona que abarcan los aminoácidos usados para sintetizar el péptido.

3.3 Validación y prueba de anticuerpos en tejidos de maíz.

Una vez con la proteína desnaturalizada, renaturalizada y el péptido sintético, se purificaron los anticuerpos a partir del antisuero que se tenía en el laboratorio. En este sentido obtuvimos tres lotes de anticuerpos: el primero con anticuerpos que reconocen epítomos de la proteína desnaturalizada, el segundo de la proteína renaturalizada y el tercero los que reconocen epítomos del péptido sintético.

Los anticuerpos obtenidos se validaron por Western blot para confirmar que son específicos contra SOL1 y que no reconocen la etiqueta 6His, por lo que se usó otra proteína que también tiene la etiqueta 6His. En la Fig. 7 se muestra el Western blot para cada anticuerpo; con los tres se obtuvo la banda del tamaño esperado de 68

kDa en los carriles donde se cargó SOL1. Se muestra de forma clara que al usar los anticuerpos contra la proteína desnaturalizada y renaturalizada las bandas son más intensas (A y B), mientras que con el anticuerpo contra el péptido sintético las bandas son más definidas (C). De forma similar, en los tres casos se observan algunas bandas por debajo del peso de SOL1, las cuales pueden ser productos de degradación de la proteína recombinante.

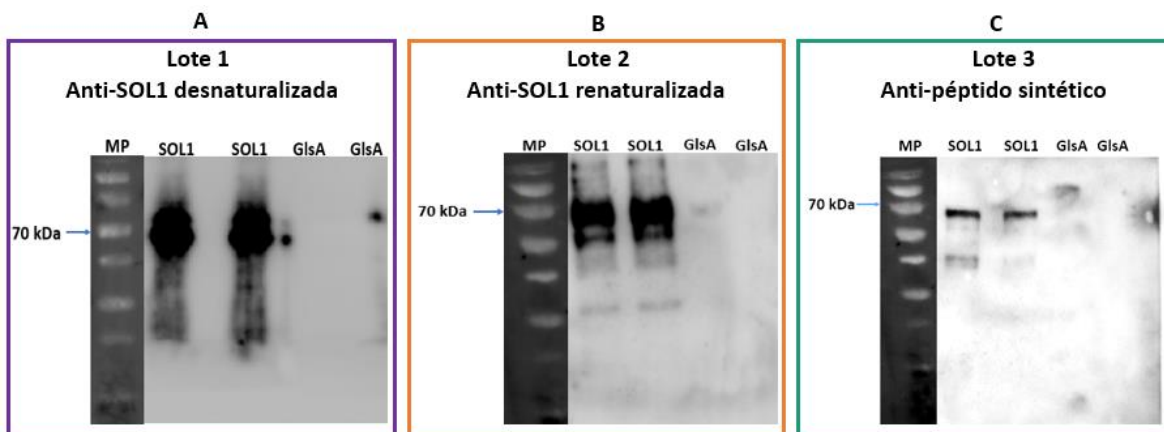


Figura 7. Análisis de especificidad de los anticuerpos contra SOL1 recombinante. **A:** Western blot usando el anticuerpo purificado contra la proteína desnaturalizada; en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el 2 y 3: SOL1 recombinante y en el 4 y 5: 6HIS-GlsA una proteína purificada con etiqueta de 6 histidinas. **B:** Western blot usando el anticuerpo purificado contra la proteína renaturalizada; en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el 2 y 3: SOL1 recombinante y en el 4 y 5: 6HIS-GlsA una proteína purificada con etiqueta de 6 histidinas. **C:** Western blot usando el anticuerpo purificado contra el péptido sintético; en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el 2 y 3: SOL1 recombinante y en el 4 y 5: 6HIS-GlsA una proteína purificada con etiqueta de 6 histidinas.

3.3.1 Tejidos de maíz con mayor abundancia de SOL1.

Luego de validar y comparar los anticuerpos purificados se realizó una búsqueda en la base de datos Maize GDB para definir los tejidos de maíz en los que se encuentra más abundante SOL1 y usarlos para probar la detección de los anticuerpos contra SOL1 en su forma nativa en la planta. En la Fig. 8 se muestra un

diagrama en el que está representada la abundancia del RNAm de SOL1 en los diferentes tejidos de maíz, siendo las espigas jóvenes, el endospermo y algunas zonas de la raíz primaria, las zonas con una mayor abundancia. A partir de estos datos y de la disponibilidad de tejido en el laboratorio se utilizó tejido de espiga joven, raíz y meristemo apical de maíz para experimentos de detección e inmunolocalización con los anticuerpos obtenidos.

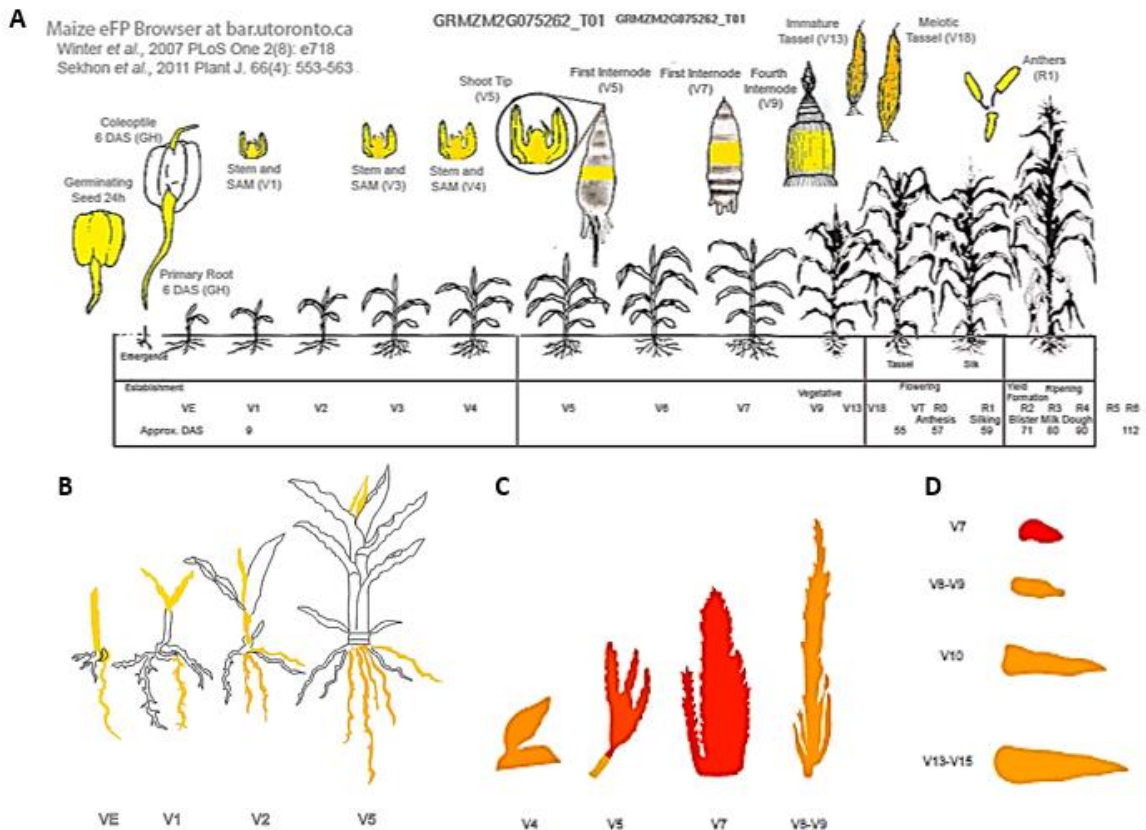


Figura 8. Esquema de la abundancia del ARNm de SOL1 en diferentes tejidos de maíz. Se muestran distintos tejidos de maíz donde el color indica la abundancia del RNAm con una escala de color que va desde el amarillo al rojo. **A:** Abundancia de SOL1 a lo largo de los estadios vegetativos (V) y reproductivos (R) de la planta de maíz. **B:** Tejidos de la raíz en diversos estadios vegetativos donde se localiza SOL1. **C:** Tejidos de espiga con diversos estadios vegetativos en los que se encuentra SOL1 con diferente nivel de abundancia. **D:** Tejidos de la aurícula en diversos estadios vegetativos en los que se encuentra SOL1 con diferente nivel de abundancia. MaizeGDB. (2021). Un enfoque

pangenómico de las bases de datos del genoma utilizando el maíz como sistema modelo. Recuperado de la base de datos de MaizeGDB.

3.3.2 Detección por inmunolocalización de SOL1 en tejidos de maíz.

A partir de cortes de tejido de espiga joven de maíz obtenidos de tejido incluido en bloques de parafina se realizaron ensayos de inmunolocalización. Como se muestra en la Fig. 9 panel A y C, se observa una muy tenue tinción de fondo que se distribuye a lo largo del tejido usado como control negativo, mientras que en el tejido del panel B la señal se localiza con mayor intensidad en primordios florales de las inflorescencias masculinas y en el panel D se muestra la tinción tenue en tejidos vasculares y con mayor intensidad en los núcleos de meristemas de flores masculinas, con el anticuerpo Anti-SOL1 desnaturalizada. De manera similar en las figuras E-G, se observa una tinción localizada principalmente en primordios florales en los cortes de espigas jóvenes. Estas inmunolocalizaciones se realizaron con el anticuerpo Anti-péptido sintético.

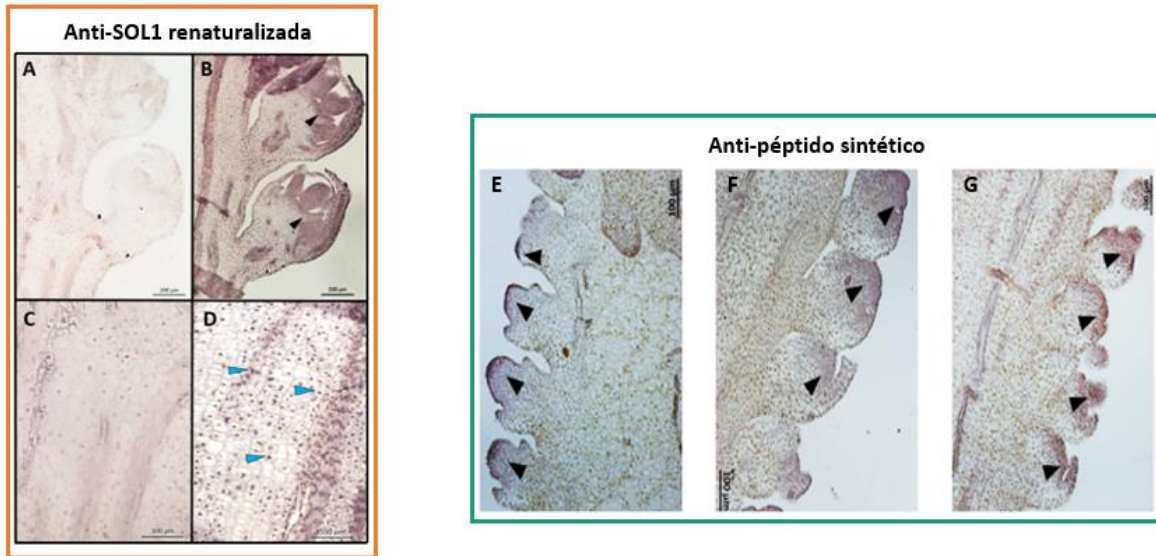


Figura 9. Detección de SOL1 en tejidos de espiga joven de maíz por inmunolocalización con distintos anticuerpos. Distintas muestras de tejido de espiga joven de maíz a distintas escalas. **A.** Control negativo (sin anticuerpo primario) donde solo se muestra la tinción de fondo en el tejido. **B.** Tejido donde se muestra con flechas negras la tinción localizada en la zona de primordios florales. Escala 200 μm . **C.** Control negativo (sin anticuerpo primario) donde solo se muestra la tinción de fondo en el tejido. **D.** Acercamiento en el tejido donde se señala con flechas azules los núcleos teñidos. Escala 100 μm . El anticuerpo primario utilizado corresponde al lote 2 (Anti-SOL1 renaturalizada) y como anticuerpo secundario se usó Anti-Rabbit conjugado con fosfatasa alcalina; la reacción se reveló con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP. En las imágenes **E, F y G** se muestran tejidos donde se señala con flechas negras la señal localizada en primordios de las espigas. Escala 100 μm . El anticuerpo primario utilizado corresponde al lote 3 (Anti-péptido sintético) y como anticuerpo secundario se usó Anti-Rabbit conjugado con fosfatasa alcalina; la reacción se reveló con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP.

3.3.3 Detección por Western blot de SOL1 en tejidos de maíz.

Con base en el resultado anterior, se probó extracto de proteína total a partir de tejido de meristemo apical obtenido de plantas de maíz 9 días después de la siembra (DAS, por sus siglas en inglés) Fig. 10A, se probaron los tres lotes de anticuerpos; en la Fig. 10B en el Western blot de la parte superior se observa una banda tenue del tamaño esperado de 68 kDa, sin embargo, se observa otra banda de aproximadamente 55 kDa, por lo que el anticuerpo Anti-SOL1 desnaturalizada además de reconocer a SOL1, también reconoce a otra proteína desconocida. Por

otro lado, no se obtuvo señal con los lotes 2 y 3 de anticuerpos de anti-SOL1 renaturalizada y anti-péptido sintético en extracto crudo de proteína de meristemo apical y raíz (Fig. 10C y D).

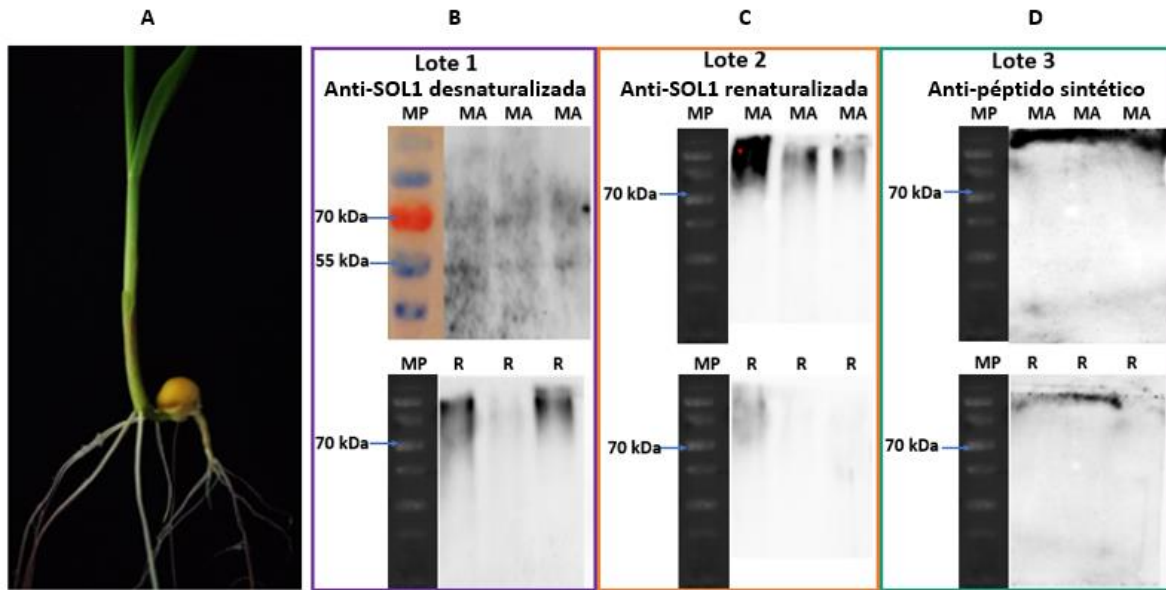


Figura 10. Análisis del extracto total de proteína de meristemo apical por Western blot con el anticuerpo purificado con la proteína renaturalizada. A: Planta de maíz con 9 días de edad germinadas en cámara bioclimática a partir de la que se extrajo proteína total para Western blot. **B:** Western blot superior usando como anticuerpo primario el lote 1 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit conjugado a HRP, en el carril 1: Marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestras de extracto de proteína total de meristemo apical de maíz; Western blot inferior usando como anticuerpo primario el lote 1 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit conjugado a HRP, en el carril 1: Marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestras de extracto de proteína total de raíz de maíz. **C:** Western blot superior usando como anticuerpo primario el lote 2 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit conjugado a HRP, en el carril 1: Marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestras de extracto de proteína total de meristemo apical de maíz; Western blot inferior usando como anticuerpo primario el lote 2 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit conjugado a HRP, en el carril 1: Marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestras de extracto de proteína total de raíz de maíz. **D:** Western blot superior usando como anticuerpo primario el lote 3 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit conjugado a HRP, en el carril 1: Marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestras de extracto de proteína total de meristemo apical de maíz; Western blot inferior usando como anticuerpo primario el lote 3 y como anticuerpo secundario Anti-Rabbit conjugado a HRP, en el carril 1: Marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestras de extracto de proteína total de raíz de maíz.

Debido a estos resultados se evaluó una nueva estrategia utilizando plantas de *Nicotiana benthamiana* como sistema heterólogo para la expresión de *sol1* y usar estos tejidos para probar los anticuerpos.

3.4 *N. benthamiana* como sistema heterólogo para expresar *Sol1*.

A partir de la construcción del vector pEarleyGate 104 con el gen *Sol1* con la que se contaba en el laboratorio; se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens*; las colonias positivas se confirmaron por PCR (Fig. 11). Una vez que se obtuvieron colonias positivas se cultivaron e indujeron en medio líquido para infiltrar hojas de *N. benthamiana*.

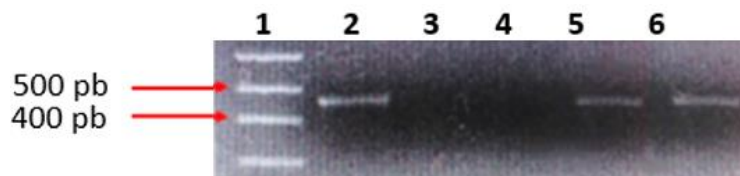


Figura 11. Amplificación de una región de *Sol1*. Gel de agarosa con la amplificación del fragmento de 455 pb del gen *Sol1* en las colonias positivas de *Agrobacterium tumefaciens* en los carriles 2 y 5. El carril 6 es un control positivo con DNA plasmídico.

3.4.1 Obtención de plantas transgénicas de *N. benthamiana* con expresión transitoria de SOL1.

Se usaron plantas de *N. benthamiana* de 45 días de edad (Fig. 12A). Como prueba preliminar de la expresión transitoria de SOL1, las hojas infiltradas con *A. tumefaciens* se observaron en un microscopio confocal. En la Fig. 12B se muestran células de *N. benthamiana* expresando la proteína de fusión YFP-SOL1 en el vector pEG104. Así mismo en la Fig.12C se observan células de *N. benthamiana* expresando la proteína de fusión SOL1-YFP en el vector pEG101. Se usó el vector

pEG104 sin la proteína SOL1, como control positivo de fluorescencia, el cual expresa la proteína YFP bajo el promotor constitutivo 35S. La señal de SOL1 se localiza principalmente en la periferia de las células (Figs. 12B y C), mientras que la señal del control positivo (Fig. 12D) se localiza en todos los compartimientos celulares.

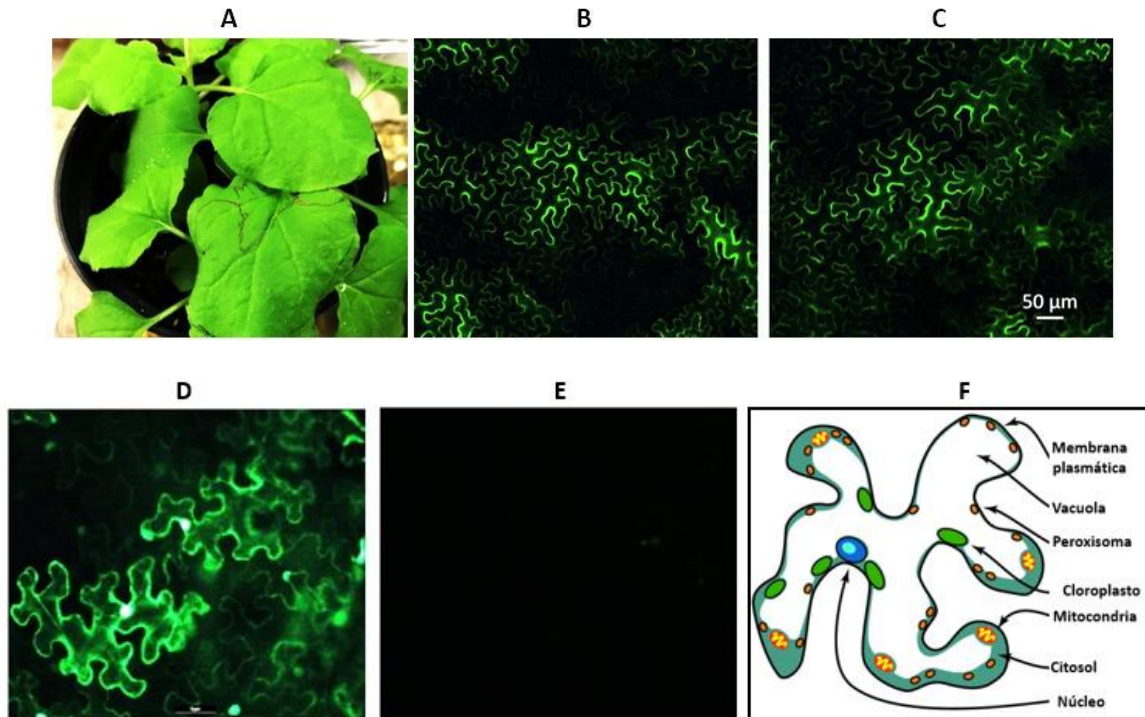


Figura 12. Expresión transitoria de SOL1 en *N. benthamiana*. A: Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con *A. tumefaciens*. B: Células de *N. benthamiana* infiltradas con el vector pEG101. C: células de *N. benthamiana* infiltradas con el vector pEG104. Ambas imágenes obtenidas por microscopio confocal. D: Control positivo, células de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el vector pEG104 sin la proteína SOL1. E: Control negativo, células de *N. benthamiana* agroinfiltradas con medio de inducción sin *A. tumefaciens*. F: Estructura y organelos de una célula típica de *N. benthamiana*. La figura F fue adaptada de Voges *et al.* (2013).

3.4.2 Anticuerpo Anti-SOL1 renaturalizada detecta a SOL1 expresada en tejidos de *N. benthamiana*

Después de confirmar la expresión de SOL1 en *N. benthamiana*, se molieron hojas agroinfiltradas para extraer proteína total de estos tejidos y con este extracto se

probaron por Western blot los 3 distintos lotes de anticuerpos. En la Figura 13B se muestra el Western blot con el anticuerpo Anti-SOL1 renaturalizada donde se observa una banda específica de 94 kDa aproximadamente (correspondientes a SOL1 68 kDa y la etiqueta de YFP 26 kDa), lo cual no se observó en los otros 2 lotes. Este resultado nos permitió establecer una base para explorar la localización de SOL1 expresada transitoriamente en *N. benthamiana*, esto se muestra en el apartado siguiente.

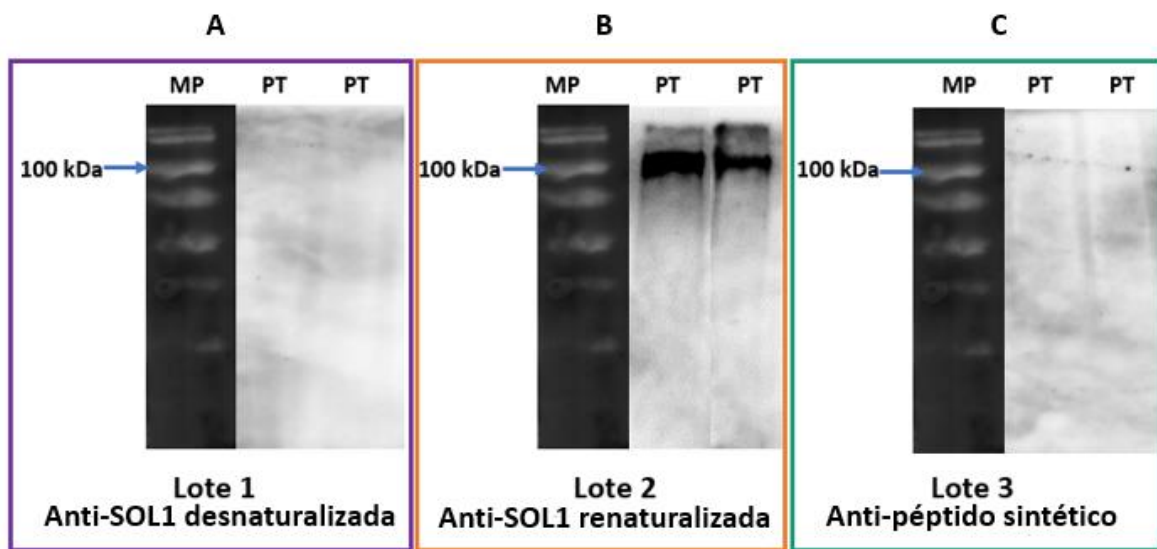


Figura 13. Western blot en tejidos de *N. benthamiana*. A: Western blot con anticuerpo contra SOL1 desnaturalizada. B: Western blot con anticuerpo contra SOL1 renaturalizada. C: Western usando el anticuerpo purificado contra el péptido sintético. PT: Extracto de proteína total de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. MP: marcador de peso molecular estándar de proteínas preteñidas PageRuler™ de 10 a 180 kDa.

3.4.4 Plasmólisis para determinar localización de SOL1 en células de *N. benthamiana*.

Distintas secciones de tejido agroinfiltrado de *N. benthamiana* se sometieron a un proceso de plasmólisis en una solución de manitol al 1M por 35 min y posteriormente observamos por microscopia confocal los efectos producidos, esto se hizo para

probar si la localización de SOL1 en este sistema heterólogo está restringido específicamente en la periferia de las células o se le puede encontrar en el citoplasma. En la Fig. 14B se observa cómo hay una zona de la membrana que parece estar retraída de la pared celular por lo que muestra una forma más globular en esta región. Este resultado preliminar sugiere que SOL1 se localiza en la membrana plasmática de la célula, sin embargo, es necesario estandarizar esta técnica para determinar de manera más clara la localización de SOL1 en diferentes compartimientos de las células de *N. benthamiana*.

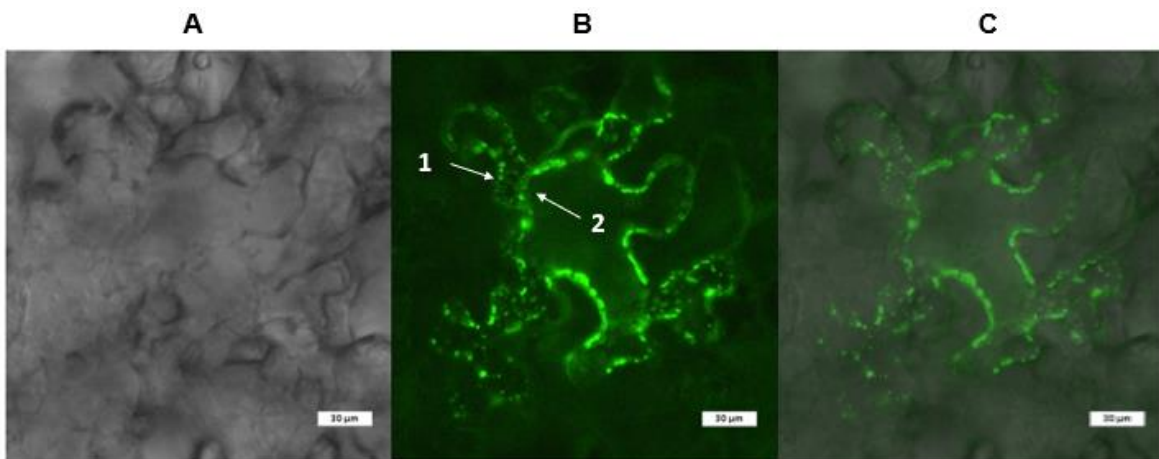


Figura 14. Microscopía confocal: SOL1 localizada en la membrana plasmática en células de *N. benthamiana*. Localización de SOL1 en una célula de *N. benthamiana* mostrada en **A**: campo claro, **B**: filtro YFP donde la flecha 1 señala la pared celular y la flecha 2 señala la membrana plasmática y **C**: Merge.

4. DISCUSIÓN

4.1 Producción y purificación de proteína recombinante

La etiqueta de GST para la purificación de proteínas es ampliamente utilizada, ya que resulta un método eficiente en la mayoría de los casos, además de que se ha reportado que aumenta la solubilidad de la proteína de fusión (Schäfer *et al.*, 2015). Sin embargo, en algunos casos la etiqueta de GST se puede escindir de la proteína a la cual se fusionó. La estructura tridimensional predicha para SOL1 muestra una estructura desorganizada, este tipo de proteínas se han descrito como aquellas que carecen total o parcialmente de una estructura tridimensional estable bien definida, esta conformación es determinada por el contenido de aminoácidos que generalmente se refleja en una baja abundancia de aminoácidos de gran tamaño como Val, Met, Trp y Tyr; mientras que albergan una mayor abundancia de aminoácidos polares como Ser, Pro, Glu, Arg y en algunos casos también aminoácidos pequeños como Ala y Gly (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2011). Esta descripción coincide con la estructura de SOL1 cuya secuencia de aminoácidos obedece las características mencionadas y le confieren una estructura parcialmente desorganizada que posiblemente intervenga en la estabilidad de la fusión con la etiqueta de GST y esto impide que pueda purificarse de manera eficiente por cromatografía de afinidad a partir de la misma. En la literatura se han reportado algunos problemas para la purificación de proteínas marcadas con GST, estos están relacionados principalmente con la elución de proteínas, probablemente debido a que la glutatión S-transferasa tiende a formar dímeros y en algunos casos la

proteína de interés es propensa a oligomerizarse y esto resulte en oligómeros que se quedan quelados en la matriz de afinidad (Vinckier *et al.*, 2011).

Ahora bien, la etiqueta 6His representa otro de los métodos de purificación más empleados para purificar proteínas de interés que ofrece la posibilidad de purificar proteínas en condiciones nativas o desnaturizantes; esta etiqueta es clasificada como etiqueta de epítipo (Spriestersbach *et al.*, 2015). En nuestros resultados obtuvimos eluciones de SOL1 mucho más eficientes con esta etiqueta posiblemente debido a que esta etiqueta es de menor tamaño y además puede ser purificada en condiciones desnaturizantes, lo que parece ser un ambiente más adecuado para la purificación de SOL1.

4.2 Búsqueda de una región para sintetizar un péptido específico para la re-purificación de un anticuerpo anti-SOL1.

Actualmente el uso de péptidos sintéticos para la producción de anticuerpos ha tenido un gran auge para el desarrollo de vacunas de distintos tipos, y son comúnmente usados para obtener anticuerpos específicos (Björling y Uhlén., 2008). En este sentido, se utilizó esta estrategia para purificar algunos de los anticuerpos específicos presentes en el antisuero que se tenía ya producido contra SOL1, además de considerar usar este péptido sintético en una nueva inmunización de ser necesaria, por ello se evaluó la predicción de epítopos lineales en la secuencia de SOL1 en donde se mostró que gran parte de la proteína se predice como epítopos lineales. Bepipred es uno de los servidores más utilizados para predecir epítopos

lineales y conformacionales en el área de la inmunoinformática que permite la identificación de epítomos antigénicos (Raoufi *et al.*, 2020).

El péptido que utilizamos en este trabajo fue sintetizado en fase sólida por GenScript, en este proceso la síntesis del péptido se lleva a cabo desde el extremo carboxilo terminal al amino terminal usando como soporte una resina con un grupo amino libre en el que se unen uno a uno los aminoácidos que conformaran el péptido, entre cada ciclo de unión el grupo amino del aminoácido que se agregó se protege hasta que se añade el siguiente hasta terminar la síntesis (Pícha *et al.*, 2020). Además de determinar una región donde no coincidan los aminoácidos de la proteína SOL1 con SISTER SOL, y determinar la estructura predicha para SOL1 empleando AlphaFold localizamos que la región donde se sintetizó el péptido es una región expuesta en la estructura de SOL1 y que probablemente sea de fácil acceso para ser reconocida por los anticuerpos que posteriormente pueden servir para reconocer a SOL1 en condiciones nativas, de esta manera los anticuerpos purificados contra el péptido sintético reconocen específicamente a SOL1.

4.3 Validación y prueba de anticuerpos en tejidos de maíz.

La detección de proteínas por Western blot es un proceso que depende principalmente de la interacción antígeno-anticuerpo por eso es importante determinar las condiciones en las que se lleva a cabo este tipo de ensayos. En muchas ocasiones la muestra proteica es desnaturalizada por diversos agentes como los detergentes, por lo que los epítomos conformacionales compuestos por varias regiones de la secuencia de la proteína ya no estarán presentes, por esta

razón en este tipo de muestras es recomendable utilizar anticuerpos que reconocen epítomos lineales en la secuencia de la proteína; sin embargo, no es posible predecir la funcionalidad de los anticuerpos por lo que, lo más conveniente es probarlos en diferentes tipos de ensayos (Björling & Uhlén, 2008).

Generalmente cuando se trabaja con anticuerpos, los conceptos de sensibilidad y especificidad son de gran importancia, ya que a pesar de que un resultado ideal sería que solo se reconozca la proteína de interés, se ha reportado que en la comunidad científica es aceptable el hecho de que al realizar un Western blot las proteínas que no sean la de interés pudieran ser detectadas, generalmente las bandas adicionales que pudieran obtenerse se presentan en forma de manchas o incluso en varias bandas de distintos tamaños moleculares; estas bandas adicionales podrían corresponder a diversas formas de la proteína objetivo ((Signore & Reeder 2012). De acuerdo con la literatura nuestros anticuerpos muestran una validación adecuada, ya que un anticuerpo puede considerarse como validado si se obtiene una banda del tamaño esperado, aún si este presenta bandas adicionales mientras éstas muestren una intensidad menor al 20% de la señal de la banda esperada, ya que pueden ser versiones modificadas postraduccionalmente o productos de splicing alternativo, así como productos de degradación de la misma proteína en cuestión (Signore & Reeder 2012).

Es importante tener en cuenta el uso final que tendrán los anticuerpos, específicamente para aplicaciones que involucran la preparación de secciones de tejido que conservan su estructura tridimensional, suelen usarse anticuerpos policlonales principalmente por dos razones: reconocen múltiples epítomos independientes, por lo que es más probable que puedan unirse a epítomos

disponibles en las muestras fijadas; en tal sentido no es práctico evaluar una gran cantidad de tejidos en busca de anticuerpos monoclonales que funcionen en este tipo de ensayos (Lipman *et al.*, 2005). En nuestros resultados de inmunolocalización en tejidos de espigas jóvenes de maíz confirmamos que los anticuerpos policlonales funcionan de manera adecuada para detección de epítomos en secciones de inflorescencias masculinas.

En este trabajo se probaron diferentes tejidos de maíz; de las diferentes zonas de la raíz se utilizó la zona 4, debido a que se ha reportado que los genes con expresión predominante en esta región son aquellos relacionados con actividades para la reserva de nutrientes, cinasas y proteínas de fosforilación, así como de la regulación de la transcripción, familias WRKY y biosíntesis de flavonoides (Stelpflug *et al.*, 2016), además del soporte de los datos obtenidos de Maize GDB; sin embargo, cabe resaltar que estos datos representan la abundancia del ARNm de SOL1 y no de la proteína, por lo que una vez que el ARNm se traduce a proteína, esta puede ser transportada a otros tejidos de la planta; posiblemente este puede ser un motivo por el que no fue posible detectar la proteína en estas zonas por Western blot (Fig. 10). Por otro lado, también es posible que la cantidad de proteína en estos tejidos sea muy escasa y por ende no sea suficiente para ser detectada por Western blot, ya que a diferencia de los experimentos de inmunolocalización donde se utiliza un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina, los ensayos por Western blot utilizan un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano; esta diferencia entre métodos de detección es importante pues posiblemente para Western blot es necesario contar con una mayor abundancia de la proteína para que sea posible detectarla. Otro factor que puede influir en la detección de proteínas poco

abundantes es su localización subcelular, es probable que, al estar anclada a la membrana plasmática, la proteína SOL1 requiera el uso de detergentes iónicos para poder extraerla de las células y poder detectarla.

Otro aspecto que pudimos observar entre nuestros resultados contrario a lo que dice la literatura para los anticuerpos que reconocen epítomos lineales, es que el anticuerpo purificado contra la proteína renaturalizada es capaz de detectar a SOL1 en tejidos de *N. benthamiana* por Western blot mientras que el anticuerpo purificado contra el péptido sintético no. Sin embargo, es importante destacar el hecho de que fueron purificados a partir de un antisuero con una mezcla de anticuerpos que reconocen diversos epítomos de toda la estructura de SOL1, por lo que posiblemente la cantidad de anticuerpos que reconocen la región del péptido sintético son menores en cantidad a los que pueden reconocer cualquier otra parte de la secuencia en la proteína renaturalizada; por tal motivo sigue siendo de interés tener anticuerpos que sean producidos específicamente contra el péptido sintético y probarlos en los distintos ensayos para reconocer a SOL1.

4.4 *N. benthamiana* como sistema heterólogo para expresar *Sol1*.

La expresión heteróloga de proteínas en plantas modelo como *N. benthamiana* representa una herramienta de gran utilidad en el desarrollo de conocimiento para distintas proteínas de diferentes especies. Para la expresión de transgenes en plantas uno de los promotores más usados es el 35S proveniente del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el cual es considerado como un promotor constitutivo fuerte que muestra una alta actividad transcripcional, razón por la que se usa para

obtener cantidad de proteínas foráneas en plantas transgénicas. Actualmente se ha estudiado si la expresión de las proteínas bajo este promotor varía en función de los diferentes tejidos de la planta (Kiselev *et al.*, 2021). La expresión heteróloga de SOL1 en *N. benthamiana* con los vectores pEG101 y pEG104 con el promotor 35S luego de ser evaluada con microscopio confocal, mostró una expresión inducida exitosa en la mayoría de las células de las hojas infiltradas. Por otra parte, a diferencia de lo que observamos en la inmunolocalización en tejidos de maíz, en *N. benthamiana* no se detectó SOL1 en núcleos, esto sugiere que las condiciones que determinan su localización subcelular no son las mismas entre estas dos especies. Por otra parte, la plasmólisis hace referencia a una disminución en el volumen de las células que es causada por el flujo de agua cuando la célula se expone a solutos hiperosmóticos (por ejemplo; sacarosa, manitol o sorbitol) así la vacuola pierde agua y si el estado hiperosmótico se mantiene el protoplasto se retrae de manera que se desprende la membrana plasmática de la pared celular y el potencial hídrico fuera de la célula es menor al necesario para derogar la presión hidrostática de la turgencia, este fenómeno es reversible al agregar soluciones hipotónicas o agua simple, de esta manera se produce la expansión del protoplasto y se recupera la presión de turgencia (Cheng *et al.*, 2017; Lang *et al.*, 2014). Debido a que este proceso es observable por microscopía, la plasmólisis se usa generalmente para estudiar el espacio y vínculo entre las dos estructuras, durante la plasmólisis también pueden observarse una serie de hebras finas en forma de red llamadas hebras hechtianas en el espacio periplásmico que unen el protoplasto a la pared celular de las células plasmolizadas (Lang *et al.*, 2014). En nuestras imágenes de microscopía luego del tratamiento de plasmólisis en las células, muestran que en

algunas de las células se observan dos capas, que posiblemente corresponde a la pared celular y la membrana plasmática. Este tipo de plasmólisis podría asemejarse a una de las descritas por Woldringh en 1994, en la que se observa la retracción en forma de globo del protoplasto reduciendo un 70% su volumen luego de una leve plasmólisis; mientras que en algunas otras células también es posible observar una retracción polar de la membrana, donde el protoplasto reduce su volumen original, en este tipo de plasmólisis pueden observarse algunas arrugas en las membranas internas y externas; sin embargo en nuestras imágenes solo es posible observar las dos membranas mayormente sin arrugas tan apreciables.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Transformación de *E. coli Rosetta* con el gen *Sol1*.

Se analizó la expresión del gen *Sol1* en bacteria clonado en dos vectores de expresión diferentes: pDEST15 con etiqueta de GST y pDEST17 con etiqueta de 6His, se transformaron células *E. coli Rosetta* por choque térmico con los vectores de expresión pDEST15-*Sol1* y pDEST17-*Sol1* respectivamente.

5.2 Inducción de la proteína recombinante.

Para la inducción de las proteínas recombinantes, se evaluaron dos concentraciones diferentes de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG): 0.4 mM y 1 mM; a una DO₆₀₀ nm en un rango de 0.5 a 0.7. Una vez determinada la concentración óptima para la inducción, se indujo el cultivo de células transformadas de *E. coli Rosetta* y se incubaron a 28°C con agitación toda la noche.

5.3 Análisis de proteínas recombinantes por SDS-PAGE.

Para analizar la inducción de la proteína se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%. Se tomaron 200 μ L de cultivo bacteriano y se centrifugaron a 12,000 rpm 2 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se incubó a -20°C hasta congelarse, después se agregaron 50 μ L de buffer de carga 1X y se calentaron en termoblock a 90°C por 5 min, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 min y se cargaron las muestras en los pocillos del gel. Se dejó correr durante 2 h aproximadamente, a 80 V en la parte concentradora del gel y a 120 V en la parte separadora del gel, hasta que las muestras llegaron casi al final del gel. Al finalizar la corrida el gel se tiñó con azul de coomassie.

5.4 Purificación de la proteína recombinante con etiqueta GST.

La proteína expresada con el vector de expresión pDEST15-*So1*, se purificó utilizando las perlas: beads Glutathione Sepharose® 4B. El cultivo inducido de *E. coli Rosetta* se centrifugó para obtener las células, se lisaron, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, luego se mezcló con las beads y se incubó con agitación ligera. Para eluir la proteína se agregó glutatión reducido 10 mM, se obtuvieron 3 eluciones y se conservaron a 4°C hasta su uso.

5.5 Purificación de proteína la recombinante con etiqueta 6HIS.

La proteína expresada con el vector de expresión pDEST17-*So1*, se purificó utilizando Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged. Para que la purificación se diera en condiciones nativas, todo el proceso se realizó con las muestras en hielo; se añadieron 2 mL de buffer de lisis NaH₂PO₄ 1M, NaCl 4M e imidazol 1M por gramo de pastilla bacteriana, se agregó lisozyrna a una concentración de 1 mg/mL y se incubó la mezcla durante 30 min, luego se sonicó 6 veces por 10 s cada una con intervalos de 30 s entre cada vez, se centrifugó 30 min a 12,000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante y se incubó 2 h a 4°C en rotación con la resina previamente equilibrada. Después se centrifugó a 2,500 rpm 2 min, se descartó el sobrenadante y se agregó buffer de lavado NaH₂PO₄, tris base pH 6.5 y se centrifugó a 2,500 rpm 2 min, se descartó el sobrenadante y se repitió este paso hasta terminarse 150 mL de buffer de lavado. Para eluir la proteína se agregó buffer de elución (buffer de lavado con imidazol) 200, 250 y 300 mM para las tres eluciones respectivamente y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Para la purificación en condiciones desnaturalizantes el cultivo inducido de *E. coli* Rosetta se centrifugó se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer de lisis con NaH_2PO_4 , tris base y clorhidrato de guanidina pH 8.0 y se incubó 1 h, se centrifugó 10,000 rpm 15 min a 20°C y se recuperó el sobrenadante y se incubó 2 h en rotación con la resina previamente equilibrada. Después se centrifugó a 2,500 rpm 2 min, se descartó el sobrenadante y se agregó buffer de lavado NaH_2PO_4 , tris base y urea 8 M pH 6.5 y se centrifugó a 2,500 rpm 2 min, se descartó el sobrenadante y se repitió este paso hasta terminarse 150 mL de buffer de lavado. Para eluir la proteína se agregó buffer de elución buffer de lavado a pH 5.0, 4.0 y 3.0 para las eluciones respectivamente y se conservaron a 4°C hasta su uso. Para el tratamiento de renaturalización se sustituyó el buffer desnaturalizante por otro, para favorecer el replegamiento de la proteína en un buffer con NaH_2PO_4 1M, NaCl 4M e imidazol, este último en tres concentraciones diferentes: 200 mM, 250 mM y 300 mM para la elución 1, 2 y 3 respectivamente.

5.6 Purificación de anticuerpo específico.

Para la purificación del anticuerpo por afinidad a la proteína de interés, el antisuero Anti-SOL1 se mezcló con la proteína de interés unida covalentemente a perlas magnéticas y se incubaron a 4°C. Se lavaron 5 veces las perlas con PBS 1X + T, descartando el sobrenadante en el separador magnético después de cada lavado. Para recuperar el anticuerpo unido a las perlas se usó Glicina 0.1 M pH 2.5, en el separador magnético, los anticuerpos obtenidos se neutralizaron inmediatamente con buffer Tris-HCl pH 8.0. Se almacenó el anticuerpo a 4°C hasta su uso.

5.7 Western blot.

Para confirmar la presencia de la proteína SOL1 se realizó un Western blot, el gel de acrilamida con la proteína se sumergió durante 15 min en buffer de transferencia. Se cortó la membrana de PVDF adecuada al tamaño del gel y se activó en metanol al 100% por 1 min, posteriormente se transfirió al buffer de transferencia con el gel. Se colocaron sobre el cassette 4 telas húmedas y se extendieron con la ayuda de un rodillo, se colocó sobre éstas la membrana de PVDF y sobre ésta el gel, por último, se colocaron 4 telas húmedas más y se eliminaron las burbujas entre las capas con el rodillo; se tapó el casete y se programó la transferencia a la membrana por 5 minutos a 7 voltios. Posteriormente se dejó secar la membrana y luego se sumergió en metanol al 100% durante 1 minuto. Se pasó a un recipiente con solución bloqueadora y se incubó 45 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavó 3 veces por 3 min con buffer de lavado y luego se agregó el anticuerpo primario diluido en solución bloqueadora y se incubó durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces por 5 min con buffer de lavado y luego se agregó el anticuerpo secundario diluido en solución bloqueadora y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Después se lavó la membrana 4 veces 5 min con buffer de lavado. Se colocó la membrana sobre un plástico y se agregaron 300 µL de sustrato Clarity™ Western ELC Peroxide solution, y 300 µL de sustrato Clarity™ Western ECL Luminol/enhancer solution; se incubó por 5 min a temperatura ambiente, finalmente se reveló en ChemiDoc MP Imaging System.

5.8 Dot blot.

Extractos de proteína total de diferentes tejidos de planta de maíz se colocaron en gotas por triplicado en membrana de PVDF, se dejó secar, se bloqueó y se agregó el anticuerpo primario, se incubó durante toda la noche en agitación a 4°C. Luego se lavó la membrana y se agregó el anticuerpo secundario, se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Después se agregó sustrato Clarity™ Western ELC Peroxide solution, y sustrato Clarity™ Western ECL Luminol/enhancer solution; se reveló en ChemiDoc MP Imaging System.

5.9 Inmunolocalización de proteínas en maíz, asistida por recuperación de epítomos inducida por calor.

Se realizaron cortes en tejidos de espiga joven de maíz incluidos en parafina de 10 µm en microtomo y se montaron en portaobjetos, éstos se fijaron en horno a 60°C toda la noche. Al día siguiente los portaobjetos se desparafinaron y rehidrataron en un frasco de Copeland sumergiéndolos en 50 mL de los siguientes reactivos a temperatura ambiente: 100% Histoclear durante 10 min dos veces, 100% EtOH durante 1 min dos veces, 95% de EtOH durante 1 min, 85% de EtOH 25 durante 1 min, 70% de EtOH durante 1 min, EtOH al 50% durante 1 min y finalmente en agua durante 1 min. Para la recuperación y bloqueo del epítomo inducida por calor se transfirieron los portaobjetos a una rejilla de portaobjetos no metálica colocada en un recipiente apto para microondas; se cubrieron con tampón citrato de sodio 10 mM pH 6.0. Los portaobjetos se hirvieron en microondas durante 2 min y se dejó que los portaobjetos se enfríen durante 40 min a temperatura ambiente sumergidos en el tampón. Para el etiquetado de anticuerpos se lavaron los portaobjetos en 50

mL de 1x PBS durante 1 min en un recipiente Copeland. Luego se secaron los portaobjetos sobre toallas de papel y se aplicaron 150 μ L de solución de bloqueo en cada portaobjeto, se cubrió con parafilm cada uno y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se retiraron los parafilms con pinzas asegurándose de no tocar el tejido en los portaobjetos; se enjuagaron una vez con 50 mL de solución de bloqueo en un recipiente Copeland. Los portaobjetos se secaron parcialmente sobre toallas de papel durante unos segundos. Se aplicaron 150 μ L del anticuerpo primario y se cubrió con parafilm, posteriormente se incubaron en una cámara húmeda durante 1 a 2 h a temperatura ambiente. Después se retiró el parafilm, se colocaron los portaobjetos en un recipiente y se cubrieron con 50 mL de buffer de lavado durante 15 min con agitación suave. Se repitió el lavado reemplazando el buffer de lavado dos veces más (tres veces en total). Se aplicaron 150 μ L del anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo, se cubrió con parafilm y se incubaron en una cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. Después se retiró el parafilm y los portaobjetos se colocaron en un recipiente y se cubrieron con 100 mL de buffer de lavado con agitación suave. Posteriormente se repitió el lavado tres veces. Se enjuagaron los portaobjetos durante 2 min en 1x PBS. Se aplicaron 250 μ L de solución NBT/BCIP en cada portaobjetos. Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se observaron los portaobjetos a medida que se desarrolló la señal de color. Se escurrieron sobre toallas de papel y se detuvo la reacción sumergiéndolos en agua. Se agregaron 4 gotas de glicerol al 50% a los portaobjetos secos, y se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjetos evitando generar burbujas de aire; finalmente se observó en microscopio óptico.

5.10 Transformación de *A. tumefaciens* por choque térmico.

Se utilizó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, se agregaron 2 µL de DNA plasmídico, la mezcla se incubó a 37°C durante 2 min, se transfirieron a hielo y se incubaron por 10 min. Se agregaron 500 µL de medio LB sin antibióticos y se incubó por 2 h a 28°C con agitación. Se sembraron 200 µL del cultivo en placa de LB con kanamicina y rifampicina y se incubó por 2 días a 28°C.

5.11 Amplificación de un fragmento de *Sol1*.

Para la identificación de colonias positivas se realizó PCR de colonia, se tomó una muestra de todas las colonias obtenidas y cada una se resuspendió en 20 µL de tris 10 mM y se calentaron a 95°C por 5 minutos. La reacción se realizó con los primers FWD CACCGCGGACTGCAAGCCAAG y REV CTGACGCAGCTGGAGCAGAT al 10 mM que amplifican una región del gen *Sol1* correspondiente a 450 pb. Las condiciones usadas para el PCR fueron 95°C 2 min, 95°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 1 min y 72°C 7 min. Las colonias identificadas como positivas se cultivaron en medio líquido y se hicieron respaldos en glicerol.

5.12 Material vegetal.

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de 45 a 60 días crecidas en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 23°C.

5.13 Agroinfiltración.

Los cultivos de *A. tumefaciens* se crecieron a partir de stock de glicerol en medio LB con los antibióticos kanamicina y rifampicina por 48 h a 28°C. Los cultivos se precipitaron por centrifugación a 2,500 rpm por 12 min, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 5 mL de medio MES 10 mM, acetosiringona 200 mM

disuelta en 250 μ L DMSO y $MgCl_2$ 10 mM. La mezcla se incubó en agitación a 60 rpm a temperatura ambiente por 4 h. Se midió la densidad óptica en espectrómetro a 600nm y se ajustó hasta 0.1. Se infiltró con esta concentración hojas de *N. benthamiana* presionando con jeringa sin aguja sobre la hoja hasta formar un círculo visible de absorción que se expande a lo largo de la hoja.

5.14 Obtención de tejido infiltrado de *N. benthamiana*.

Las hojas infiltradas con los vectores pEarleyGate101 y pEarleyGate104 en *A. tumefaciens* fueron recolectadas y congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente molidas en mortero, el tejido se recuperó en un tubo falcon de 50 mL y se guardó hasta su uso.

5.16 Plasmólisis

Se cortaron secciones de las hojas infiltradas y se incubaron en tubos Eppendorf con una solución de manitol al 1M por 35 min, luego las nuestras se montaron en portaobjetos y se observaron al microscopio.

6. CONCLUSIONES

1. Es posible purificar a SOL1 usando la etiqueta de 6His en condiciones desnaturalizantes.
2. El anticuerpo purificado contra la proteína renaturalizada ofrece mayor sensibilidad, mientras que el anticuerpo purificado contra el péptido sintético ofrece mayor especificidad contra SOL1 en condiciones *in vitro*.
3. Los anticuerpos purificados detectan a SOL1 por ensayos de inmunolocalización en tejidos fijados de espiga joven de maíz.
4. Los anticuerpos purificados no son adecuados para la detección de SOL1 a niveles fisiológicos por Western blot en los tejidos de maíz evaluados.
5. El anticuerpo purificado contra la proteína renaturalizada es eficiente para detectar a SOL1 expresada de manera transitoria bajo un promotor constitutivo en *N. benthamiana*.
6. SOL1 se localiza en la membrana de las células de *N. benthamiana*.

7. PERSPECTIVAS

1. Expresar transitoriamente SOL1 en protoplastos de maíz para llevar a cabo inmunoprecipitación usando el anticuerpo purificado con la proteína renaturalizada.
2. Identificar proteínas que interaccionan con SOL1 expresada transitoriamente en protoplastos de maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). How plants defend themselves against pathogens. *Plant Pathology*. (Ed) Elsevier. pp. 232-233.
- Anderson, A., St Aubin, B., Abraham-Juárez, M. J., Leiboff, S., Shen, Z., Briggs, S., Brunkard, J. O., & Hake, S. (2019). The Second site modifier, Sympathy for the ligule, encodes a homolog of *Arabidopsis* ENHANCED DISEASE RESISTANCE4 and rescues the Liguleless narrow maize mutant. *The Plant Cell*, 31(8), 1829–1844. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00840>
- Buescher, E. M., Moon, J., Runkel, A., Hake, S., & Dilkes, B. P. (2014). Natural variation at sympathy for the ligule controls penetrance of the semidominant Liguleless narrow-R mutation in *Zea mays*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(12), 2297-2306. <https://doi.org/10.1534/g3.114.014183>
- Björling, E., & Uhlén, M. (2008). Antibodypedia, a portal for sharing antibody and antigen validation data. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 7(10), 2028–2037. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800264-MCP200>
- Cheng, C., Gao, X., Feng, B., Sheen, J., Shan, L., & He, P. (2013). Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nature Communications*, 4, 2530. <https://doi.org/10.1038/ncomms3530>
- Cheng, X., Lang, I., Adeniji, O. S., & Griffing, L. (2017). Plasmolysis-deplasmolysis causes changes in endoplasmic reticulum form, movement, flow, and cytoskeletal association. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4075–4087. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx243>
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., & Felix, G. (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell*, 18(2), 465–476. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036574>
- Cuevas-Velázquez, C. L., & Covarrubias-Robles, A. A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(2), 97-105.
- Cui, H., Gobbato, E., Kracher, B., Qiu, J., Bautor, J., & Parker, J. E. (2017). A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity. *The New Phytologist*, 213(4), 1802–1817. <https://doi.org/10.1111/nph.14302>
- Frye, C. A., Tang, D., & Innes, R. W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 373–378. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.373>

- Hua, J., Grisafi, P., Cheng, S. H., & Fink, G. R. (2001). Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis* BON1 and BAP1 genes. *Genes & Development*, 15(17), 2263–2272. <https://doi.org/10.1101/gad.918101>
- Kiselev, K. V., Aleynova, O. A., Ogneva, Z. V., Suprun, A. R., & Dubrovina, A. S. (2021). 35S promoter-driven transgenes are variably expressed in different organs of *Arabidopsis thaliana* and in response to abiotic stress. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2235–2241. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06235-x>
- Kong, Q., Qu, N., Gao, M., Zhang, Z., Ding, X., Yang, F., Li, Y., Dong, O. X., Chen, S., Li, X., & Zhang, Y. (2012). The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(5), 2225–2236. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097253>
- LaJeunesse, D. R., McCartney, B. M., & Fehon, R. G. (2001). A systematic screen for dominant second-site modifiers of Merlin/NF2 phenotypes reveals an interaction with blistered/DSRF and scribbler. *Genetics*, 158(2), 667–679. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.667>
- Lang, I., Sassmann, S., Schmidt, B., & Komis, G. (2014). Plasmolysis: Loss of Turgor and Beyond. *Plants (Basel, Switzerland)*, 3(4), 583–593. <https://doi.org/10.3390/plants3040583>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Liu, N., Hake, K., Wang, W., Zhao, T., Romeis, T., & Tang, D. (2017). CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE5 associates with the truncated NLR protein TIR-NBS2 to contribute to exo70B1-mediated immunity. *The Plant Cell*, 29(4), 746–759. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00822>
- Lolle, S., Greeff, C., Petersen, K., Roux, M., Jensen, M. K., Bressendorff, S., Rodriguez, E., Sømark, K., Mundy, J., & Petersen, M. (2017). Matching NLR immune receptors to autoimmunity in camta3 mutants using antimorphic NLR alleles. *Cell Host & Microbe*, 21(4), 518–529.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.005>
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>
- Moon, J., Candela, H., & Hake, S. (2013). The Liguleless narrow mutation affects proximal-distal signaling and leaf growth. *Development (Cambridge, England)*, 140(2), 405–412. <https://doi.org/10.1242/dev.085787>
- Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant

- defence. *Current Issues in Molecular Biology*, 23, 1–16. <https://doi.org/10.21775/cimb.023.001>
- Ngou, B., Ahn, H. K., Ding, P., & Jones, J. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592(7852), 110–115. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>
- Noutoshi, Y., Ito, T., Seki, M., Nakashita, H., Yoshida, S., Marco, Y., Shirasu, K., & Shinozaki, K. (2005). A single amino acid insertion in the WRKY domain of the *Arabidopsis* TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*, 43(6), 873–888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02500.x>
- Pícha, J., Buděšínský, M., Mitrová, K., & Jiráček, J. (2020). Acid-stable ester linkers for the solid-phase synthesis of immobilized peptides. *ChemPlusChem*, 85(6), 1297–1306. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000246>
- Pizarro, L., Leibman-Markus, M., Gupta, R., Kovetz, N., Shtein, I., Bar, E., Davidovich-Rikanati, R., Zarivach, R., Lewinsohn, E., Avni, A., & Bar, M. (2020). A gain of function mutation in SINRC4a enhances basal immunity resulting in broad-spectrum disease resistance. *Communications Biology*, 3(1), 404. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01130-w>
- Raoufi, E., Hemmati, M., Eftekhari, S., Khaksaran, K., Mahmodi, Z., Farajollahi, M. M., & Mohsenzadegan, M. (2020). Epitope prediction by novel immunoinformatics approach: A state-of-the-art review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 1155–1163. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09918-z>
- Rodriguez, E., Chevalier, J., El Ghouli, H., Voldum-Clausen, K., Mundy, J., & Petersen, M. (2018). DNA damage as a consequence of NLR activation. *PLoS Genetics*, 14(2), e1007235. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007235>
- Rosa, M., Abraham-Juárez, M. J., Lewis, M. W., Fonseca, J. P., Tian, W., Ramirez, V., Luan, S., Pauly, M., & Hake, S. (2017). The Maize MID-COMPLEMENTING ACTIVITY homolog CELL NUMBER REGULATOR13/NARROW ODD DWARF coordinates organ growth and tissue patterning. *The Plant Cell*, 29(3), 474–490. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00878>
- Sauer, M., & Friml, J. (2010). Immunolocalization of Proteins in Plants. In: Hennig L., Köhler C. (eds) *Plant Developmental Biology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 655. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-765-5_17
- Schäfer, F., Seip, N., Maertens, B., Block, H., & Kubicek, J. (2015). Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, 559, 127–139. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.005>
- Seo, P. J., Lee, A. K., Xiang, F., & Park, C. M. (2008). Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt

- response of seed germination. *Plant & Cell Physiology*, 49(3), 334–344. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn011>
- Signore, M., & Reeder, K. A. (2012). Antibody validation by Western blotting. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 823, 139–155. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-216-2_10
- Sood, S., Flint-Garcia, S., Willcox, M. C., & Holland, J. B. (2014). Mining natural variation for maize improvement: selection on phenotypes and genes. In *Genomics of Plant Genetic Resources* (pp. 615-649). Springer, Dordrecht.
- Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, 559, 1–15. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>
- Stelpflug, S. C., Sekhon, R. S., Vaillancourt, B., Hirsch, C. N., Buell, C. R., de Leon, N., & Kaeppler, S. M. (2016). An Expanded Maize Gene Expression Atlas based on RNA Sequencing and its Use to Explore Root Development. *The Plant Genome*, 9(1), 10.3835/plantgenome2015.04.0025. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025>
- van Wersch, R., Li, X., & Zhang, Y. (2016). Mighty dwarfs: *Arabidopsis* autoimmune mutants and their usages in genetic dissection of plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01717>
- Vinckier, N. K., Chworos, A., & Parsons, S. M. (2011). Improved isolation of proteins tagged with glutathione S-transferase. *Protein Expression and Purification*, 75(2), 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.09.006>
- Voges, M. J., Silver, P. A., Way, J. C., & Mattozzi, M. D. (2013). Targeting a heterologous protein to multiple plant organelles via rationally designed 5' mRNA tags. *Journal of Biological Engineering*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-20>
- Woldringh C. L. (1994). Significance of plasmolysis spaces as markers for periseptal annuli and adhesion sites. *Molecular Microbiology*, 14(4), 597–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01299.x>
- Woodhouse MR, Cannon EK, Portwood JL, Harper LC, Gardiner JM, Schaeffer ML, Andorf CM. (2021) *Un enfoque pangenómico de las bases de datos del genoma utilizando el maíz como sistema modelo*. *BMC Plant Biol* 21, 385. doi: <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03173-5> .
- Wootla, B., Denic, A., & Rodriguez, M. (2014). Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1060, 79–110. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6_5
- Wu, G., Liu, S., Zhao, Y., Wang, W., Kong, Z., & Tang, D. (2015). Enhanced disease resistance 4 associates with clathrin heavy chain 2 and modulates plant immunity by regulating relocation of edr1 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(3), 857–873. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134668>

- Yang, D. L., Shi, Z., Bao, Y., Yan, J., Yang, Z., Yu, H., Li, Y., Gou, M., Wang, S., Zou, B., Xu, D., Ma, Z., Kim, J., & Hua, J. (2017). Calcium Pumps and Interacting BON1 Protein Modulate Calcium Signature, Stomatal Closure, and Plant Immunity. *Plant Physiology*, 175(1), 424–437. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00495>
- Yuan, P., Tanaka, K., Du, L., & Poovaiah, B. W. (2018). Calcium signaling in plant autoimmunity: A guard model for AtSR1/CAMTA3-mediated immune response. *Molecular Plant*, 11(5), 637–639. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.014>
- Zhang, M., Chiang, Y. H., Toruño, T. Y., Lee, D., Ma, M., Liang, X., Lal, N. K., Lemos, M., Lu, Y. J., Ma, S., Liu, J., Day, B., Dinesh-Kumar, S. P., Dehesh, K., Dou, D., Zhou, J. M., & Coaker, G. (2018). The MAP4 Kinase SIK1 ensures robust extracellular ROS burst and antibacterial immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, 24(3), 379–391.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.007>