



Departamento de Biotecnología

---

**“Disección genética del mecanismo de resistencia frente  
a patógenos biotrofos mediado por el gen *CSB3* en  
*Arabidopsis thaliana*”**

María José Gil Morrió  
TESIS DOCTORAL

Director:  
Dr. Pablo Vera Vera

Valencia, 2005





**Dr. D. Pablo Vera Vera**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Politécnica de Valencia

**CERTIFICA:**

Que la presente memoria titulada “Disección genética del mecanismo de resistencia frente a patógenos biotrofos mediado por el gen *CSB3* en *Arabidopsis thaliana*” ha sido realizada por M<sup>a</sup> José Gil Morrió bajo mi dirección, y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctora Ingeniera Agrónoma.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a dieciséis de junio de dos mil cinco

Fdo. Pablo Vera Vera



## Agradecimientos

Esta aventura con *csb3* empezó hace ya cuatro años y parece ayer. Estoy sorprendida de lo rápido que ha pasado el tiempo y eso quiere decir que he disfrutado de esta experiencia.

Quiero agradecer a todos los que han contribuido durante estos cuatro años a hacer posible este trabajo de investigación:

En primer lugar a mi director de tesis, Pablo Vera por darme la oportunidad de hacer “ciencia”, por la confianza y el apoyo prestado.

No puedo olvidarme de Lucía Jordá y Lucía Pérez ambas han formado al igual que yo parte de este proyecto. Lucía Jordá cuyo trabajo de tesis doctoral continúe y que ha sido un ejemplo para desarrollar la presente memoria de tesis. Lucía Pérez contribuyó de forma inestimable con los supresores de *csb3* como parte de su Trabajo de Investigación Final de Carrera.

A Brigitte Mauch Mani por todos los resultados obtenidos con hongos fitopatógenos y a Jeff Dangl y Pablo Tornero por la asistencia técnica con *P. syringae*.

Merece una mención muy especial Alberto con quien he compartido la aventura de *csb3* y *ocp3*. Gracias por tu infinita generosidad.

Y una dedicación muy especial a todos mis compañeros, muchas gracias por el ánimo y la ayuda prestada. Por hacer el día a día más fácil.

*A los de ayer*, Concha con quien aprendí el entusiasmo, Gema por su experiencia, M<sup>a</sup> Carmen por sus consejos en el nada fácil camino del clonaje posicional, Dolores que tanto me ayudó con las plantitas, Isabel y Elsa.

*A los de ayer y hoy*, José Luis todo un ejemplo de vocación y dedicación, Astrid con quien he compartido inquietudes, RNAs y consejos técnicos, Susi y Puri por su apoyo.

*A los de hoy*, Vicente por estar ahí, M<sup>a</sup> José, Albor, Emilio y Brande.



*A la vida no se le puede pedir más,  
mis padres José y Amparo, mi hermana Amparo  
y Antonio.*





## Abreviaturas.

<i>acd</i>	<i>accelerated cell death</i>
<i>agd</i>	<i>aberrant growth and death</i>
<i>ale</i>	<i>abnormal leaf shape</i>
<b>BAC</b>	Bacterial Artificial Chromosome
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Research Tool
<b>BTH</b>	ácido-1, 2, 3-benzotiazol-7-carbótico
<b>CAP</b>	Codominant Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
<b>CC</b>	coiled coil
<i>CDRI</i>	<i>constitutive disease resistance1</i>
<i>cev</i>	<i>constitutive expressor of VSP</i>
<i>clb</i>	<i>chloroplast biogenesis</i>
<i>cpr</i>	<i>constitutive expressor of PR genes</i>
<i>csb</i>	<i>constitutive subtilisin</i>
<i>dir</i>	<i>defective in induced resistance</i>
<b>DMAPP</b>	dimetilalil difosfato
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<i>dnd</i>	<i>defense no death</i>
<b>DO</b>	densidad óptica
<i>dth</i>	<i>detachment</i>
<i>edr</i>	<i>enhanced disease resistance</i>
<i>eds</i>	<i>enhanced disease susceptibility</i>
<b>eIF</b>	eukaryotic initiation factor
<b>eLRR</b>	extracellular leucine-rich repeat
<b>EMS</b>	metano sulfanato de etilo
<b>EST</b>	expressed sequence tag
<b>ET</b>	etileno
<b>fosm</b>	fosmidomicina

<b>GST</b>	glutation S-transferasa
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidasa
<b>HDS/GcpE</b>	1-hidroxi-2-metil-2-butenil 4-difosfato sintasa
<b>HR</b>	respuesta hipersensible
<i>hrl</i>	<i>hypersensitive response</i>
<b>ICS</b>	isocorismato sintasa
<b>INA</b>	ácido 2, 6-dicloroisonicotínico
<b>IPP</b>	isopentenil difosfato
<b>ISR</b>	resistencia sistémica inducida
<b>JA</b>	ácido jasmónico
<b>Kb</b>	kilobase
<b>KB</b>	King's B
<b>KDa</b>	kilodalton
<b>LB</b>	medio Luria-Bertani
<i>lmm</i>	<i>lesion mimic mutants</i>
<b>LRR</b>	leucine-rich repeat
<i>lsd</i>	<i>lesion simulated disease</i>
<b>LZ</b>	leucine zipper
<b>ME-CPP</b>	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato
<b>MEP</b>	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
<i>mos</i>	<i>modifier of snc1</i>
<i>mpk</i>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MS</b>	medio Murashige y Skoog
<i>nahG</i>	<i>salicylate hydroxylase gene</i>
<b>NB</b>	nucleotide binding
<b>NCBI</b>	National Center of Biotechnology Information
<i>ndr</i>	<i>non-race-specific disease resistance</i>
<b>NO</b>	óxido nítrico
<i>npr1</i>	<i>non expression of PRI</i>

<b>OB</b>	oxidative burst
<b>P69</b>	proteína de 69 kDa
<i>pad</i>	<i>phytoalexin-deficient</i>
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDF1.2</b>	defensina
<b>PEST</b>	Pro-Glu-Ser-Thr
<i>phyB</i>	<i>deficient in the photoreceptor phytochrome B</i>
<i>pmr</i>	<i>powdery mildew resistance</i>
<b>PR</b>	proteína relacionada con la patogénesis
<i>rim</i>	<i>resistant to inhibition with mevinolin</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>RT-PCR</b>	transcripción reversa de RNA seguida de PCR
<b>SA</b>	ácido salicílico
<b>SABP</b>	proteína de unión al SA
<b>SAG</b>	$\beta$ -O-D-glucosalicílico
<b>SAR</b>	resistencia sistémica adquirida
<i>scs</i>	<i>suppressor of csb3-1</i>
<i>sdd</i>	<i>stomal density and distribution</i>
<i>sfd</i>	<i>suppressor of fatty acid desaturase deficiency</i>
<i>sid</i>	<i>SA induction deficient</i>
<b>SIR</b>	resistencia independiente de SAR
<i>snc</i>	<i>suppressor of npr1-1, constitutive</i>
<i>sni</i>	<i>suppressor of npr1-1, inducible</i>
<i>son</i>	<i>suppressor of nim1-1</i>
<i>ssi</i>	<i>suppressor of SA insensitivity</i>
<b>SSLP</b>	Single Sequence Length Polymorphism
<b>TAIR</b>	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
<b>THI2.1</b>	tionina

<b>TIR</b>	toll/interleukin-1 receptor
<b>ufc</b>	unidades formadoras de colonias
<b><i>vad</i></b>	<i>vascular associated death</i>
<b>X-gluc</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido

## Índice.

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>I.1. La interacción planta-patógeno</b>	<b>3</b>
I.1.1. Señalización dependiente de los genes <i>R</i>	3
I.1.2. Respuestas defensivas locales	6
I.1.3. Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)	8
<b>I.2. Ruta de señalización defensiva mediada por ácido salicílico</b>	<b>14</b>
I.2.1. Biosíntesis del ácido salicílico	14
I.2.2. Genes implicados en la ruta de señalización del ácido salicílico	18
<i>I.2.2.1. Mutaciones en genes que afectan a la susceptibilidad frente a patógenos biotrofos</i>	18
<i>I.2.2.2. Mutaciones en genes que confieren mayor resistencia frente a patógenos biotrofos</i>	20
<b>I.3. <i>P69C</i>; un gen marcador de la respuesta defensiva en <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>24</b>
<b>II. Objetivos</b>	<b>27</b>

## Índice

<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos .....</b>	<b>29</b>
<b>III.2. Detección de la actividad <math>\beta</math>-glucuronidasa .....</b>	<b>30</b>
<b>III.3. Mutagénesis de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> e identificación de los mutantes <i>csb</i> y <i>sca</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>III.4. Inoculación de las plantas .....</b>	<b>31</b>
III.4.1. Inoculación de las plantas con la bacteria fitopatógena <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 ( <i>Pst.</i> DC3000) .....	31
III.4.2. Inoculación de las plantas con hongos fitopatógenos .....	32
<b>III.5. Detección de muerte celular.....</b>	<b>33</b>
<b>III.6. Determinación de SA .....</b>	<b>33</b>
<b>III.7. Análisis genéticos .....</b>	<b>33</b>
<b>III.8. Generación de dobles mutantes .....</b>	<b>34</b>
<b>III.9. Clonación de <i>CSB3</i> por cartografiado genético .....</b>	<b>35</b>
<b>III.10. Complementación de la mutación <i>csb3-1</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>III.11. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos .....</b>	<b>36</b>
III.11.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	36
III.11.2. Purificación de plásmidos bacterianos .....	36

III.11.3. Aislamiento y manipulación de DNA de plantas .....	36
III.11.4. Aislamiento y manipulación de RNA de plantas .....	37
III.11.5. Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA, hibridación y autorradiografía .....	37
III.11.6. Reacciones de amplificación (PCR, RT-PCR) .....	37
<b>III.12. Chips de DNA .....</b>	<b>38</b>
<b>III.13. Aplicaciones bioinformáticas .....</b>	<b>39</b>
<b>IV. Resultados y Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>IV.1. Aislamiento y caracterización de mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> alterados en la regulación transcripcional de <i>P69C-GUS</i> .....</b>	<b>44</b>
IV.1.1. Caracterización morfológica de los mutantes <i>csb</i> .....	46
IV.1.2. Efecto de las mutaciones <i>csb</i> sobre la expresión del transgén <i>P69C-GUS</i> .....	46
IV.1.3. Los mutantes <i>csb2</i> y <i>csb3</i> muestran micro-lesiones .....	47
IV.1.4. Análisis genético de los mutantes <i>csb</i> .....	49
IV.1.5. Resistencia de las plantas <i>csb</i> a <i>Pst.</i> DC3000 .....	50
<b>IV.2. El mutante <i>csb3</i> está específicamente alterado en la resistencia a patógenos biotrofos .....</b>	<b>53</b>
IV.2.1. Las plantas <i>csb3</i> muestran mayor resistencia frente a patógenos biotrofos pero no frente a patógenos necrotrofos .....	55
IV.2.1.1. Estudio de la interacción del mutante <i>csb3</i> con <i>Hyaloperonospora</i> parasitica .....	55

## Índice

IV.2.1.2. Estudio de la interacción del mutante <i>csb3</i> con <i>Plectosphaerella cucumerina</i> y <i>Botrytis cinerea</i> .....	56
IV.2.2. Cuantificación de los niveles de SA en el mutante <i>csb3</i> .....	58
IV.2.3. Interacción del mutante <i>csb3</i> con mutantes descritos para la ruta de señalización dependiente del SA .....	59
IV.2.3.1. Generación de dobles mutantes .....	59
IV.2.3.2. Caracterización de la expresión de genes de defensa y la resistencia a <i>Pst. DC3000</i> en los dobles mutantes .....	63
IV.2.4. Análisis global de los cambios transcripcionales que ocurren en el mutante <i>csb3</i> .....	65
IV.2.5. Cartografiado y clonaje posicional del gen <i>CSB3</i> .....	72
IV.2.6. Complementación genética de la mutación <i>csb3-1</i> .....	77
IV.2.7. Complementación farmacológica de la mutación <i>csb3-1</i> .....	79
IV.2.8. Expresión del gen <i>CSB3</i> en la interacción con <i>Pst. DC3000</i> .....	82
<b>IV.3. Aislamiento y caracterización de mutantes supresores de la mutación <i>csb3-1</i> .....</b>	<b>84</b>
IV.3.1. Análisis genético de los mutantes <i>scs</i> .....	86
IV.3.2. Estudio de los mutantes <i>scs</i> resistentes a <i>Pst DC3000</i> .....	88
IV.3.2.1. Clonación del gen <i>SCS8</i> .....	90
IV.3.3. Estudio de los mutantes <i>scs</i> susceptibles a <i>Pst DC3000</i> .....	93
IV.3.3.1. Efecto de la presencia de la mutación <i>csb3-1</i> en el fenotipo de susceptibilidad de las plantas <i>scs2</i> .....	95
IV.3.4. Estudio de los mutantes <i>scs</i> hipersusceptibles a <i>Pst DC3000</i> ...	96
IV.3.4.1. Efecto de la presencia de la mutación <i>csb3-1</i> en el fenotipo de hipersusceptibilidad de las plantas <i>scs9</i> .....	98
IV.3.4.2. Expresión de genes marcadores de la ruta de señalización del SA en los mutantes <i>scs4</i> y <i>scs9</i> .....	100



IV.3.4.2. Inducción de resistencia a Pst. DC3000 por aplicación de SA en los mutantes *scs9* y *scs4* .....101

**IV.4. Identificación de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* de *Arabidopsis thaliana* con homología a proteasas de tipo subtilisina involucradas en la resistencia frente a patógenos biotrofos .....104**

IV.4.1. Patrón de expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en un contexto patogénico ...  
..... 105

IV.4.2. Análisis de expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en mutantes de señalización descritos para la ruta del SA y en los supresores de *csb3-1*.....108

IV.4.3. Caracterización de la respuesta patogénica en el mutante *sbt3.3* obtenido por inserción de T-DNA .....110

IV.4.4. Estudio del efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta frente a patógenos biotrofos .....112

IV.4.5. Estudio del efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta frente a patógenos necrotrofos .....114

**V. Discusión General .....117**

**VI. Conclusiones .....123**

**VII. Bibliografía.....125**



## Índice de figuras y tablas.

### *Introducción:*

<b>Figura 1:</b> Modelo de señalización local y distal de la respuesta frente a patógenos biotrofos dependiente del ácido salicílico. Adaptado de Hammond y Parker, 2003.....	13
<b>Figura 2:</b> Rutas de biosíntesis del ácido salicílico en plantas. Adaptado de Shah, 2003 .....	17
<b>Tabla 1:</b> Relación de mutantes que exhiben mayor resistencia frente a patógenos biotrofos y sus características más sobresalientes .....	23

### *Materiales y Métodos:*

<b>Tabla 1:</b> CAPs y cebadores utilizados para la identificación de las mutaciones <i>pad4-1</i> , <i>sid2-1</i> , <i>eds5-1</i> , <i>nahG</i> , <i>npr1-1</i> y <i>csb3-1</i> .....	35
<b>Tabla 2:</b> Cebadores específicos utilizados para cada uno de los genes objeto de análisis RT-PCR .....	38

### *Resultados:*

<b>Figura 1:</b> Estudio <i>in situ</i> del patrón de expresión del gen marcador <i>GUS</i> bajo el control transcripcional del promotor de <i>P69C</i> en un contexto patogénico de interacción incompatible .....	43
<b>Figura 2:</b> Esquema del escrutinio seguido para el aislamiento e identificación de los mutantes <i>csb</i> ( <i>constitutive subtilisin</i> ) .....	45
<b>Figura 3:</b> Caracterización de los mutantes <i>csb</i> .....	48
<b>Tabla 1:</b> Resumen del análisis genético de los mutantes <i>csb</i> .....	50

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 4:</b> Efecto de las mutaciones <i>csb</i> sobre la resistencia a <i>Pst.</i> DC3000.....	52
<b>Figura 5:</b> Caracterización de las plantas <i>csb3</i> .....	53
<b>Figura 6:</b> Respuesta del mutante <i>csb3</i> frente a distintos patógenos .....	57
<b>Figura 7:</b> Contenido en SA y SAG en plantas wt y <i>csb3</i> .....	59
<b>Figura 8:</b> Aspecto morfológico de los dobles mutantes generados entre los mutantes descritos de la ruta dependiente del SA y el mutante <i>csb3</i> .....	62
<b>Figura 9:</b> Requerimiento de la ruta de señalización del SA en la resistencia de <i>csb3</i> frente a <i>Pst.</i> DC3000 .....	64
<b>Tabla 2:</b> Relación de genes de expresión aumentada en plantas <i>csb3</i> con respecto a las plantas wt .....	70
<b>Tabla 3:</b> Relación de genes de expresión reprimida en plantas <i>csb3</i> con respecto a las plantas wt .....	71
<b>Figura 10:</b> Clonación por posición en mapa del gen <i>CSB3</i> .....	74
<b>Figura 11:</b> Ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) .....	76
<b>Figura 12:</b> Complementación genética de la mutación <i>csb3-1</i> .....	78
<b>Figura 13:</b> Complementación farmacológica de la mutación <i>csb3-1</i> .....	81
<b>Figura 14:</b> Expresión del gen <i>CSB3</i> en un contexto patogénico .....	83
<b>Figura 15:</b> Resumen del abordaje seguido para la identificación de los mutantes supresores de <i>csb3-1</i> .....	85
<b>Tabla 4:</b> Resumen del análisis genético de los mutantes <i>scs</i> .....	87
<b>Figura 16:</b> Panel resumen de los mutantes <i>scs</i> resistentes a <i>Pst.</i> DC3000 .....	89
<b>Figura 17:</b> Clonación del gen <i>SCS8</i> .....	92
<b>Figura 18:</b> Panel resumen de los mutantes <i>scs</i> susceptibles a <i>Pst.</i> DC3000 .....	94
<b>Figura 19:</b> Efecto de la mutación <i>csb3-1</i> en el fenotipo patogénico de las plantas <i>scs2</i> .....	96
<b>Figura 20:</b> Panel resumen de los mutantes <i>scs</i> hipersusceptibles a <i>Pst.</i> DC3000 ... ..	97
<b>Figura 21:</b> Efecto de la mutación <i>csb3-1</i> en el fenotipo patogénico de las plantas <i>scs9</i> .....	99

<b>Figura 22:</b> Análisis de la expresión de los genes <i>PR-1</i> , <i>PR-2</i> y <i>GST6</i> mediante RT-PCR en los supresores <i>scs4</i> y <i>scs9</i> tras inoculación con <i>Pst.</i> DC3000 ( <i>avrRpm1</i> ) .....	101
<b>Figura 23:</b> Efecto del tratamiento con SA en el crecimiento de <i>Pst.</i> DC3000 en plantas <i>scs4</i> y <i>scs9</i> .....	103
<b>Figura 24:</b> Análisis de la expresión de los genes <i>AtSBT3.5</i> y <i>AtSBT3.3</i> mediante RT-PCR en un contexto patogénico .....	107
<b>Figura 25:</b> Análisis de la expresión de los genes <i>AtSBT3.5</i> y <i>AtSBT3.3</i> mediante RT-PCR en <i>nahG</i> , <i>npr1</i> , <i>pad4</i> , <i>dth9</i> y <i>scs9</i> inoculadas con <i>Pst.</i> DC3000 ( <i>avrRpm1</i> ) .....	109
<b>Figura 26:</b> Caracterización molecular y fenotípica de las plantas <i>sbt3.3</i> .....	111
<b>Figura 27:</b> Respuesta de las plantas <i>sbt3.3</i> frente a patógenos biotrofos .....	113
<b>Figura 28:</b> Respuesta de las plantas <i>sbt3.3</i> frente a patógenos necrotrofos .....	115



*Introducción.*





## **I. Introducción.**

En su entorno natural, las plantas coexisten con multitud de microorganismos patógenos. Sin embargo, la enfermedad constituye una excepción y ello se debe a los múltiples mecanismos de defensa que las plantas poseen frente a estos patógenos. Algunos de estos mecanismos son constitutivos, estando establecidos en la planta antes de la llegada del patógeno; mientras que otros se inducen tras la percepción del mismo y proporcionan protección no sólo en el sitio de infección sino sistémicamente a lo largo de toda la planta (Shah *et al.*, 1999). El conjunto de estos mecanismos constituye la base de la inmunidad natural de las plantas a un gran número de patógenos.

Una de las respuestas defensivas inducibles mejor caracterizadas es la respuesta SAR (Resistencia Sistémica Adquirida). Tras el reconocimiento de los determinantes patogénicos por parte de la planta se activa la señalización conducente al establecimiento de la respuesta SAR. En el sitio de la infección inicial se produce una rápida reacción de colapso de las células vegetales en contacto con el patógeno. Esta respuesta recibe el nombre de HR (reacción o respuesta hipersensible). La activación transcripcional de numerosos genes durante la HR es esencial para la detención del desarrollo y progresión del patógeno. La HR está asociada, en la mayoría de casos, al establecimiento de la respuesta SAR. Esta protección se produce en tejidos distales a los puntos de infección inicial y es funcional frente a posibles infecciones secundarias causadas por un amplio espectro de patógenos (Ryals *et al.*, 1996; Delaney, 2000). Esta respuesta se caracteriza por la acumulación de la molécula señal, ácido salicílico (SA) y la expresión de un grupo característico de genes de defensa (Dong, 1998; Glazebrook, 1999; Glazebrook, 2001).

El estudio de los genes que controlan la respuesta defensiva en *Arabidopsis thaliana* ha permitido establecer la existencia de dos rutas de señalización, una dependiente del ácido salicílico (SA) y otra dependiente del ácido jasmónico

## Introducción

(JA) y etileno (ET). La activación de la ruta dependiente del SA actúa confiriendo protección a las plantas frente a patógenos biotrofos, tales como especies del género *Pseudomonas* e *Hyaloperonospora*. Mientras que la señalización regulada por JA/ET está involucrada preferentemente en la defensa frente a patógenos necrotrofos tales como *Botrytis* y *Erwinia* (Vidal *et al.*, 1997). Estas dos rutas no son independientes y forman parte de una red de señalización muy compleja que determina la respuesta defensiva frente a un patógeno específico.

## I.1. La interacción planta-patógeno.

### **I.1.1. Señalización dependiente de los genes *R*.**

Tras el reconocimiento por los productos de los genes *R* de resistencia de la planta de los factores de avirulencia (*Avr*) del patógeno se desencadena la rápida activación de la respuesta defensiva de la planta. Este modelo denominado gen a gen, fue propuesto por Flor (1971) y ha sido confirmado posteriormente en numerosas interacciones planta-patógeno (Innes, 1998). Generalmente, tanto los alelos *R* como los *Avr* son dominantes, y cuando se establece reconocimiento la planta es resistente y el patógeno avirulento. Ello conduce a una interacción denominada incompatible. Con cualquier otra combinación génica la interacción es compatible, la planta es susceptible y el patógeno virulento. Por tanto, la combinación génica determina el tipo de interacción planta-patógeno. En una interacción compatible, el patógeno inicia la infección en la que puede multiplicarse y progresar sistémicamente invadiendo otros tejidos desencadenando la enfermedad. La interacción incompatible se caracteriza por el establecimiento de una infección patogénica inicial que no logra progresar debido a que la planta reacciona restringiendo la dispersión del patógeno (Keen, 1990; van Kan *et al.*, 1992).

En los últimos años, se ha abordado la clonación de numerosos genes de avirulencia a partir de diversos patógenos, así como genes de resistencia procedentes de diversas especies vegetales. La clonación de los genes *R* revela la existencia de un número limitado de motivos estructurales (Hammond-Kosack y Parker, 2003). Estos motivos incluyen dominios posiblemente implicados en el reconocimiento o en la interacción con los factores de avirulencia y dominios de señalización. Este limitado repertorio de motivos sugiere que tanto el reconocimiento específico del patógeno por las proteínas *R* como los procesos subsiguientes están mecanísticamente conservados. El grupo

## Introducción

de genes *R* más numeroso está representado por genes que codifican proteínas con dominios NB-LRR (nucleotide binding-leucine rich repeat) y extremos aminos-terminales variables. Las proteínas NB-LRR tienen dominios estructurales comunes con proteínas animales implicadas en inmunidad innata (Moffett *et al.*, 2002). El dominio LRR muy posiblemente está involucrado en interacciones entre proteínas. El dominio NB estaría más directamente relacionado con señalización. Los genes *R* del tipo NB-LRR a su vez se dividen en dos grupos según la presencia de dominios adicionales en el extremo amino-terminal. El primer grupo presenta un dominio TIR (toll/interleukin-1 receptor) que tiene homología con dominios presentes en *Drosophila* y mamíferos, respectivamente. El segundo grupo de proteína NB-LRR presenta un dominio CC (coiled coil). Menos comunes son los genes *R* de tipo quinasa, tipo *Cf-x* y tipo *Xa-21*. Recientemente se han descubierto nuevos genes tipo *R* que incrementan el repertorio de motivos estructurales. Por ejemplo, el gen tipo NB-LRR *Rrs1* de *Arabidopsis* que presenta un dominio adicional en la zona carboxilo-terminal de la clase WRKY que confiere resistencia contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2002). Las proteínas WRKY son factores transcripcionales específicos de plantas que se unen a elementos W (TTGACCC/T) presentes en multitud de promotores inducibles por patógeno (Eulgem *et al.*, 2000). En tomate, los genes *Ve* confieren resistencia a *Verticilium albo-altrum*. En *Ve2* además de un dominio LRR extracelular (eLRR) existe un dominio adicional con similitud de secuencia a PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) en el extremo carboxilo-terminal que en animales está relacionado con la degradación de proteínas (Kawchuck *et al.*, 2001).

El modelo de reconocimiento más aceptado es el basado en la hipótesis gen a gen (1971) que propone una interacción directa entre el factor de avirulencia del patógeno y el producto del gen de resistencia de acuerdo a un modelo similar al de receptor-ligando. En virtud de este modelo los genes *R* codificarían los receptores con capacidad de reconocer los ligandos específicos codificados

por los correspondientes genes *Avr*. Debido a que la interacción directa entre proteínas R y *Avr* sólo ha sido demostrada para un par de interacciones (Jia *et al.*, 2000; Deslandes *et al.*, 2003), actualmente la hipótesis del guardián-centinela está adquiriendo mayor relevancia (Mackey *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Axtell *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2003). Esta hipótesis contempla distintas posibilidades de cómo los productos de los genes *R* detectan los factores de avirulencia del patógeno (Belkhadir *et al.*, 2004). Un ejemplo lo constituye la interacción indirecta entre el gen de avirulencia *AvrPphB* de *Pseudomonas syringae* y el gen *R* de *Arabidopsis* *RPS5*. *AvrPphB* es una cisteín proteasa cuya diana es muy probablemente la proteína quinasa PBS1 y no *RPS5*. Sin embargo, esta unión entre *AvrPphB* y PBS1 es necesaria para la resistencia mediada por *RPS5*. Además, la unión de PBS1 con *AvrPphB* debe mediar la degradación de *RPS5* que desencadena la señalización (Shao *et al.*, 2003).

La identificación de mutantes alterados en la resistencia mediada por genes *R* ha permitido la identificación de una serie de genes necesarios para la respuesta defensiva mediada por dichos genes *R*. Entre estos genes cabe destacar, *RARI* (necesario para la función del gen *R Mla-12* de cebada que confiere resistencia frente a *Erysiphe graminis f sp hordei*) y *SGT1* (*supressor of G2 allele of SKP1*). Ambos genes son reguladores de la resistencia mediada por genes *R* en *Arabidopsis*, tabaco y cebada (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Muskett *et al.*, 2002; Tor *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* los genes *EDS1* y *NDR1* son indispensables para la función de dos tipos de genes *R* (Aarts *et al.*, 1998). El mutante *eds1* (*enhanced disease susceptibility1*) suprime la resistencia de genes *R* de la clase TIR-NB-LRR (Falk *et al.*, 1999) mientras los mutantes *ndr1* (*non-race-specific disease resistance1*) suprimen la resistencia mediada por los genes *R* del tipo CC-NB-LRR (Century *et al.*, 1997) (Ver Figura 1).

### **I.1.2. Respuestas defensivas locales.**

Tras el reconocimiento entre los productos de los genes *R* y *Avr*, la planta despliega a nivel local, en el sitio de infección, una batería de defensas patogénicas. Estas respuestas defensivas locales comprenden la activación de un proceso de muerte celular desarrollado por las células en contacto con el patógeno (HR), el reforzamiento de la pared celular, la producción de metabolitos antimicrobianos y la expresión de genes de defensa. La efectividad de estas respuestas radica en la rapidez e intensidad con que se establecen.

La HR se caracteriza por una rápida reacción de colapso de las células vegetales en el punto de entrada del patógeno y acontece entre las 6 y 24 horas tras la infección. La HR está programada genéticamente y sometida a numerosos mecanismos de control, tanto para activar su iniciación como para limitar su progresión (Lorrain *et al.*, 2003; Mayda *et al.*, 1999). La HR está asociada en la mayoría de los casos al establecimiento posterior de SAR (Ver Apartado I.2.3). Una de las alteraciones metabólicas más significativas que ocurren durante el establecimiento de la HR es la variación del flujo iónico y la explosión oxidativa. La modificación del flujo de iones conduce a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  al exterior celular. A su vez esta alteración en el flujo de iones está asociada a procesos de fosforilación y desfosforilación mediados por proteína quinasas y fosfatasas (Scheel *et al.*, 1998). La explosión oxidativa se inicia con la activación del complejo NADPH oxidasa que genera la aparición transitoria de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Xiang *et al.*, 1997). La explosión oxidativa acontece en dos fases dependiendo del tipo de interacción patogénica. De este modo, se produce una primera acumulación de ROS de menor magnitud, que ocurre a los pocos minutos, y de manera independiente al tipo de interacción ya sea ésta compatible o incompatible. Esta primera acumulación de ROS transitoria no afecta a la viabilidad celular. Una

segunda explosión oxidativa de mayor magnitud acontece sólo en las interacciones incompatibles tras 2-4 horas de la infección patogénica. Esta explosión oxidativa es crítica para el establecimiento de la resistencia y la activación de una HR. El óxido nítrico (NO) también participa en la activación del proceso de muerte celular asociado a la HR (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Zeier *et al.*, 2004). La activación del proceso de muerte celular está bajo el control de un ciclo de retroalimentación positiva en el cual ROS, NO y SA participarían de forma coordinada para la amplificación y propagación de la señal inicial (McDowell y Dangl, 2000).

El reforzamiento de la pared celular también es consecuencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la explosión oxidativa. Dicha modificación de la pared está controlada por la acción de peroxidasas extracelulares que median en el entrecruzamiento de los diferentes componentes estructurales de la pared. Este fortalecimiento de la pared la vuelve más refractaria a la acción de enzimas líticos microbianos y sirve para frenar la entrada del patógeno. Asimismo, la posterior síntesis y secreción de nuevos polímeros favorece la formación de nuevos entrecruzamientos que dan lugar a un refuerzo adicional de la pared celular (Kawano, 2003).

También como respuesta a la infección se produce la síntesis de fitoalexinas que son metabolitos hidrofóbicos antimicrobianos. Dependiendo de la especie vegetal, las plantas sintetizan un grupo específico de fitoalexinas, las cuales provienen del metabolismo secundario y se derivan de la ruta metabólica de fenilpropanoides, terpenoides o poliacetilenos. Existe una correlación entre los niveles de fitoalexinas presentes en distintas especies vegetales y la resistencia a determinados patógenos. Con el fin de identificar qué genes están regulando la producción de fitoalexinas, se abordó la búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* incapaces de acumular fitoalexinas y se identificaron los mutantes *pad* (*phytoalexin deficient mutant*; Glazebrook y Ausubel, 1994). En general estos mutantes resultaron ser hipersusceptibles a la infección por patógenos

## Introducción

virulentos. En concreto, el mutante *pad4* está alterado en la ruta de señalización dependiente del SA. El gen *PAD4* es un elemento clave en dicha ruta de señalización y se ha estudiado ampliamente (ver Apartado I.3.2).

### **I.1.3. Resistencia Sistémica Adquirida (SAR).**

La protección natural de las plantas frente a los microorganismos patógenos es el resultado de la combinación entre la resistencia constitutiva (dada por las barreras preexistentes en la planta) y la resistencia adquirida o inducida tras la percepción del patógeno. La activación de un mecanismo de resistencia a un amplio espectro de patógenos, fue demostrada en los estudios pioneros de Ross (1961). Esta forma de resistencia inducida recibe el nombre de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, Ryals *et al.*, 1996) y constituye una forma de protección a un amplio espectro de patógenos distintos al organismo que indujo SAR. Además, esta resistencia acontece tanto localmente como también en tejidos distales alejados del punto de inoculación inicial. El tiempo necesario para el establecimiento de SAR depende de la planta y del organismo inductor. Una vez establecida SAR, la protección puede durar semanas o meses. Por tanto, la respuesta SAR se caracteriza por conferir una resistencia cuantitativa, inespecífica y duradera (Sticher *et al.*, 1997).

Varios compuestos naturales y sintéticos son inductores de SAR. La adición exógena del SA tanto en hojas de tabaco como en *Arabidopsis* induce la misma resistencia y el mismo conjunto de genes SAR que produciría un patógeno inductor de SAR. Se han identificado dos compuestos sintéticos análogos al SA; uno es el ácido 2, 6-dicloroisonicotínico (INA) (Ward *et al.*, 1991) y el otro compuesto es el S-metil éster del ácido-1, 2, 3-benzotiazol-7-carbotiótico (BTH) (Gorlach *et al.*, 1996). Algunos compuestos sintéticos se utilizan como productos comerciales para la inducción de SAR en condiciones de campo, por



ejemplo el BTH que se aplica en el cultivo de arroz como protección frente al tizón del arroz (Sekizawa y Mase, 1980).

La inducción de resistencia en partes de la planta alejadas y distintas al sitio de la inoculación inicial sugiere la existencia de una señal que se desplazaría sistémicamente dando lugar al establecimiento de SAR (Bi *et al.*, 1995). Inicialmente se propuso que dicha señal sería el ácido salicílico, sin embargo ciertos experimentos han demostrado que no es la señal sistémica, aunque su presencia en tejidos distales es absolutamente necesaria para la respuesta SAR (Vernooij *et al.*, 1994). El mutante *dir1* (*defective in induced resistance1*) se caracteriza por su incapacidad de establecer una respuesta SAR (Maldonado *et al.*, 2002). Dado que *DIR1* codifica una proteína apoplástica de transferencia lipídica que se localiza en el floema, se plantea la posibilidad de que moléculas de naturaleza lipídica podrían ser responsables de la señalización sistémica. Además, la proteína de unión al SA, SABP2 es una lipasa cuya actividad es estimulada por la unión al SA que podría generar una señal de naturaleza lipídica también involucrada en la respuesta SAR (Kumar *et al.*, 2003). Más evidencias son aportadas por el estudio del mutante *sfd1* (*suppressor of fatty acid desaturase deficiency1*). El gen *SFD1* se requiere para la activación sistémica de la respuesta SAR y también está involucrado en el metabolismo de lípidos (Nandi *et al.*, 2004). En definitiva, todos estos datos confirman la importancia de moléculas de naturaleza lipídica en el contexto de la señalización a larga distancia en SAR y en general en la respuesta defensiva (Shah, 2005).

El conjunto mayoritario de proteínas defensivas sintetizadas en las plantas durante la respuesta SAR pertenece a la familia de las PR (proteínas relacionadas con la patogénesis). Las PR fueron descritas por primera vez en la década del 70 en hojas de tabaco infectadas con TMV (van Loon *et al.*, 1970). Las proteínas PR se acumulan abundantemente en el sitio de infección pero también en los tejidos distales no inoculados de las plantas aunque en menor

## Introducción

grado (Stintzi *et al.*, 1993). Por este motivo se denominan proteínas SAR y se utilizan como marcadores moleculares de dicha respuesta. Se ha demostrado la actividad antimicrobiana *in vitro* de algunas proteínas PR (van Loon y van Strien., 1999). La estrategia de generación de plantas transgénicas de sobreexpresión de PR para la obtención de resistencia ha sido exitosa sólo en ciertos casos y ha conferido resistencia a un determinado patógeno. Por tanto, muy posiblemente SAR es el resultado de la acción concertada de muchas PR.

La transducción de la señal mediada por el SA para activar la expresión de genes *PR* y la respuesta SAR requiere de la función de NPR1. NPR1 se identificó en varios rastreos de mutantes afectados en SAR (Dong, 2001). Tras la inducción de SAR, NPR1 se transporta al núcleo donde actúa de modulador de la expresión de genes *PR* (Kinkema *et al.*, 2000). Análisis de doble híbrido en levadura indican que NPR1 interactúa con miembros de la familia bZip de factores transcripcionales (TGAs). Algunos de estos TGAs se unen específicamente a elementos *cis* presentes en los promotores de genes de respuesta al SA como *PR-1* (Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Por tanto, se establece un nexo directo entre NPR1 y la activación transcripcional del gen *PR-1*.

La búsqueda de mutantes supresores de *npr1* ha conducido al aislamiento de los mutantes *sni1* (*suppressor of npr1-1, inducible1*; Li *et al.*, 1999), *ssi2* (*suppressor of SA insensitivity1*; Shah *et al.*, 2001), *snc1* (*suppressor of npr1-1, constitutive 1*; Li *et al.*, 2001) y *son1* (*suppressor of nim1-1*; Kim y Delaney, 2002). El mutante *sni1* es capaz de reestablecer la expresión de genes *PR*, SAR y la resistencia a patógenos tras la aplicación de INA en un fondo *npr1*, indicando que *SNI1* funciona como un regulador negativo en el establecimiento de la respuesta SAR (ver Figura 1). El supresor de *npr1*, *snc1* se caracteriza por expresión constitutiva de genes *PR* y resistencia a *Hyaloperonospora parasitica* Noco2 y a *Pseudomonas syringae pv maculicola* (*P.s.m*) ES4326. El gen *SNC1* es muy similar a *RPP4* y *RPP5*, dos genes relacionados con los genes *R* de la

clase TIR-NB-LRR (Zhang *et al.*, 2003). Recientemente se ha publicado el mutante *mos3* (*modifier of snc1,3*) identificado en un escrutinio de mutantes supresores del fenotipo de *snc1* (Zhang *et al.*, 2005). El mutante *ssi2* surge también de la búsqueda de supresores de la expresión constitutiva de genes *PR* en un fondo *npr1*. Este mutante *ssi2* se caracteriza por un fenotipo de morfología aberrante, resistencia a *Hyaloperonospora parasitica* y además presenta lesiones celulares reminiscentes de microHRs en ausencia de estímulo patogénico. Además *ssi2* está afectado en la inducción de algunos genes dependientes del JA. El gen *SSI2* codifica una esteroil-ACP desaturasa. Las plantas *ssi2* acumulan elevados niveles del sustrato de esta enzima (Kachroo *et al.*, 2001). Además la búsqueda de supresores a su vez de *ssi2* ha dado lugar a los mutantes *sfd* (Nandi *et al.*, 2003) comentados anteriormente. Tanto los mutantes *sni1*, *snc1* como *ssi2* ponen de manifiesto la existencia de expresión de genes *PR* independiente de *npr1*. Otros candidatos a reguladores de la expresión de genes *PR* y resistencia de forma independiente a *npr1* son la familia de factores transcripcionales Whirly (Why) (Desveaux *et al.*, 2004). Por último, el mutante *son1* que se distingue del resto de supresores de *npr1* en que muestra SAR en ausencia de inducción de genes *PR* (Kim y Delaney, 2002). Esta respuesta tipo SAR en ausencia de expresión de los genes SAR característicos recibe el nombre de Resistencia Independiente de SAR (SIR; ver Figura 1).

NPR1 es necesario no sólo para la respuesta SAR sino también para la respuesta ISR (Resistencia Sistémica Inducida). El descubrimiento de ISR surge de la utilización de rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Las PGPR se aplican al suelo y se localizan en la rizosfera pero inducen resistencia en hojas y tallo frente a otros patógenos. El modo de acción de NPR1 en ISR se desconoce (Pieterse *et al.*, 1998). Su implicación en ambos fenómenos es interesante ya que revela un papel de NPR1 en la percepción de más de una señal (SA y señal de ISR) y en

## Introducción

la respuesta (activación de PRs y activación de ISR). Además, la inducción simultánea de la respuesta SAR e ISR posee un efecto aditivo en el nivel de inducción de resistencia frente a *P. syringae* (van Wees *et al.*, 2000). Por tanto, NPR1 es capaz de funcionar en ambas respuestas simultáneamente.

Las plantas portadoras de la mutación *dth9* (*detachment9*) expresan genes *PR* en respuesta al SA y sin embargo, no muestran resistencia. Esto demuestra que el gen *DTH9* es necesario para SAR pero no para la expresión de los genes característicos SAR (Mayda *et al.*, 2000). El mutante *dth9* constituye una herramienta valiosa para identificar nuevos factores implicados en la activación de SAR mediante la búsqueda de supresores de dicha mutación.

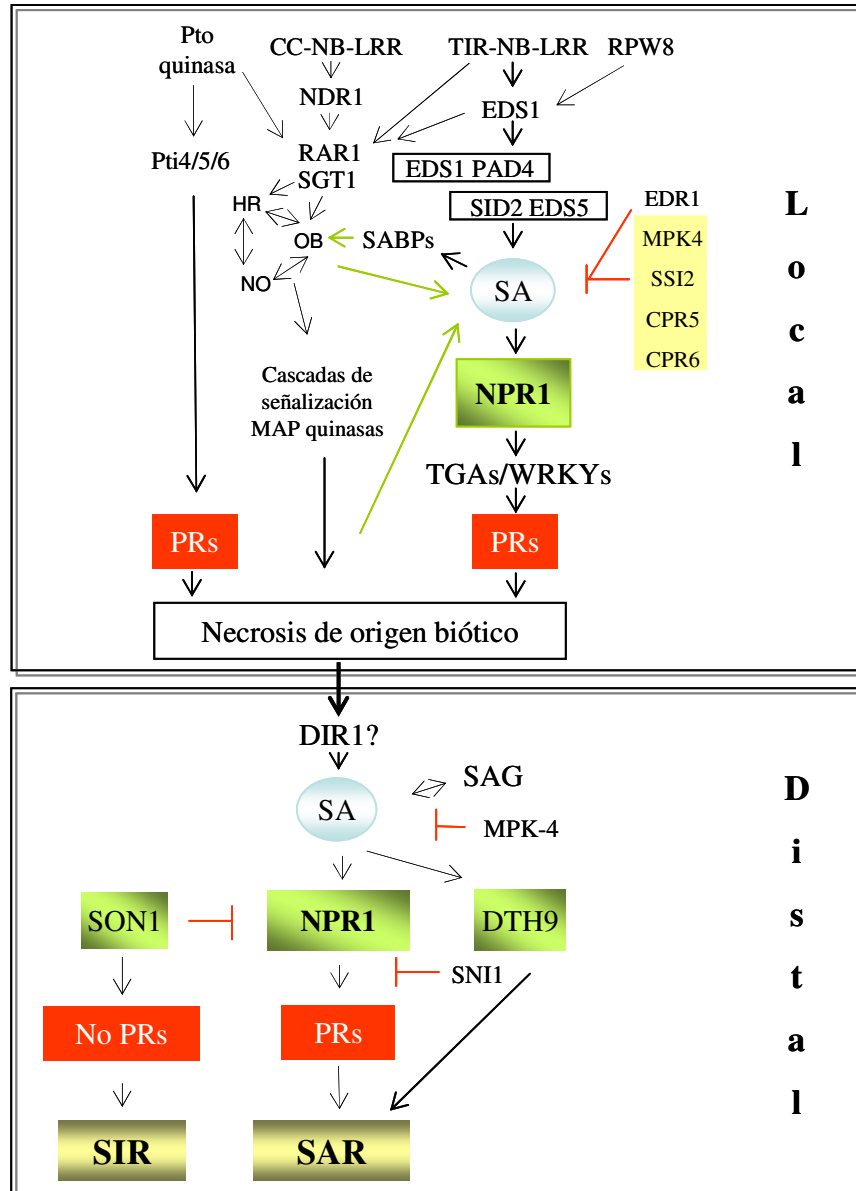


Figura 1: Modelo de señalización local y distal de la respuesta frente a patógenos biotrofos dependiente del ácido salicílico. Adaptado de Hammond y Parker, 2003

## Introducción

### I.2. Ruta de señalización defensiva mediada por ácido salicílico.

El ácido salicílico tiene un papel central como molécula señalizadora en la respuesta defensiva de la planta. Aumentos en los niveles endógenos del SA, así como de su conjugado glucosilado SAG ( $\beta$ -O-D-glucosalicílico) tras la infección patogénica coinciden con una elevada expresión de genes *PR* y la subsiguiente activación de resistencia. Tanto la inhibición de la acumulación del SA (plantas *nahG*; Chong *et al.*, 2001; Summermatter *et al.*, 1995) como de su síntesis (plantas *sid2* y *eds5*; Nawrath y Métraux, 1999; Dewdney *et al.*, 2000), bloquea la activación de las respuestas defensivas dependientes del SA. Por el contrario, la aplicación exógena tanto del SA como de su análogo funcional sintético BTH provoca la expresión de genes *PR* y confiere resistencia frente a patógenos.

#### **I.2.1. Biosíntesis del ácido salicílico.**

En plantas superiores estaba bien establecido que el ácido salicílico era sintetizado a través de la ruta de los fenilpropanoides (Sticher *et al.*, 1997). Los mutantes *sid1* y *sid2* (*salicylic acid induction deficient*) fueron aislados por su incapacidad de acumular SA tras la inducción de SAR (Nawrath y Métraux, 1999). Alelos de *sid1* y *sid2*, *eds5* y *eds16* (*enhanced disease susceptibility*) respectivamente, fueron identificados de manera independiente por su fenotipo de hipersusceptibilidad a patógenos biotrofos (Dewdney *et al.*, 2000; Glazebrook *et al.*, 1996). El mutante *sid2* y su alélico *eds16* (*enhanced disease susceptibility16*) muestran hipersusceptibilidad frente a patógenos e incapacidad para sintetizar SA y establecer la respuesta SAR (Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath y Métraux, 1999). *SID2* codifica una isocorismato sintasa (ICS1) que

cataliza la síntesis de isocorismato a partir del corismato. El isocorismato es transformado a ácido salicílico por la acción de la enzima isocorismato piruvato liasa (ver Figura 2). Dos evidencias experimentales apoyan que el mayor proveedor del SA en la respuesta SAR es la ruta biosintética del isocorismato en detrimento de la ruta biosintética de los fenilpropanoides. Por un lado, tras la infección patogénica, los mutantes *sid2* y *eds16* reducen la acumulación del SA a un 5-10% con respecto a las plantas silvestres, impidiéndose la respuesta local y el establecimiento de SAR. Por otro lado, la expresión de *ICS1* se induce tras la infección patogénica en tejidos locales y distales. La fuerte homología existente entre *ICS* de *Arabidopsis*, *Catharanthus* y los ESTs anotados de tomate y soja apuntan a que probablemente las plantas superiores sintetizan SA a partir de isocorismato, es decir, por una vía hasta el momento típicamente bacteriana.

La ruta biosintética del SA a partir del isocorismato acontece en el cloroplasto. La localización cloroplástica de *ICS1* y de la síntesis del SA plantea el problema del transporte de dicha molécula desde el cloroplasto al citoplasma donde ejerce su función. El gen *EDS5/SID1* codifica una proteína de membrana (Nawrath *et al.*, 2002). *EDS5/SID1* muestra identidad con proteínas de extrusión de multidroga y toxinas (MATE) que recientemente se han descrito en *Arabidopsis* (Debeaujon *et al.*, 2001; Diener *et al.*, 2001). *EDS5/SID1* también se localiza en el cloroplasto, aunque todavía se desconoce la naturaleza de los compuestos transportados por *EDS5*, se ha sugerido la posible implicación de *EDS5* en el transporte del SA.

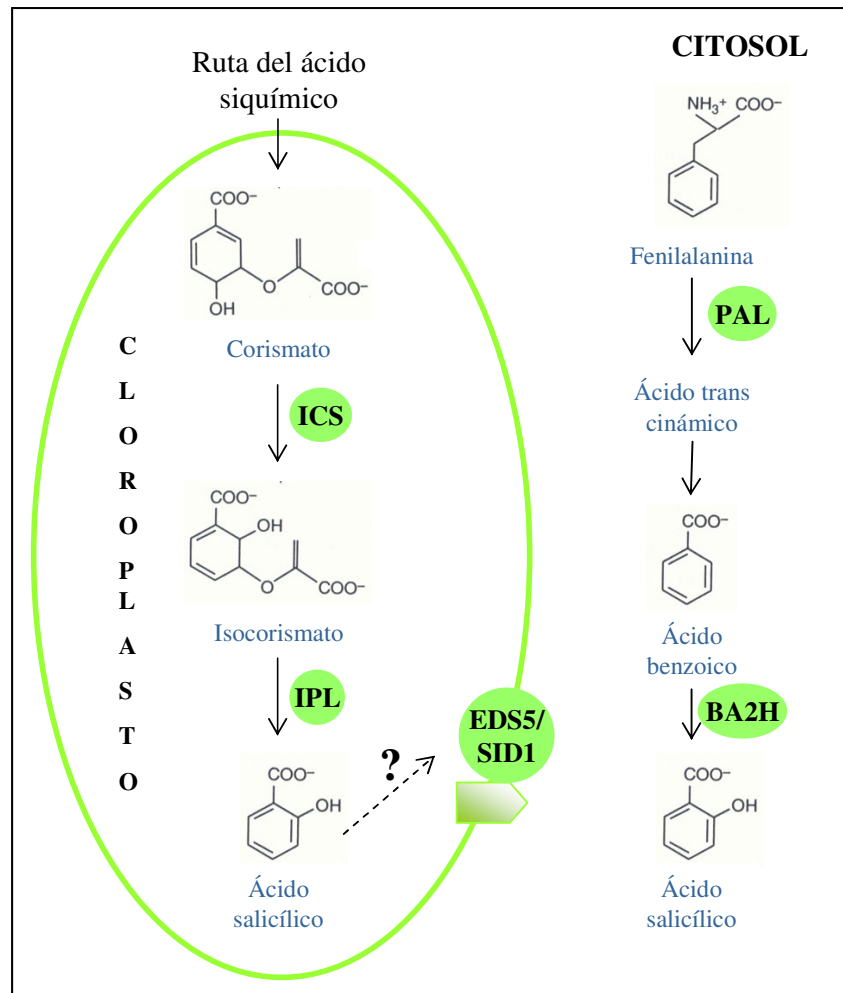
La importancia del cloroplasto en la interacción planta-patógeno no sólo radica en la ubicación de la síntesis del SA sino también de la acción del SA. Mutaciones en varios genes que codifican proteínas de localización cloroplástica alteran la síntesis o la señalización defensiva: *sid2* (Wildermuth *et al.*, 2001), *eds5* (Nawrath *et al.*, 2002), *ssi2* (Kachroo *et al.*, 2001), *sfd* (Nandi *et al.*, 2003), *acd2* (Ishikawa *et al.*, 2001), *agd2* (Song *et al.*, 2004). Además, la

## Introducción

proteína de unión al SA, SABP3 es de localización cloroplástica y está involucrada en el desarrollo de la respuesta hipersensible (Slaymaker *et al.*, 2002). En la HR también participa  $\alpha$ -dioxigenasas (Ponce de León *et al.*, 2002). Todas estas evidencias experimentales apuntan al papel central que la función/integridad de los cloroplastos posee en la interacción planta-patógeno.

Por último, mencionar la existencia de diversos puntos de retroalimentación positiva y negativa en la ruta de señalización dependiente del ácido salicílico. Como ejemplo, la resistencia mediada por genes *R* induce la síntesis del SA y el resto de respuestas defensivas y a su vez el SA activa la expresión de genes *R* de la clase TIR-NB-LRR (Shirano *et al.*, 2002). El SA también activa la expresión del gen *EDS1* que se requiere para la acumulación del SA y para la resistencia mediada por los genes *R* tipo TIR-NB-LRR (Feys *et al.*, 2001). De todo ello se deduce una regulación positiva por SA de los genes *R* y *EDS1*. Además genes reguladores de la acumulación del SA como *EDS5*, *PAD4* y *SID2* son activados por SA (Wildermuth *et al.*, 2001; Verberne *et al.*, 2000; Feys *et al.*, 2001) estableciéndose así múltiples puntos de regulación. También existe retroalimentación negativa entre la regulación de la acumulación del SA y NPR1. La acumulación del SA es superior en plantas *npr1* inoculadas que en plantas silvestres también inoculadas (Shah *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2000). Se desconocen las bases de este mecanismo de retroalimentación positiva y negativa así como su importancia biológica (Shah, 2003). Este sistema podría ser una forma de modular la respuesta defensiva integrando señales del entorno así como aquellas que se derivaran de pautas de desarrollo y de adaptación medioambiental.





**Figura 2: Rutas de biosíntesis del ácido salicílico en plantas.** La ruta de biosíntesis a partir de la fenilalanina que acontece en el citosol y la ruta del cloroplasto a partir del ácido siquímico. ICS: Isocorismato sintasa; IPL: Isocorismato piruvato liasa; PAL: Fenilalanina amonio liasa; BA2H: Ácido benzoico 2-hidrolasa. Adaptado de Shah (2003)

## **I.2.2. Genes implicados en la ruta de señalización del ácido salicílico.**

El aislamiento de un importante número de plantas mutantes alteradas en la ruta de transducción dependiente del SA ha permitido examinar, en mayor detalle, el papel de esta señal celular en la defensa e identificar parte de los genes cuyos productos de expresión intervienen en esta ruta de señalización. La activación de la ruta de señalización dependiente del SA confiere protección frente a patógenos biotrofos tales como *Pseudomonas syringae* e *Hyaloperonospora parasitica* entre otros (Glazebrook, 2001).

*1.2.2.1. Mutaciones en genes que afectan a la susceptibilidad frente a patógenos biotrofos.*

Los mutantes *eds1* (*enhanced disease susceptibility1*) y *pad4* (*phytoalexin deficient4*) bloquean la síntesis del SA en la interacción planta-patógeno (Feys *et al.*, 2001; Jirage *et al.*, 1999) y en mutantes con activación constitutiva de la ruta dependiente del SA (Jirage *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2001). PAD4 y EDS1 comparten homología con proteínas lipasas (Falk *et al.*, 1999; Jirage *et al.*, 1999). De hecho, ambas proteínas (EDS1 y PAD4) son homólogas entre sí y se postula que podrían interactuar y actuar conjuntamente potenciando la acumulación del SA (Zhou *et al.*, 1998; Feys *et al.*, 2001).

Los mutantes *sid1/eds5* y *sid2/eds16* están directamente involucrados en la síntesis del SA a partir de isocorismato en el cloroplasto (véase apartado I.2.1)

*NPR1*, designado también como *NIM1* o *SAI1* (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1997), es el único gen identificado cuya mutación no va en detrimento de la síntesis y acumulación del SA aunque sí afecta a la activación de los genes inducibles por SA. La sobreexpresión de NPR1 en *Arabidopsis thaliana* confiere resistencia a *Hyaloperonospora parasitica*, *Pseudomonas syringae* y *Erysiphe cichoracearum* y a diferencia de los mutantes con ganancia de resistencia a patógenos biotrofos, estas plantas no

muestran un efecto detrimental en su fenotipo ni tampoco expresión constitutiva de genes *PR* (Cao *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2001). La señalización dependiente del SA puede ser dependiente o independiente de NPR1. El SA afecta a la actividad de NPR1 a dos niveles; primero, activando la expresión y en segundo lugar estimulando la entrada de NPR1 al núcleo donde interacciona con factores de transcripción de la familia bZip (TGAs). La señalización dependiente del SA e independiente de NPR1 ha sido puesta de manifiesto para casos de resistencia gen a gen y en mutantes de defensa cuya resistencia es suprimida por *nahG* pero no por *npr1*. Como ejemplo, la resistencia gen a gen en *Arabidopsis* conferida por los genes *HRT* (*hypersensitive response to turnip crinkle virus*) y *RCY1* (*resistance gene cucumber mosaic virus1*) que se ve suprimida en plantas *nahG* pero no en el mutante *npr1* (Chandra *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2002). Además la existencia de este mecanismo independiente de NPR1 se ve reforzada por la existencia de mutantes que exhiben resistencia a patógenos biotrofos en un fondo *npr1* tal y como es el caso de *ssi2*, pero dicha resistencia es suprimida en un fondo *nahG* y *eds5* (Shah *et al.*, 2001). Las conclusiones que se derivan de las plantas *nahG* han de ser analizadas con cautela, dado que se ha demostrado que el catecol es el responsable de algunos de los efectos de *nahG* en la respuesta defensiva (van Wees and Glazebrook, 2003). Por ello los mutantes *sid2-1* y *eds5* constituyen una herramienta valiosa para verificar resultados y apoyar conclusiones. Otros mutantes en los que opera esta señalización independiente de NPR1 pero dependiente del SA son *cpr1*, *cpr5*, *cpr6* (*constitutive expressor of PR genes*), *ssi2* (*suppressor of salicylic acid-insensitive2*), *hrl1* (*hypersensitive response1*), *agd2* (*aberrant growth death2*) y *vad1* (*vascular associated death1*) (Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2003; Rate *et al.*, 2001 y Lorrain *et al.*, 2004).

## Introducción

### 1.2.2.2. Mutaciones en genes que confieren mayor resistencia frente a patógenos biotrofos.

Muchos mutantes con elevados niveles de SA, expresión de genes de defensa y resistencia muestran un fenotipo de lesiones celulares en ausencia de infección patogénica, son los denominados *lmm* (*lesion mimic mutants*; véase Tabla 1). En general en esta clase de mutantes se plantea el dilema de si afectan de forma directa a la síntesis del SA o es un efecto indirecto de la muerte celular o de la alteración en la homeostasis celular. Así, los mutantes *ssi4* (*suppressor of salicylic acid-insensitive4*) y *snc1* (*suppressor of npr1-1, constitutive1*), mutantes que muestran elevados niveles del SA endógenos y activación constitutiva de las defensas locales, son portadores de mutaciones en genes de resistencia y por tanto impactan en un paso previo a la síntesis del SA (Shirano *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Es de destacar el hecho diferencial existente entre estos dos mutantes. Mientras *ssi4* forma lesiones celulares, *snc1* no las presenta. Ello sugiere que la HR no es necesaria para activar la biosíntesis del SA (Durrant y Dong, 2004). La clonación de algunos de estos mutantes *lmm* ha permitido identificar los genes que participan en la regulación de la respuesta hipersensible. El gen *ACD2* codifica una coproporfirinógeno reductasa implicada en el catabolismo del componente porfirínico de las clorofilas (Mach *et al.*, 2001). Esta enzima disminuye el daño provocado por el patógeno ya que la sobreexpresión de la misma disminuye los síntomas de la enfermedad. Otro ejemplo de regulación negativa lo constituye el mutante *agd2* que también muestra lesiones celulares y todas las características comunes a esta categoría de mutantes (Rate y Greenberg, 2001). *AGD2* codifica una aminotransferasa y posee una función opuesta a su homólogo *ALDI* en la respuesta defensiva (Song *et al.*, 2004). Ejemplos de genes implicados en la regulación positiva de la HR son *CDR1* (*constitutive disease resistance1*) que codifica una aspartil proteasa (Xia *et al.*, 2004) y factores tipo myb como *AtMYB30* (Vailleau *et al.*, 2002).

Dentro de esta categoría de mutaciones que afectan a la resistencia frente a patógenos biotrofos podríamos distinguir aquellos mutantes que no expresan constitutivamente genes *PR*. Constituyen ejemplos de ellos los mutantes *edr1* (*enhanced disease resistance1*; Frye y Innes, 1998), *pmr* (*powdery mildew resistant*; Vogel *et al.*, 2002) y *son1* (*suppressor of nim1-1*; Kim *et al.*, 2002). El gen *EDR1* ha sido clonado y codifica una proteína quinasa del tipo MAPKKK que actúa como regulador negativo en la activación de la ruta de transducción dependiente del SA (Frye *et al.*, 2001). La proteína PMR6 corresponde a una pectato liasa y la mutación *pmr6* produce una alteración en la composición de la pared celular que hace a las plantas más resistentes a la infección sin alterar la ruta de defensa dependiente del SA (Vogel *et al.*, 2002). El mutante *son1* es un supresor del mutante *npr1* que se caracteriza por establecer una respuesta SAR en ausencia de expresión de genes *PR* (Kim y Delaney, 2002). La sobreexpresión del factor TGA5 en *Arabidopsis* confiere resistencia frente a *H. parasitica* independiente de la expresión de *PR-1* (Kim y Delaney, 2002b)

El JA juega un papel clave en la defensa frente a patógenos necrotrofos (i.e. *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina*). Algunos de los mutantes que muestran activación de genes dependientes del SA también exhiben expresión constitutiva de genes inducibles por JA como *cev1*, *cir1*, *cpr5*, *cpr6*, *hrl* y *dnd2* (Ellis y Turner, 2001; Murray *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 1998; Devadas *et al.*, 2002; Jurkowski *et al.*, 2004). El mutante *cev1* (*constitutive expressor of VSP*) produce JA y etileno constitutivamente y muestra una elevada resistencia frente a patógenos necrotrofos, biotrofos e insectos (Ellis *et al.*, 2002). Los mutantes *cpr5* y *cpr6* producen altos niveles de SA y expresan tanto genes marcadores de la ruta del SA como del JA (Kirik *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 1998). En definitiva, estas observaciones sugieren que ambas rutas comparten puntos de señalización común. La sobreexpresión del gen *Pti4* de tomate en *Arabidopsis thaliana*

## Introducción

induce la expresión de *PR-1*, *PR-2* y del gen marcador de la señalización dependiente del JA/ET *PDF1.2*. La aplicación del SA a estas plantas transgénicas suprime la elevada expresión de *PDF1.2* (Gu *et al.*, 2002). Otro ejemplo de la interconexión existente entre las rutas del SA y JA/ET es el mutante *mpk4* (Petersen *et al.*, 2000). El mutante *mpk4* es un mutante incapaz de expresar *PDF1.2* y *THI2.1* tras tratamiento con JA, sin embargo muestra activación constitutiva de la ruta mediada por SA (Petersen *et al.*, 2000). Esto indica que la proteína quinasa MPK4 suprime la biosíntesis del SA y activa la percepción/respuesta necesaria para la expresión de los genes *PDF1.2* y *THI2.1* simultáneamente. Muy probablemente el antagonismo entre SA y JA/ET permite a la planta priorizar de forma efectiva las respuestas defensivas dependientes de una u otra señalización.

Mutante ó transgen	SA	PRs	SAR	LMM	Fenotipo morfológico	Gen	Referencia
<i>acd2</i>				+		Coproporfirinógeno reductasa	Mach <i>et al.</i> , 2001
<i>acd6</i>				+			Dietrich <i>et al.</i> , 1994
<i>agd2</i>	+	+		+	Reducido tamaño	Aminotransferasa	Song <i>et al.</i> , 2004
<i>cevl</i>			+		Reducido tamaño	Celulosa sintetasa	Ellis y Turner, 2001
<i>CDR1</i>	+	+	+	+	Reducido tamaño	Aspartil-proteasa	Xia <i>et al.</i> , 2004
<i>cir1</i>	+	+				Regulador de SA, JA/ET y ROIs	Murray <i>et al.</i> , 2002
<i>cpr1</i>	+	+			Reducido tamaño		Bowling <i>et al.</i> , 1994
<i>cpr5</i>				+		Proteína putativa transmembrana	Kirik <i>et al.</i> , 2001
<i>cpr6</i>	+	+	+		Reducido tamaño	Interconexión de rutas SA y JA/ET	Clarke <i>et al.</i> , 1998
<i>dnd1</i>	+	+			Reducido tamaño	AtCNCG2	Clough <i>et al.</i> , 2000
<i>dnd2</i>	+	+			Reducido tamaño	AtCNCG4	Jurkowski <i>et al.</i> , 2004
<i>edr1</i>						MAPKKK	Frye <i>et al.</i> , 2001
<i>fbr1,fbr2</i>							Stone <i>et al.</i> , 2000
<i>hrl1</i>	+	+		+		Interconexión de rutas SA, JA/ETy ROIs	Devades <i>et al.</i> , 2002
<i>lsd1-7</i>				+			Greenberg <i>et al.</i> , 1994
<i>mpk4</i>			+		Extremadamente pequeño	Proteína quinasa	Petersen <i>et al.</i> , 2000
<i>MYB30</i>						Myb FT/Regulador positivo de HR	Vaillevau <i>et al.</i> , 2002
<i>NPR1/NIM1</i>							Friedrich <i>et al.</i> , 2001
<i>pmr6</i>						Pectato liasa	Vogel <i>et al.</i> , 2002
<i>psi2</i>						Señalización-fitocromo	Genoud <i>et al.</i> , 2002
<i>Pti4</i>		+				ERF	Gu <i>et al.</i> , 2002
<i>rin4</i>						Interactor RPM1, avrRPM1 y AvrB	Mackey <i>et al.</i> , 2002
<i>snc1</i>	+	+			Reducido tamaño	RGA, RPP5	Li <i>et al.</i> , 2001
<i>smi1</i>		+				Regulador negativo SAR	Li <i>et al.</i> , 1999
<i>son1</i>			+			F-box	Kim <i>et al.</i> , 2002
<i>ssi2</i>		+		+	Reducido tamaño	Estearoil-ACP desaturasa	Shah <i>et al.</i> , 1999
<i>ssi4</i>	+			+			Shirano <i>et al.</i> , 2002
<i>TGA5</i>						bZip FT	Kim <i>et al.</i> , 2002b
<i>vad1</i>	+	+		+		Proteína de membrana con dominio GRAM	Lorrain <i>et al.</i> , 2004
<i>WRKY18</i>					Reducido tamaño	Dedo de Zinc FT	Chen y Chen, 2002

**Tabla 1: Relación de mutantes que exhiben mayor resistencia frente a patógenos biotrofos y sus características más sobresalientes.**

## Introducción

### I.3. *P69C*; un gen marcador de la respuesta defensiva en *Arabidopsis thaliana*.

En plantas, la proteólisis juega un papel importante en un amplio número de procesos celulares tales como la diferenciación celular (en el que se ha demostrado la acción concertada de serín y cisteín proteasas en la formación de elementos traqueidales (Zhao *et al.*, 2000), la adaptación a cambios ambientales (Golldack *et al.*, 2003) o las respuestas defensivas. Con respecto a las respuestas defensivas, las cisteín proteasas parecen estar participando en la regulación de la muerte celular programada (Hatsugai *et al.*, 2004; Coffeen y Wolpert, 2004; Chichkova *et al.*, 2004) y recientemente se ha identificado una cisteín proteasa, denominada Rcr3, necesaria para la resistencia específica a *Cladosporium fulvum* en plantas de tomate (Krüger *et al.*, 2002). En lo referente a las serín proteasas, la proteasa P69B de tomate es una diana de un inhibidor de *Phytophthora infestans* (Tian *et al.*, 2004). En *Arabidopsis*, el mutante dominante *CDR1* comparte las características comunes a los mutantes de activación constitutiva de la respuesta SAR como acumulación del SA por encima de los niveles presentes en plantas wt y expresión de los genes marcadores SAR (*PR-1* y *PR-2*). *CDR1* codifica una aspartil proteasa apoplástica (Xia *et al.*, 2004).

Según el mecanismo catalítico las proteasas pueden agruparse de forma general en las siguientes cuatro familias; serín proteasas, cisteín proteasas, aspartil proteasas y metalo proteasas (Beers *et al.*, 2004). Dentro de las serín proteasas uno de los clanes más grandes es la familia de las subtilisinas. Las subtilisinas se caracterizan por una disposición característica de los residuos que comprenden la triada catalítica (Asp, His y Ser) así como la elevada conservación de los aminoácidos que rodean dicha triada.

En *Arabidopsis* la familia de las subtilisinas comprende 56 miembros. De estos 56 miembros, se conoce poco en cuánto a función, patrones de expresión y



lo que hasta hoy es un reto, la búsqueda de sustratos específicos de estas proteasas. La clonación y caracterización de los mutantes *sdd1* (*stomatal density and distribution1*) y *ale1* (*abnormal leaf shape1*) de *Arabidopsis* ha permitido asignar función a los genes *SDD1* y *ALE1* de la familia de las subtilisinas implicados en la densidad y distribución de estomas (Berger y Altmann, 2000; Von Groll *et al.*, 2002; Schluter *et al.*, 2003) y en estadios iniciales de la formación de la epidermis en la interfase endospermo-embrión (Tanaka *et al.*, 2001) respectivamente. Aunque se desconoce la función, si se conoce el patrón de expresión para otros miembros de esta familia. Así, *ARA12* se expresa en todos los órganos y especialmente durante el proceso de formación de silicuas (Ribeiro *et al.*, 1995). También, *AIR3* está involucrado en la emergencia de raíces laterales (Neuteboom *et al.*, 1999), *XSP1* se expresa en elementos traqueidales (Zhao *et al.*, 2000) y *SLP2* y *SLP3* se inducen por estrés abiótico (Gollmack *et al.*, 2003).

En plantas de tomate forman esta familia al menos 16 miembros (Jordá *et al.*, 1999; Jordá y Vera, 2000; Jordá *et al.*, 2000; Meichtry *et al.*, 1999) que se pueden agrupar en 5 subfamilias diferentes. Una de estas subfamilias es la compuesta por las proteínas P69. Este grupo de proteasas, cuyos miembros han sido aislados y caracterizados en nuestro laboratorio (Tornero *et al.*, 1996; Tornero *et al.*, 1997; Jordá *et al.*, 1999; Jordá y Vera, 2000; Jordá *et al.*, 2000), se encuentra representado por distintas isoformas de 69 kDa. La subfamilia a la que se adscriben las P69, al menos consta de dos miembros (P69B y P69C) que han sido relacionadas con mecanismos de defensa y denominadas proteínas PR del grupo 7 (Tornero *et al.*, 1997; Jordá y Vera, 2000; van Loon y van Strien, 1999). Los miembros de la subfamilia P69 son glicoproteínas que se secretan a la matriz extracelular (ECM) donde se acumulan y presumiblemente realizan la función bioquímica reconociendo y procesando sustratos pericelulares (Gil y Vera., 2004). El apoplasto es un entorno rico en proteasas que es colonizado por muchos patógenos entre ellos *Phytophthora infestans* y *Cladosporium*

## Introducción

*fulvum*. Las proteasas apoplásticas pueden ejercer un papel clave en la respuesta defensiva, y de hecho ya se han descrito las proteasas Rcr3 (Krüger *et al.*, 2002), P69B (Tian *et al.*, 2004) y CDR1 (Xia *et al.*, 2004) implicadas en interacciones planta-patógeno.

Con el fin de profundizar en el entendimiento del control transcripcional que modula la expresión de proteasas tipo subtilisina, elegimos el gen *P69C* como candidato a estudiar en detalle. Para ello se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* conteniendo el gen marcador *GUS* bajo el control de la respectiva región promotora del gen *P69C* (Jordá y Vera, 2000). El análisis de las distintas líneas transgénicas nos reveló la ausencia de expresión detectable para el gen *P69C-GUS* en ausencia de estímulo patogénico (ver Figura 3). Por el contrario, el promotor era capaz de dirigir la expresión del gen marcador cuando las plantas transgénicas eran inoculadas con la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst.* DC3000) o con la avirulenta *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). La inducción de la expresión se podía observar en las hojas inoculadas así como en las hojas distales de la misma planta que no habían sido inoculadas. Dicho patrón coincide con el reportado para genes relacionados con la respuesta defensiva (Ward *et al.*, 1991; Lawton *et al.*, 1996). Sin embargo, un análisis exhaustivo de la tinción histoquímica de las plantas transgénicas reveló diferencias en cuanto al modo de expresión del gen *P69C* en relación a otros genes *PR* inducibles por patógenos, muchos de los cuales se expresan intensamente alrededor de la HR. El patrón de expresión derivado del estudio del promotor del gen *P69C* tiene lugar en grupos de células que se encuentran distribuidas a lo largo de la superficie foliar pero no en venas y lejos de la lesión necrótica que se deriva de la respuesta HR producida durante una interacción incompatible. Por tanto, la activación transcripcional observada para el gen *P69C* constituye un ejemplo de un mecanismo de expresión nuevo y preciso de genes *PR*.

*Objetivos.*



## II. Objetivos.

Dada la singularidad del patrón de expresión del gen de defensa *P69C* de tomate en la línea transgénica *P69C-GUS* de *Arabidopsis thaliana* (Jordá y Vera, 2000) nos pareció oportuno emprender la búsqueda de genes involucrados en la activación de dicho gen. La identificación de los mismos permitirá aumentar el número de componentes conocidos de la señalización planta-patógeno.

Con el fin de profundizar en el estudio de la ruta de señalización que media la respuesta defensiva frente a patógenos biotrofos en *Arabidopsis thaliana* se han establecido los siguientes objetivos:

1. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* alterados en la regulación transcripcional de *P69C-GUS*.
2. Caracterización molecular y patógena del mutante *csb3* (*constitutive subtilisin3*). Clonaje posicional del gen *CSB3*.
3. Aislamiento y caracterización de mutantes supresores de la mutación *csb3*.
4. Identificación de dos genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* de *Arabidopsis thaliana* con homología a proteasas de tipo subtilisina involucradas en la resistencia frente a patógenos biotrofos.



*Materiales y Métodos.*





### **III. Materiales y Métodos.**

#### **III.1. Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos.**

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (Ler) utilizadas en el presente trabajo fueron crecidas en cámara de cultivo bajo condiciones de alta intensidad lumínica (22000 lux), con un fotoperiodo de día corto (10 horas luz, 14 horas oscuridad), una humedad relativa del 85% y 19-23°C de temperatura. Las semillas se estratificaron a 4°C durante un mínimo de 48 horas como paso previo a su germinación. Para su crecimiento en suelo se utilizó un sustrato compuesto de turba, perlita y vermiculita en una proporción 2:1:1 y se mantuvieron tapadas con plástico hasta su germinación con el fin de proporcionar la humedad necesaria.

Para experimentos *in vitro*, se utilizó un protocolo de esterilización de semillas que consiste en poner en contacto la cantidad de semillas deseada en 1 ml de etanol al 70% (v/v) y lejía al 30% (v/v) con 0.01% (v/v) de Tween 20 durante 15 minutos. A continuación se procede a realizar al menos cinco lavados sucesivos con agua estéril y se siembra en placas con medio Murashige y Skoog (MS). En el caso de las plantas transgénicas, la germinación de las semillas se realiza en presencia de los antibióticos kanamicina (50 mg/L) o higromicina (40 mg/L) de acuerdo con la resistencia incluida en el plásmido utilizado *P69C-GUS* o *35S-CSB3* respectivamente.

Los distintos tratamientos aplicados se llevaron a cabo rociando las plantas de *Arabidopsis* hasta completa humidificación de las hojas con las siguientes soluciones; i) ácido salicílico (SA) a una concentración de 0,5 mM de SA; ii) fosmidomicina a las concentraciones de 25 y 50 µM; iii) Peróxido de hidrógeno 3 mM. Todas estas soluciones se prepararon con tampón Hepes 10 mM, a pH 7.0, en presencia de Silwet al 0,02% (v/v) como agente humectante.

### III.2. Detección de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.

Para la detección *in situ* de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa, los tejidos frescos fueron infiltrados a vacío durante 20 minutos en una solución conteniendo 0,5 mg/ml de X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) y 0,1% (v/v) de Triton X-100 en tampón fosfato 50 mM a pH 7.2, e incubados a 37°C durante 10-16 horas. Posteriormente se destiñeron con sucesivos lavados de etanol al 70% (v/v).

### III.3. Mutagénesis de semillas de *Arabidopsis thaliana* e identificación de los mutantes *csb* y *scs*.

La estrategia de búsqueda de mutantes utilizada fue la identificación de plantas que expresaran el gen marcador *P69C-GUS* en ausencia de estímulo patogénico. Aproximadamente 20.000 semillas homocigotas para la construcción *P69C-GUS* fueron tratadas con una solución al 0,3% (v/v) de metano sulfonato de etilo (EMS) durante 9 horas a temperatura ambiente y con agitación continua. Transcurrido este tiempo, las semillas fueron lavadas exhaustivamente con abundante agua para eliminar cualquier residuo de EMS, se depositaron sobre un papel absorbente (Whatman) y se mantuvieron a 4°C durante toda una noche. Al día siguiente se sembraron estas semillas  $M_1$  en tierra, siendo agrupadas en 100 familias distintas y posteriormente se procedió a la recogida de las semillas  $M_2$  generadas. La determinación de la actividad GUS en las plantas  $M_2$  se realizó como se ha descrito en el apartado anterior. Se germinó en tierra una representación de aproximadamente 200 semillas de cada una de las 100 familias. Las plantas identificadas como posibles mutantes se

seleccionaban, recogían sus semillas (M<sub>3</sub>) y se analizaba de nuevo la actividad GUS en su descendencia.

Los mutantes *scs* fueron identificados de una población de plantas *csb3-1* mutagenizadas con EMS siguiendo un protocolo similar al descrito para los mutantes *csb*. Se aplicaron para el aislamiento de mutantes *scs* en la población M<sub>2</sub> generada dos criterios: reversión del aspecto morfológico característico de las plantas mutantes *csb3-1* y supresión de la expresión constitutiva del gen marcador *P69C-GUS* (Apartado III.2).

### III.4. Inoculación de las plantas.

#### **III.4.1. Inoculación de las plantas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst.* DC3000).**

La suspensión bacteriana utilizada para la inoculación de las plantas fue crecida en medio líquido King's B (KB) en presencia del antibiótico rifampicina (50 µg/ml) a 28°C durante aproximadamente un día. Inoculamos con 500 µl de este cultivo bacteriano fresco una placa de KB en presencia del antibiótico rifampicina. Este cultivo bacteriano se deja crecer a 28°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las bacterias se recogen tras mantenerlas en contacto unos minutos con una solución de sulfato magnesio 10 mM en presencia de 0.02% (v/v) de Silwet. Las plantas de aproximadamente dos semanas de crecimiento son inoculadas por inmersión siguiendo el método de Tornero y Dangl (2001). El cultivo bacteriano utilizado para la inoculación se ajusta a una DO<sub>600</sub> de 0.1. A los tiempos 0 (1h tras la inoculación), 3 y 5 días se pesan tres plántulas de cada genotipo a analizar en tres réplicas distintas que se introducen en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de sulfato de magnesio 10 mM en presencia de Silwet al 0.02% (v/v) y se deja en agitación durante 1 hora a 28°C. La densidad

bacteriana presente en el tejido vegetal se determina mediante diluciones seriadas de cada réplica en placas KB suplementadas con rifampicina. Los datos así obtenidos en al menos tres experimentos independientes se representan como la media y error relativo del log de u.f.c/PF (unidades formadoras de colonias/ peso fresco) de las tres réplicas.

#### **III.4.2. Inoculación de plantas con hongos fitopatógenos.**

Los experimentos de inoculación con *Hyaloperonospora parasitica* fueron realizados en plantas de tres semanas de crecimiento aproximadamente. El inóculo utilizado para rociar las plantas fue de  $10^5$  conidiosporas/ml. Al séptimo día se mide la densidad de esporas presente en el tejido vegetal usando un Hemocitómetro. Paralelamente, tejido foliar de las plantas tratadas se teñía con lactofenol azul de tripano a distintos días tras la infección y se examinaba al microscopio.

Para evaluar la respuesta de las plantas frente a *Plectosporium* y *Botrytis cinerea*, plantas de tres semanas son transplantadas individualmente y cultivadas a una temperatura de 22°C durante el día y 18°C durante la noche con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Cuando las plantas alcanzan una edad de 6 semanas se inoculan mediante la aplicación en 3 hojas de 6 µl de una suspensión de esporas para *Plectosphaerella cucumerina* ( $5 \times 10^6$  esporas/ml) o *Botrytis cinera* ( $2.5 \times 10^4$  conidia/ml). *P.cucumerina* fue aislado de su hospedante natural *Arabidopsis* ecotipo Landsberg erecta y crecido en 19 g/L de PDA (potato dextrose agar; Difco, Detroit) a temperatura ambiente durante dos semanas. Tras este tiempo las esporas son recogidas y suspendidas en 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. La cepa BMM1 se aisló de *Pelargonium zonale* y se creció en 19 g/L de PDA (Difco, Detroit) a 20°C durante 10 días. Las conidias fueron recogidas y suspendidas en PDS (potato dextrose sacarose) estéril (12 g/L; Difco). Las plantas fueron mantenidas en una humedad relativa del 100% y

los síntomas de la enfermedad, evaluados a los 4-10 días posteriores a la inoculación, se midieron como la media del diámetro de la lesión de tres hojas de cinco plantas.

### III.5. Detección de muerte celular.

Para la detección de muerte celular se utilizó la tinción del tejido foliar con azul de tripano y posterior aclarado con lactofenol descrito por Koch y Susarenko (1990).

### III.6. Determinación de SA.

El contenido en SA libre y conjugado presente en plantas *csb3* y plantas wt fue determinado mediante extracción con metanol y análisis H.P.L.C (Mayda *et al.*, 1999).

### III.7. Análisis Genéticos.

Los cruzamientos se realizaron mediante polinización de pistilos procedentes de botones florales cerrados emasculados con sumo cuidado en las plantas receptoras para evitar daños. Se realizaron retrocruzamientos entre los mutantes *csb* y la línea transgénica parental *P69C-GUS* y los mutantes *scs* y *csb3* con dos finalidades. Por un lado determinar el carácter dominante o recesivo de la mutación y por otro lado eliminar mutaciones adicionales que

podieran interferir con las mutaciones de interés. Las plantas  $F_1$  y  $F_2$  se analizaron por actividad GUS (*csb*) o por reversión del fenotipo morfológico característico de *csb3* (*scs*). Del mismo modo se realizaron los cruzamientos entre los mutantes *csb* y *scs* para el estudio de alelismos.

### III.8. Generación de Dobles Mutantes.

Los alelos mutantes utilizados para la generación de dobles mutantes con *csb3* fueron *npr1-1* (Cao *et al.*, 1997), *pad4-1* (Zhou *et al.*, 1998), *sid2-1* (Wildermuth *et al.*, 2001), *eds5-1* (Nawrath *et al.*, 2002), *dth9* (Mayda *et al.*, 2000) y la línea transgénica *nahG* (Lawton *et al.*, 1995). Los cruzamientos entre estos mutantes y *csb3-1* se realizaron utilizando las plantas *csb3-1* como receptoras del polen. La homocigosidad para cada uno de los loci se confirmó mediante marcadores moleculares CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) para cada alelo en las poblaciones  $F_2$  segregantes (Tabla 1). El criterio seguido para determinar la presencia de la mutación *dth9* fue la hipersusceptibilidad a *Pst.* DC3000. Todos los dobles mutantes generados fueron confirmados en la generación  $F_3$ .

El marcador molecular CAP generado para la identificación del alelo mutado *csb3-1* se ha utilizado para confirmar la presencia de la mutación *csb3-1* en las plantas *scs* y para el análisis de plantas *scs* procedentes de las generaciones  $F_2$  de los cruces entre los mutantes *scs* y las plantas wt.

Detectan	Cebador 5' ( 5'->3' )	Cebador 3' ( 5'->3' )	Detección por
<i>pad4-1</i>	gcgatgcatcagaagag	ttagcccaaagcaagtatc	digestión BsmFI
<i>sid2-1</i>	gctctgcagcttcaatgc	cgaagaaatgaagagcttgg	digestión True11
<i>eds5-1</i>	acaggtcggcgatgggaggtg	cagcttagctaitggtagg	digestión HphI
<i>nahG</i>	tggaactctgccgctact	aggtcgtcgtaggcttcaa	presencia de banda
<i>npr1-1</i>	atgtctcgaatgtacataagg	catgagtgcggttctacctc	digestión NlaIII
<i>csb3-1</i>	ggaggccttctgtgatgg	gtcgaccaacgacctgttc	digestión HinfI

**Tabla 1:** CAPs y cebadores utilizados para la identificación de las mutaciones *pad4-1*, *sid2-1*, *eds5-1*, *nahG*, *npr1-1* y *csb3-1*.

### III.9. Clonación de *CSB3* por cartografiado genético.

El mutante *csb3* (Col-0) se cruzó con otro ecotipo (Ler) generando la población F<sub>2</sub> recombinante con el objeto de localizar físicamente en el genoma la mutación *csb3*. En esta población F<sub>2</sub> se seleccionaron las plantas homocigotas para la mutación *csb3* y las plantas recombinantes se identificaron mediante el uso de marcadores SSLPs (Single Sequence Length Polymorphism) siguiendo el protocolo de Bell and Ecker (1994). También fue necesario el diseño de nuevos marcadores a partir de las bases de datos presentes en la página web [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org).

### III.10. Complementación de la mutación *csb3-1*.

El cDNA completo procedente de la colección de “Riken *Arabidopsis* Full Length Clone Database” fue amplificado por PCR con cebadores específicos diseñados para incluir la región aguas arriba del codón de inicio de la transcripción y parte de la región 3' tras el codón de parada del gen *CSB3*. Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar *CSB3* se detallan a

## Materiales y Métodos

continuación: *CSB3.pcr1* (5' ctt cct ctg gat cct tct ett etc 3') y *CSB3.pcr2* (5' gga cac tag ttc aaa atg atg atg 3'). El cDNA fue clonado en el vector binario pBI121.3 (Clontech) bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV y posteriormente en el vector pCAMBIA 1300 (pCAMBIA 35SCSB3). Dicha construcción fue transferida a células de la cepa C58 de *Agrobacterium* para la posterior transformación de flores de plantas *csb3-1* por el método de infiltración a vacío (Bechtold *et al.*, 1993).

### III.11. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.

#### **III.11.1. Transformación de *Escherichia coli*.**

La obtención de células competentes de *Escherichia coli* (XL-1-Blue y DH5 $\alpha$ ) se realizó con un tratamiento de metales divalentes y su transformación se llevó a cabo mediante choque térmico a 42°C, según el método descrito por Hanahan (1986) y modificado por Ausubel *et al.*, 1995.

#### **III.11.2. Purificación de plásmidos bacterianos.**

Para la purificación de plásmidos de bajo número de copia (pBI<sup>®</sup> y derivados), así como para la obtención de plásmidos de alto número de copia (pBluescript<sup>®</sup>SK, pGEM<sup>®</sup>7 y otros), se siguieron los protocolos de lisis alcalina descritos por Ausubel *et al.* (1995).

#### **III.11.3. Aislamiento y manipulación del DNA de plantas.**

El DNA total de planta fue extraído por el método de Rogers y Bendich (1988).



#### **III.11.4. Aislamiento y manipulación del RNA de plantas.**

La extracción de RNA de muestras de *Arabidopsis* se llevó a cabo según el método descrito por Kiedrowsky *et al.* (1992). Las muestras de RNA para *Northern blot* fueron fraccionadas en geles de agarosa-formaldehído (Lehrach *et al.*, 1977) y transferidas a membranas de Nytran (S&S) para su posterior hibridación.

#### **III.11.5. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA, hibridación y autorradiografía.**

La obtención de sondas radiactivas de DNA se realizó marcando los fragmentos con el kit “Ready-to-go®” (Pharmacia), utilizando como nucleótido radiactivo  $\alpha^{32}$ -P-dCTP (Amersham), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos marcados fueron purificados utilizando columnas comerciales de exclusión molecular Quick Spin™ (Boehringer Mannheim). Las condiciones de hibridación y lavado para los análisis *Northern blot* fueron las descritas por Church y Gilbert (1984). Las películas empleadas para autorradiografías (X-OMAT AR, Eastman Kodak Company) fueron reveladas en una procesadora automática (M-35-X-OMAT, de Kodak).

#### **III.11.6. Reacciones de amplificación (PCR, RT-PCR).**

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un aparato Perkin-Elmer/Cetus DNA cycler siguiendo un programa adecuado para la temperatura media de fusión de cada par de oligonucleótidos. Básicamente, en función del volumen empleado en cada reacción se utilizaba los cebadores a una concentración de 20  $\mu$ M, 1 ng/ $\mu$ l de molde aproximadamente, 10 mM de cada nucleótido libre y 2 unidades/ $\mu$ l de Taq polimerasa (Pharmacia).

## Materiales y Métodos

Para las reacciones de transcripción reversa seguidas de PCR se utilizó el kit “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Pharmacia). La primera reacción se realizó en un volumen total de 20 µl, utilizando el oligo *NotI*-d(T)<sub>18</sub>, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR posterior se utilizaron 5 µl de la primera reacción, usando en cada caso los cebadores específicos para cada uno de los genes objeto de análisis (ver Tabla III.2).

Gen	Cebador 5' ( 5'->3' )	Cebador 3' ( 5'->3' )
<i>CSB3</i>	ggaggcctcttgatgg	gtcgaccaacgacatgttc
<i>PR1</i>	atgaatttactggctggctattc	aaccacatgttcacggcgga
<i>PR2</i>	gcttcctcaacccaca	ctgaacctcctgagacgga
<i>PR5</i>	ctctcctcgtgttcacaca	catctacgaggctcacatcgt
<i>GST6</i>	atggcaggaatcaaagtctcggtc	gagattcactaaagaacctctg
<i>PDF1.2</i>	atggctaagttgctccat	acatgggacgtaacagatac
<i>AtSBT3.3</i>	agcagaccaggagtaagga	tgacgggtctggtgagagtg
<i>AtSBT3.5</i>	acgacatgggtccaagagac	gcgttctcacagacacagga

**Tabla III.2: Cebadores específicos utilizados para cada uno de los genes objeto de análisis RT-PCR.**

### III.12. Chips de DNA.

El RNA total de tejido foliar de plantas *csb3* y plantas control procedentes de tres experimentos independientes se extrajo siguiendo el protocolo del TRIZOL® (Invitrogen) y posteriormente se purificó mediante la utilización del kit “RNAeasy®” (QIAGEN). A continuación, se marcaron ambas muestras (wt y *csb3*) con dos fluorocromos distintos mediante RT-PCR. Una vez preparadas las sondas se hibridaron sobre chips 22k que contienen 22500 sondas que representan aproximadamente 24000 genes de *Arabidopsis*. Estos chips han sido generados por Affymetrix. Esta aproximación permite un análisis transcriptómico global de las plantas *csb3*, permitiendo la identificación de

genes cuya expresión variaba un mínimo de dos veces en las plantas *csb3* con respecto a las plantas control. El análisis comparativo de los datos fue generado con el programa Affymetrix Microarray Analysis Suite 5.0.

### III.13. Aplicaciones bioinformáticas.

Los análisis de secuencia se realizaron utilizando el programa GCG de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984) instalado en el servidor UNIX Silicon Graphics Origin 200 del IBMCP.

La búsqueda de mutantes de inserción de T-DNA se hizo a través de la página web <http://signal.salk.edu> (Alonso *et al.*, 2003). El clon de Riken que contenía el cDNA completo del gen *CSB3* se consultó y solicitó en <http://www.brc.riken.jp/lab/epd/catalog/cdnaclone.html>.

La información de regiones polimórficas entre los genomas de los ecotipos Col-0 y Ler para el diseño de marcadores moleculares utilizados en el cartografiado genético del mutante *csb3* fue consultada en: <http://www.arabidopsis.org/Cereon/index.htm>

Los rastreos mediante algoritmo BLAST de las bases de datos EMBL/Genbank, se efectuaron a través de los formularios en línea que se encuentran en la dirección de Internet del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del TAIR (*Arabidopsis* Information Resource; (<http://www.arabidopsis.org>)).



## *Resultados y Discusión.*



#### **IV. Resultados y Discusión.**

Con el propósito de identificar nuevos genes implicados en las rutas de señalización que regulan y controlan la respuesta defensiva de la planta se abordó una estrategia genética basada en la identificación de plantas mutantes alteradas en dicha respuesta.

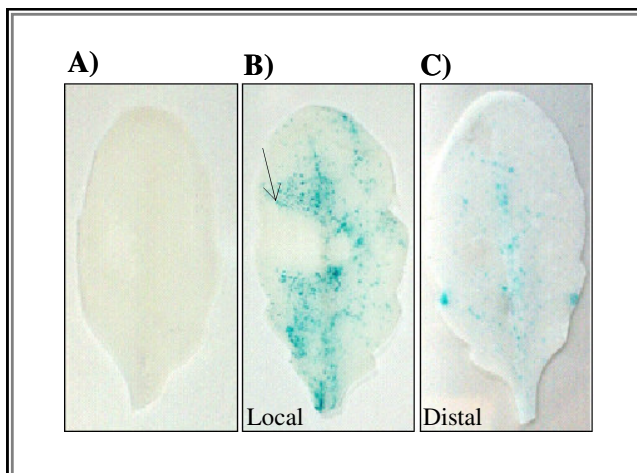
Como punto de partida para la identificación de mutantes se realizó una mutagénesis de una población de semillas de *Arabidopsis thaliana* transgénica para el gen *P69C-GUS*. El gen *P69C* codifica una subtilisina inducible por *Pseudomonas syringae* perteneciente a la familia de las *P69* de tomate. La utilización de dicho promotor se basaba en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con la línea transgénica *P69C-GUS* que revelaban la singularidad del patrón de expresión de dicho gen tras la infección patogénica en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Jordá y Vera, 2000). Se realizó un estudio comparativo de la distribución de la actividad GUS en las plantas *P69C-GUS* mediante tinción *in situ* utilizando el compuesto cromogénico X-gluc como sustrato para la  $\beta$ -glucuronidasa (Jefferson *et al.*, 1987), antes y después de ser inoculadas con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Este tipo de bacteria, debido a la presencia del gen de avirulencia *avrRpm1*, que es reconocido por el correspondiente gen de resistencia (*RPM1*) en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, produce una respuesta hipersensible (HR) en el punto de inoculación. Como puede apreciarse en la Figura 1, la expresión dirigida por este promotor se induce tras la infección bacteriana. El patrón de expresión acontece en forma de punteaduras que se distribuyen de forma homogénea a lo largo de toda la superficie de la lámina foliar. Dicho patrón es detectable tanto a nivel local como en hojas sistémicas no inoculadas (Figura 1B y 1C). Asimismo, se generaron plantas transgénicas portadoras de la región codificante del enzima luciferasa (LUC) bajo el control transcripcional del promotor *P69C* (*P69C-LUC*). Estas plantas *P69C-LUC* reproducían claramente el patrón de expresión

## Resultados y Discusión

observado para las plantas *P69C-GUS*. A diferencia de la determinación de la actividad GUS, la detección de la actividad LUC no es destructiva y por tanto permitió analizar *in vivo* el patrón de expresión espacio-temporal para el gen *P69C*. De este modo se comprobó, de nuevo, que la expresión de *P69C* no se circunscribe alrededor del punto de inoculación y además acontece de forma generalizada en toda la planta (Datos no mostrados; Jordá y Vera, 2000).

La singularidad de la expresión de *P69C* constituyó el punto de partida para la búsqueda de mutantes afectados en la expresión de este gen con el fin de identificar reguladores del mismo. Dicha estrategia ha sido utilizada con éxito para la búsqueda de reguladores del gen  $\beta$ -glucanasa (*BGL2-GUS*) asociado al fenómeno SAR y ha permitido la identificación de mutantes que de forma constitutiva expresan el promotor de dicho gen (i.e. *cpr1*, *cpr5* (Bowling *et al.*, 1997) o *cpr6* (Clarke *et al.*, 1998)) o que por el contrario, no lo inducen tras la aplicación de SA o la infección patogénica (i.e., *npr1* (Cao *et al.*, 1997)).





**Figura 1: Estudio *in situ* del patrón de expresión del gen marcador *GUS* bajo el control transcripcional del promotor de *P69C* en un contexto patogénico de interacción incompatible.**

A) Expresión de actividad *GUS* en hoja de roseta de una línea transgénica *P69C-GUS* tras ser inoculada con una solución control.

B) Línea transgénica *P69C-GUS*; hojas inoculadas con *Pst. DC3000 (avrRpm1)* y analizada por actividad *GUS* a las 24 h postinoculación (p.i.).

C) Línea transgénica *P69C-GUS*; hoja distal (no inoculada) procedente de una planta inoculada tal y como se muestra en B) a las 24 h p.i.

#### IV. 1. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* alterados en la regulación transcripcional de *P69C-GUS*.

En estos últimos años, el aislamiento y caracterización de mutantes ha sido una de las herramientas más valiosas a la hora de profundizar en el estudio de la regulación y función de genes implicados en los mecanismos que operan en la activación de la respuesta defensiva de las plantas. Así pues, el aislamiento y caracterización de mutantes alterados en la regulación del gen de defensa *P69C* constituye una aproximación fundamentalmente genética con el fin de identificar reguladores de la respuesta defensiva.

El criterio de selección aplicado al escrutinio de mutantes se basaba en la identificación de plantas en las que, de forma constitutiva y sin la existencia de ningún estímulo externo, se encontrara activada la expresión del gen *GUS* dirigida por el promotor de *P69C*. Se seleccionó una línea homocigota para la construcción *P69C-GUS* en *Arabidopsis thaliana* (Col-0), y procedimos a mutagenizar 20000 semillas de dicha línea transgénica utilizando metano sulfonato de etilo (EMS). Dichas semillas mutagenizadas fueron agrupadas para su siembra en 100 familias ( $M_1$ ) con objeto de facilitar la clasificación inicial de los mutantes en series alélicas distintas. La selección de mutantes que expresasen *GUS* se efectuó sobre plantas  $M_2$ . Se separó una hoja de cada planta  $M_2$  y mediante tinción histoquímica con el substrato cromogénico X-gluc, se determinó la presencia de la actividad *GUS*. El resultado de este análisis, efectuado sobre aproximadamente 12800 plantas  $M_2$ , permitió identificar 13 individuos con expresión constitutiva del gen marcador *GUS*. Dichos mutantes se designaron como *csb* (*constitutive subtilisin*). A continuación, comprobamos la sobreexpresión de *GUS* en los mutantes identificados en las generaciones  $M_3$  y  $M_4$  descartando algunos de estos mutantes. A la vista de los resultados obtenidos, los mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3* fueron los

candidatos seleccionados para los siguientes estudios (véase Figura 4).

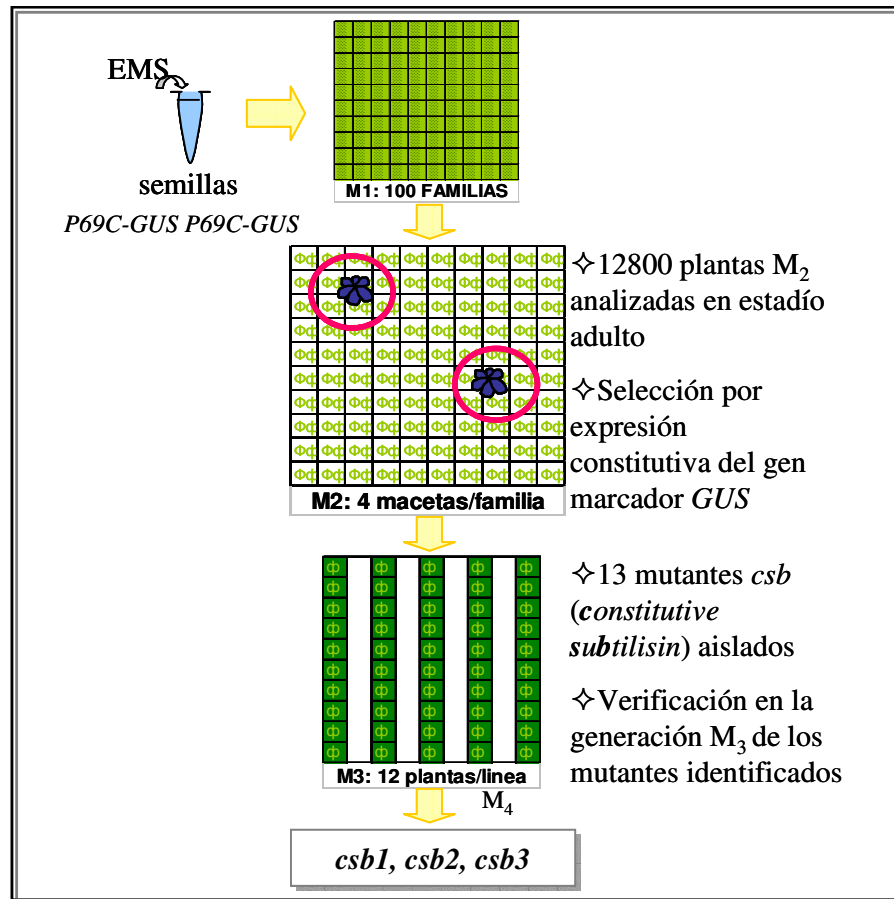


Figura 2: Esquema del escrutinio seguido para el aislamiento e identificación de los mutantes *csb* (*constitutive subtilisin*).

#### **IV.1.1. Caracterización morfológica de los mutantes *csb*.**

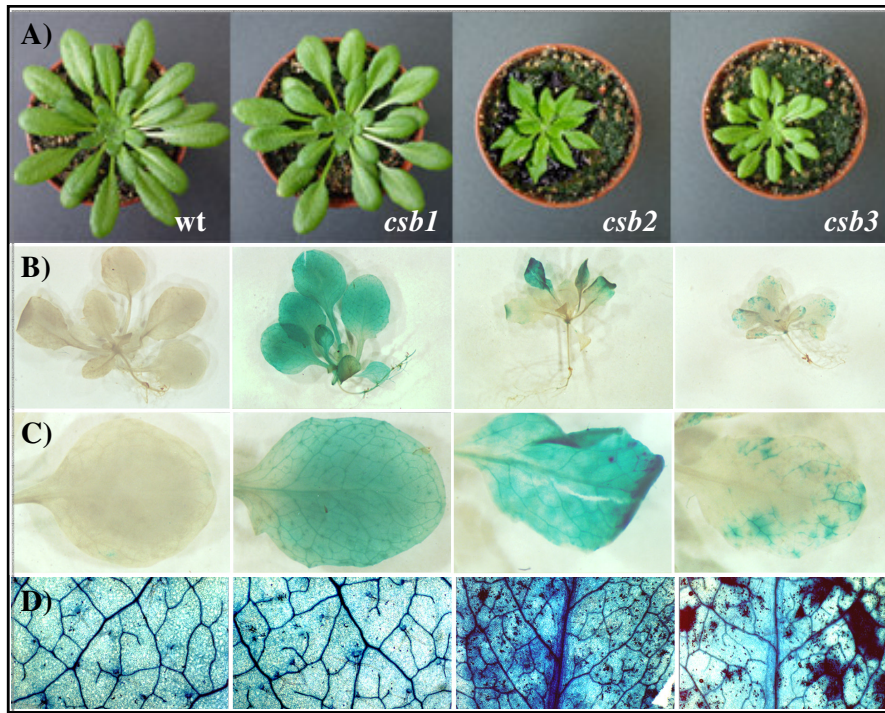
Como puede apreciarse en la Figura 3A, las plantas *csb1* son indistinguibles morfológicamente de las plantas wt (línea parental no mutagenizada *P69C-GUS*). En cambio, las plantas *csb2* y *csb3* presentan diversas características morfológicas que las diferencian claramente de las plantas silvestres (enanismo y una morfología foliar abigarrada). Este fenotipo morfológico atribuible a las mutaciones *csb2* y *csb3* constituye un marcador de gran utilidad en estudios genéticos facilitando la identificación de estos mutantes.

#### **IV.1.2. Efecto de las mutaciones *csb* sobre la expresión del transgén *P69C-GUS*.**

El análisis de actividad  $\beta$ -glucuronidasa consistió en la tinción histoquímica de plántulas y de hojas de roseta con el sustrato X-gluc. Los resultados obtenidos de este ensayo pueden observarse en la Figura 3B y 3C. Los tres mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3* muestran expresión constitutiva del gen marcador *GUS*. En los tres casos, la expresión constitutiva de *GUS* se detecta desde un estadio de plántula hasta estadios de planta adulta. Sin embargo, se observan diferencias en el patrón de expresión. A diferencia de los mutantes *csb2* y *csb3*, el mutante *csb1* se caracteriza por un patrón de expresión de *P69C-GUS* generalizado y homogéneo por todos los tejidos de la planta. Para los mutantes *csb2* y *csb3*, el patrón de expresión acontece a modo de punteaduras en tejido foliar y es similar al de la línea transgénica parental *P69C-GUS* tras la infección con *Pst. DC3000 (avrRpm1)*. Parecería razonable pensar que las plantas *csb2* y *csb3* tienen alterado alguno de los componentes que participan en la regulación patogénica del gen *P69C*.

**IV.1.3. Los mutantes *csb2* y *csb3* muestran micro-lesiones.**

Existen muchos ejemplos en la bibliografía de mutantes con activación de mecanismos de defensa dependientes del ácido salicílico y que además presentan lesiones espontáneas que reproducen una respuesta de tipo SAR (Glazebrook *et al.*, 1997). La tinción con azul de tripano y posterior aclaración con lactofenol, utilizada para detectar las células o agrupaciones celulares bajo proceso de muerte celular, puso de manifiesto la presencia de lesiones microscópicas de dimensión limitada en la superficie foliar de las plantas *csb2* y *csb3* (véase Figura 3D). Estas lesiones se asemejan a las micro-HR que se producen en hojas distales no inoculadas tras la elicitación con un patógeno (Alvarez *et al.*, 1998). La presencia de estas lesiones microscópicas sugiere la posible activación de mecanismos defensivos en *csb2* y *csb3*.



**Figura 3: Caracterización de los mutantes *csb*.**

A) Aspecto morfológico de las plantas wt (línea parental no mutagenizada *P69C-GUS*) y los mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3*.

B) Patrón de expresión del gen marcador *GUS* en plántulas wt y *csb*.

C) Patrón de expresión del gen marcador *GUS* en hojas de roseta procedentes de plantas similares a las mostradas en A).

D) Tinción histoquímica con azul de tripano mostrando agrupaciones de células muertas sólo visibles al microscopio y presentes en tejido foliar de plantas sanas *csb2* y *csb3* pero no en plantas *csb1* y wt.

#### **IV.1.4. Análisis genético de los mutantes *csb*.**

Los estudios encaminados a la caracterización genética de los mutantes *csb* consistieron en test de dominancia y test de alelismo (Tabla 1). Con objeto de definir la relación de dominancia o recesividad se procedió a la realización de los cruzamientos entre plantas wt (la línea transgénica parental no mutagenizada *P69C-GUS*) y los mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3*. El análisis de la población F<sub>2</sub> derivada de dichos cruzamientos reveló el carácter recesivo de estas tres mutaciones. En las plantas F<sub>2</sub> analizadas la expresión del gen marcador *GUS* se ajustaba a una proporción 3:1 (3 ausencia de expresión del gen marcador *GUS* (-): 1 expresión constitutiva *GUS* (+)) para los tres mutantes analizados según el test estadístico  $\chi^2$ . En la Tabla 1A se recogen los datos correspondientes a estos estudios. De los datos obtenidos, se infiere que *csb1*, *csb2* y *csb3* son mutaciones nucleares monogénicas de carácter recesivo. A continuación, se prosiguió con sucesivos retrocruzamientos de los tres mutantes con plantas wt con objeto de eliminar posibles mutaciones que pudieran interferir con la manifestación de fenotipo.

La realización del test de alelismo, mediante cruzamientos entre los tres mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3* y análisis de la expresión del gen marcador *GUS* en las poblaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> establece que las tres mutaciones identifican alelos distintos correspondientes a loci diferentes (Tabla 1B). En todos los casos, al ser mutaciones no alélicas y recesivas la expresión del gen *GUS* se detectaba en 7/16 de la población F<sub>2</sub>.

A)

	Total plantas F <sub>2</sub>	GUS(-)	GUS (+)	Hipótesis H <sub>0</sub>	Valor $\chi^2$	Cáncer de la mutación
<i>csb1</i> x wt	81	61	30	3:1	2,46	Recesiva
<i>csb2</i> x wt	244	183	61	3:1	0	Recesiva
<i>csb3</i> x wt	240	173	67	3:1	0,4	Recesiva

B)

<i>csb1</i>	<i>csb1</i>		
<i>csb2</i>	No alélico	<i>csb2</i>	
<i>csb3</i>	No alélico	No alélico	<i>csb3</i>

**Tabla 1. Resumen del análisis genético de los mutantes *csb*.**

A) Análisis de las segregaciones en las poblaciones F<sub>2</sub> generadas a partir de los cruces entre plantas wt y plantas *csb*. Las hipótesis nulas (H<sub>0</sub>) emitidas se aceptan, asumiendo un error máximo del 5% cuando el valor estadístico  $\chi^2 < 3,84$ .

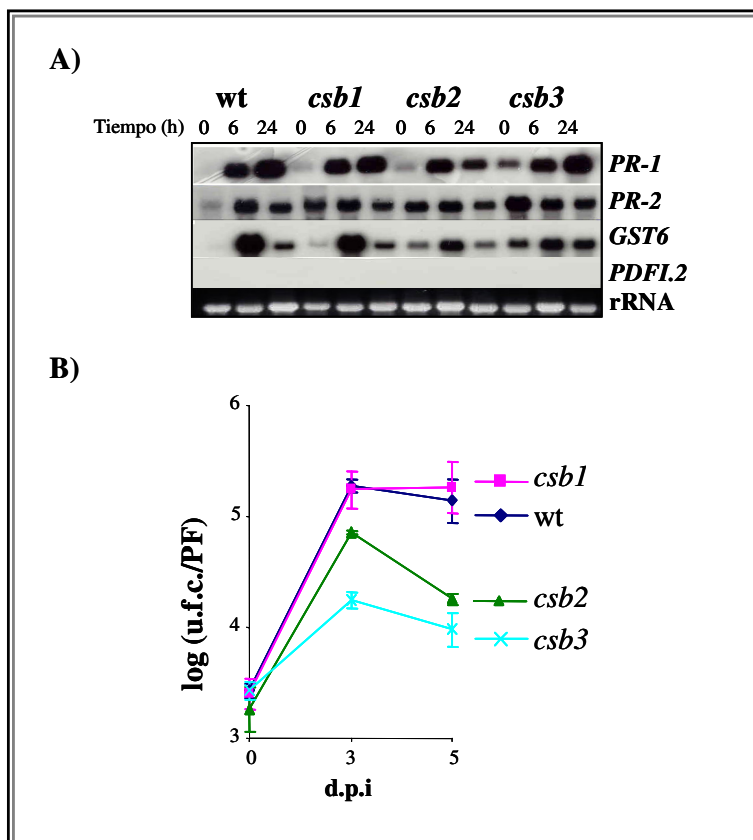
B) Test de alelismo. Tabla resumen del análisis de las poblaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> generadas a partir de los cruzamientos entre los tres mutantes *csb* identificados.

#### **IV.1.5 Resistencia de las plantas *csb* a *Pst*. DC3000.**

La finalidad más relevante de la identificación de mutantes desregulados en la expresión del gen *P69C-GUS* es la de esclarecer los mecanismos que controlan la expresión de este gen durante el proceso defensivo. Con tal objetivo, se analizó si la expresión de *P69C-GUS* en los mutantes identificados implicaba alguna alteración en su capacidad defensiva. Inicialmente se analizaron los niveles de expresión de algunos genes relacionados con las rutas de señalización defensiva en plantas *csb1*, *csb2* y *csb3* mediante *Northern blot*. Como marcadores moleculares de la ruta de señalización dependiente de ácido salicílico analizamos los niveles de RNA mensajero de *PR-1* y *PR-2* y del gen *GST6* (Ryals *et al.*, 1996). Como marcador de una ruta dependiente del JA/ET, determinamos los niveles de



expresión del gen *PDF1.2* (Peninckx *et al.*, 1996). De igual manera, se estudió la inducibilidad de la expresión de dichos genes tras tratamiento con 0,5 mM de SA en plantas wt y *csb* (Figura 4A). En plantas *csb1* se detectan niveles de expresión similares a los observados en plantas wt, a excepción del gen *PR-2* que muestra niveles altos de expresión antes del tratamiento (Figura 4A). Por el contrario, los niveles de expresión de los genes *GST6* y *PR-2* detectados en plantas *csb2* son superiores a los niveles presentes en las plantas wt. Las plantas *csb3* muestran los niveles más altos de expresión de estos tres genes en ausencia de estímulo patogénico o tratamiento con SA. En todos los casos se pudo observar que el tratamiento con SA provocaba la sobreinducción de la expresión de los genes *GST6*, *PR-1* y *PR-2* (Figura 4A). En este mismo estudio también se analizó la expresión del gen defensivo *PDF1.2*, para determinar si las mutaciones *csb* podían afectar a la vía de señalización dependiente de JA/ET. Al contrario de lo que ocurría con los niveles de expresión de los genes *PR-1*, *PR-2* y *GST6* la expresión del gen *PDF1.2* permaneció invariable tanto en la planta wt como en los mutantes *csb*, no pudiéndose observar en ningún caso niveles detectables de mRNA. Así pues, el mutante *csb1* permanece inalterado en las rutas características de señalización y activación de genes de defensa, sin embargo posee activado transcripcionalmente *P69C-GUS*. Es significativo que las mutaciones *csb2* y *csb3* afectan tanto a la expresión del gen marcador *GUS* como a los genes implicados en la respuesta defensiva dependiente del SA. Con el fin de caracterizar la resistencia de los mutantes *csb* a la bacteria *Pst*. DC3000 se midió dicho crecimiento en las plantas wt, *csb1*, *csb2* y *csb3*. Como puede apreciarse en la Figura 4B, no existen diferencias significativas entre el crecimiento bacteriano en las plantas wt con respecto al mutante *csb1*. Por el contrario, las plantas *csb2* y *csb3* restringen el crecimiento de la bacteria de forma drástica y cuantificable en al menos diez veces al registrado para las plantas wt.



**Figura 4: Efecto de las mutaciones *csb* sobre la resistencia a *Pst.* DC3000.**

A) Análisis *Northern blot* de la expresión de los genes *PR-1*, *PR-2*, *GST6* y *PDF1.2* en plantas wt y en los mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3* a las 0, 6 y 24 horas tras tratamiento con una solución 0,5 mM de SA.

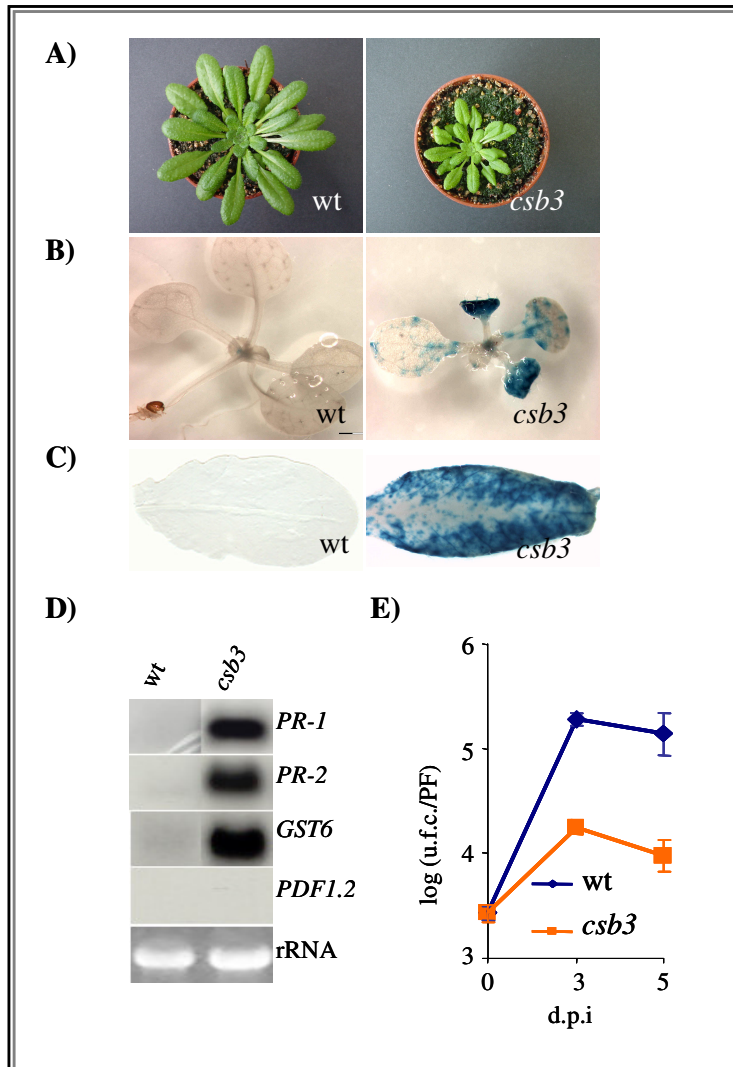
B) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria *Pst.* DC3000 en plantas *csb1*, *csb2*, *csb3* y plantas wt. . Las barras de error reflejan la desviación de los resultados obtenidos en las tres réplicas independientes del ensayo. El experimento se repitió tres veces con similares resultados.

## IV.2. El mutante *csb3* está específicamente alterado en la resistencia a patógenos biotrofos.

Tras la caracterización general de los mutantes *csb* (Apartado IV.1), se procedió a la selección del mutante *csb3* para un estudio en mayor profundidad habida cuenta de que su resistencia a *Pst.* DC3000 es superior a la observada para *csb1* y *csb2*. También facilitó dicha selección el comportamiento reproducible y anticipable de las plantas *csb3* tal y como se muestra en la Figura 5.

### **Figura 5: Caracterización de las plantas *csb3*.**

- A) Apariencia externa de las plantas wt y plantas *csb3* fotografiadas a las cuatro semanas de haber sido sembradas.
- B) Tinción histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor *P69C* en plántulas transgénicas y en plántulas *csb3* tras 10 días de crecimiento en medio MS.
- C) Detección de la actividad GUS en hojas de plantas similares a las mostradas en A).
- D) Estudio comparativo del crecimiento de *Pst.* DC3000 en plantas wt y *csb3*. Las barras de error reflejan la desviación de los valores obtenidos en las tres réplicas independientes del ensayo. El experimento se repitió tres veces con similares resultados.
- E) Expresión de los genes marcadores *PR-1*, *PR-2*, *GST6* y *PDF1.2* en plantas sanas wt y *csb3*.



**IV.2.1. Las plantas *csb3* muestran mayor resistencia frente a patógenos biotrofos pero no frente a patógenos necrotrofos.**

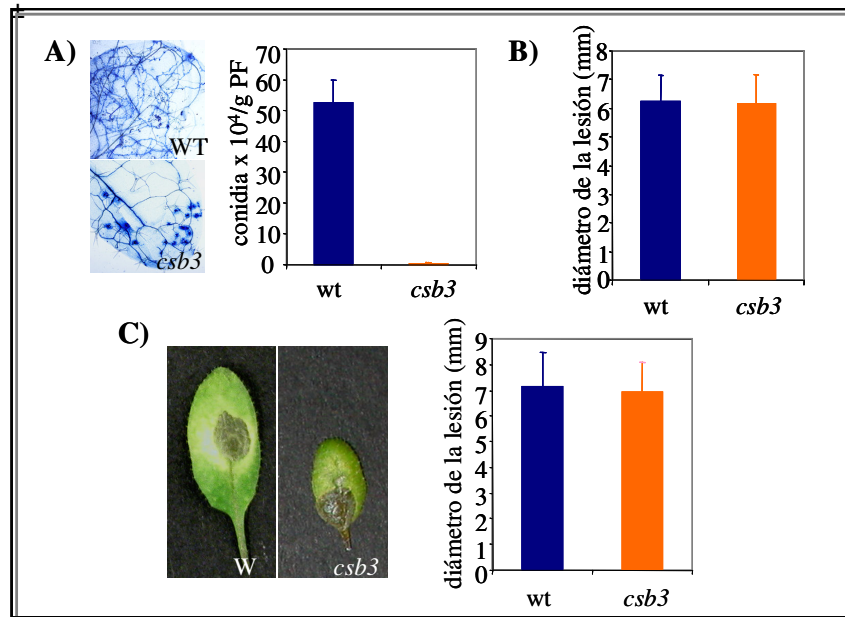
*IV.2.1.1. Estudio de la interacción del mutante *csb3* con *Hyaloperonospora parasitica*.*

Con el propósito de estudiar si la resistencia de las plantas *csb3* es específica para *Pst.* DC3000 o es una resistencia generalizada frente a otros patógenos biotrofos decidimos testar la resistencia de dichas plantas frente a *Hyaloperonospora parasitica* (*H. parasitica*). La respuesta de las plantas *csb3* al oomiceto obligado *H. parasitica* comparada con la respuesta de las plantas silvestres se muestra en las Figuras 6A y 6B. Se inocularon 25 plantas *csb3* y 25 plantas silvestres con el aislado NOCO ( $10^5$  conidiosporas por mililitro). El crecimiento de este aislado virulento para *Arabidopsis thaliana* Col-0 fue evaluado por observación directa de las hifas teñidas en las hojas infectadas y por conteo de las esporas producidas en este mismo tejido (Figura 6A). De ambas evaluaciones del crecimiento de *H. parasitica* se desprende una marcada diferencia entre las plantas silvestres y las plantas *csb3*. Mientras en las plantas silvestres *H. parasitica* completa su ciclo formando oosporas sexuales, conidias y conidióforos asexuales, en las plantas *csb3* se inhibe drásticamente el crecimiento de este patógeno. Este resultado de marcada resistencia del mutante *csb3* a la infección por *H. parasitica* y a *Pst.* DC3000 (Figura 5) indica que la respuesta frente a patógenos biotrofos está alterada como consecuencia de la mutación recesiva *csb3*. El locus *CSB3* podría estar implicado en la regulación negativa de ciertos aspectos de la respuesta defensiva y de manera específica la respuesta a patógenos biotrofos.

## Resultados y Discusión

IV.2.1.2. Estudio de la interacción del mutante *csb3* con *Plectosphaerella cucumerina* y *Botrytis cinerea*.

La susceptibilidad de las plantas *csb3* frente a patógenos fue investigada más ampliamente utilizando patógenos no biotrofos tales como *Plectosphaerella cucumerina* (*P. cucumerina*) y *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*). Estos patógenos son denominados necrotrofos ya que su crecimiento progresa rápidamente sobre tejido muerto. La resistencia frente a estos patógenos es consecuencia de la activación de la ruta de señalización dependiente de JA/ET. Los síntomas postinoculación con *P. cucumerina* se caracterizan por la formación de lesiones que aumentan de tamaño a medida que progresa la infección degradando la lámina foliar. Como se observa en la Figura 6B no existen diferencias en el tamaño de la lesión entre las plantas silvestres y plantas *csb3*. Procedimos a inocular plantas silvestres y plantas *csb3* con *B. cinerea*. Tanto las plantas silvestres como *csb3* resultaron altamente susceptibles a *B. cinerea* mostrando necrosis así como una extensa proliferación del micelio fúngico, como queda claramente reflejado en las Figura 6C. Estos resultados descartan la posibilidad de que la mutación *csb3* afecte a la susceptibilidad de la planta frente a patógenos necrotrofos. En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la marcada resistencia del mutante *csb3* a patógenos biotrofos, pero no a necrotrofos, es una característica íntimamente ligada al locus *CSB3*.



**Figura 6: Respuesta del mutante *csb3* frente a distintos patógenos.**

A) Estudio comparativo del ciclo infectivo de *H. parasitica* en plantas wt y *csb3*. Tinción histoquímica foliar con azul de tripano de plantas tras tres semanas de crecimiento pulverizadas con un inóculo de 10<sup>5</sup> conidiosporas por mililitro de *H. parasitica* y observadas al microscopio para la visualización del crecimiento de hifas y conidiosporas. A la derecha de la figura A) se muestra un histograma de cuantificación de conidiosporas de *H. parasitica* en plantas wt y *csb3* a los 7 días tras la inoculación.

B) Los síntomas de la enfermedad producida por la inoculación con *P. cucumerina* evaluados como el diámetro medio de la lesión a los 6 días en tres hojas de ocho plantas para cada genotipo.

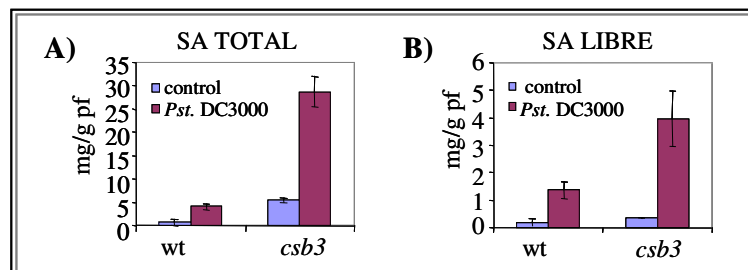
C) Hojas representativas de plantas wt y plantas *csb3* a los 4 días de inocular con una suspensión de 6 µl de esporas de *B. cinerea* (2.5 x 10<sup>4</sup> conidia/mL). Tamaño de la lesión producida tras seis días de la inoculación con *B. cinerea*. Los valores representan la media de la lesión ± SE de las medidas procedentes de un mínimo de 30 lesiones.

Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces con resultados similares.

#### **IV.2.2. Cuantificación de los niveles de SA en el mutante *csb3*.**

La marcada resistencia de las plantas *csb3* a patógenos biotrofos así como la activación en la expresión de genes inducibles por SA en plantas sanas de *csb3* sugiere la posibilidad de que los niveles del SA presentes en dicho mutante sean superiores a los niveles presentes en las plantas wt. Para evaluar dicha posibilidad se midió la concentración tanto del SA libre como de su conjugado glucosilado (SAG) en hojas de plantas sanas *csb3* y control wt, así como tras la infección con *Pst.* DC3000. Como puede apreciarse en la Figura 7, en hojas sanas de *csb3* existe un incremento de ocho veces en el contenido de SAG comparado con las plantas wt no inoculadas. Sin embargo, en estas condiciones no se aprecian diferencias en el SA libre. Por el contrario, las diferencias en el contenido del SA libre se hacen apreciables a los 3 días posteriores a la inoculación con *Pst.* DC3000. Aquí, los niveles del SA libre presentes en hojas inoculadas son once veces superior a los niveles registrados en hojas sanas de plantas *csb3*, mientras que en las plantas wt esta diferencia se reduce solamente al doble. Incrementos proporcionales se observan en los niveles de SAG tras la infección con *Pst.* DC3000 en plantas wt y *csb3*. De todos estos resultados se infiere que la mutación *csb3* conlleva un aumento en la acumulación del SA y que tras la infección con el patógeno se promueve mayor síntesis y acumulación.





**Figura 7: Contenido en SA y SAG en plantas wt y *csb3*.**

Las plantas wt y *csb3* fueron inoculadas con *Pst. DC3000* o con 10 mM de  $MgSO_4$  (mock). Cada barra representa la media del contenido de SA en cinco muestras. Tanto el SA como el SAG fueron determinados en las mismas muestras.

### IV.2.3. Interacción del mutante *csb3* con mutantes descritos para la ruta de señalización dependiente del SA.

#### IV.2.3.1. Generación de dobles mutantes.

Un amplio número de mutantes de *Arabidopsis thaliana* implicados en la activación de la respuesta defensiva dependiente de SA han sido aislados y caracterizados en los últimos años (Glazebrook, 1999). Con el objetivo de identificar qué componentes de esta ruta son necesarios para la manifestación del fenotipo de resistencia frente a patógenos biotrofos conferida por la mutación *csb3* abordamos la generación de los siguientes dobles mutantes: *csb3 pad4*, *csb3 sid2*, *csb3 eds5*, *csb3 nahG*, *csb3 npr1*, *csb3 dth9* y *csb3 cpr1* (Figura 10A). La mutación *pad4* impide la acumulación de SA tras la infección con el patógeno virulento *P. syringae* (Feys *et al.*, 2001; Jirage *et al.*, 1999) y suprime dicha acumulación en los mutantes que muestran resistencia constitutiva a biotrofos (Jirage *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2001). Las plantas mutantes *sid2* y *eds5* están afectadas en la síntesis y acumulación de SA que acontece en el cloroplasto por la ruta de biosíntesis del corismato y del

## Resultados y Discusión

isocorismato y en consecuencia muestran una mayor susceptibilidad a patógenos biotrofos (Nawrath y Métraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001). Las plantas *nahG* son portadoras del transgén que codifica la enzima salicilato hidroxilasa que degrada el SA a catecol (Lawton *et al.*, 1996) y por tanto no acumulan SA y son más susceptibles a patógenos biotrofos. El mutante *npr1* fue identificado por su marcada susceptibilidad a patógenos biotrofos y su incapacidad de establecer una respuesta SAR o expresar *PR-1* en respuesta al tratamiento con SA (Cao *et al.*, 1994). NPR1 es un regulador clave en distintas respuestas defensivas (Dong, 2004). Otro mutante afectado en la respuesta SAR es *dth9*. Aunque las plantas *dth9* mantienen la habilidad de expresar genes *PR* en respuesta a SA o tras la infección patogénica (Mayda *et al.*, 2000) muestran una marcada susceptibilidad frente a patógenos biotrofos. Por último, las plantas *cpr1* son más resistentes a patógenos biotrofos, muestran elevados niveles de SA endógenos en ausencia de estímulo patogénico y muestran un fenotipo morfológico característico (Bowling *et al.*, 1994). Así pues, el mutante *cpr1* comparte características comunes con *csb3*.

La generación de los dobles mutantes consistió en cruzamientos genéticos entre *csb3* y los mutantes mencionados y se procedió al análisis de las poblaciones F<sub>2</sub> en las cuales, tras identificar plantas con fenotipo *csb3*, se seleccionaba el doble homocigoto con marcadores moleculares desarrollados específicamente para identificar estas mutaciones (ver Materiales y Métodos, apartado III.8).

En el caso de la población F<sub>2</sub> proveniente del cruzamiento entre *csb3* y *nahG*, se observó que la presencia del transgén *nahG* estaba ligada a la manifestación de un fenotipo intermedio o menos severo que el mostrado por la línea parental *csb3*. En F<sub>3</sub> se confirmaron y seleccionaron las líneas dobles homocigotas (Figura 8). Este efecto de la presencia del transgén *nahG* en el aspecto morfológico ya ha sido reportado en la bibliografía para otros mutantes de activación constitutiva de la ruta dependiente del SA (Vanacker *et al.*, 2001).

Para la generación del doble *csb3 dth9*, al no estar clonado *dth9*, se seleccionaron plantas F<sub>2</sub> que mostraran el fenotipo *csb3* y se evaluó la respuesta a *Pst.* DC3000 en su descendencia. La pérdida de la resistencia característica de *csb3* en la descendencia determinaba la presencia de la mutación *dth9*.

La identificación del doble mutante *csb3 cpr1* también fue abordada en la población F<sub>3</sub> procedente de plantas F<sub>2</sub> con fenotipo *csb3*. En esta descendencia se observaron con una frecuencia aproximada de un 25% plantas con fenotipo extremo que superaba marcadamente el que *csb3* y *cpr1* pudieran mostrar por separado. Dichos dobles mutantes no alcanzan la fase reproductiva y por tanto tienen que ser propagados en heterocigosis. Este doble mutante (Figura 8) indica que la acumulación de SA por parte de *csb3* y *cpr1* procede de dos rutas independientes. El efecto aditivo de dichas rutas compromete severamente el normal desarrollo de la planta.



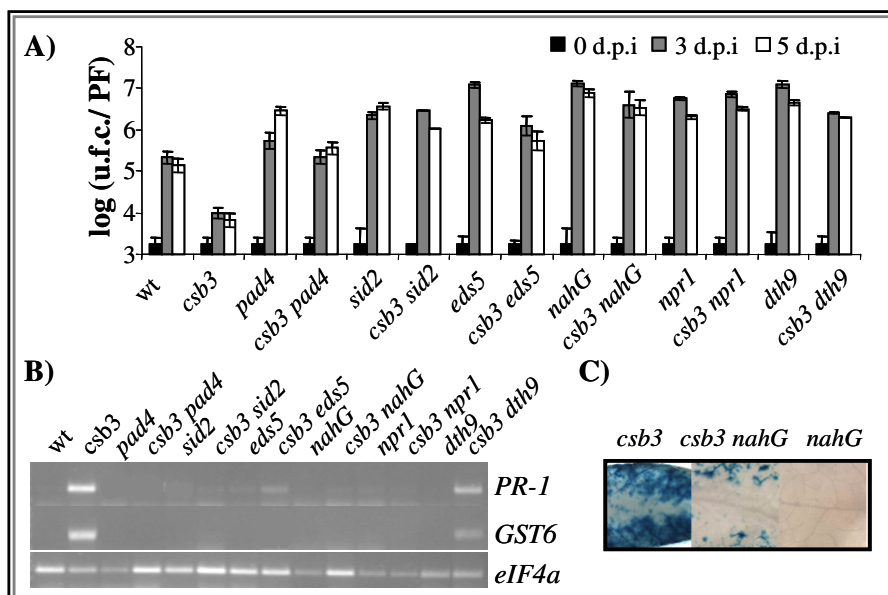
**Figura 8:** Aspecto morfológico de los dobles mutantes generados entre los mutantes descritos de la ruta dependiente del SA y el mutante *csb3*.

IV.2.3.2. *Caracterización de la expresión de genes de defensa y la resistencia a Pst. DC3000 en los dobles mutantes.*

Con el fin de profundizar en la naturaleza de la señalización activada por *csb3*, se procedió a la evaluación de los dobles mutantes en respuesta a la infección con *Pst. DC3000* y al análisis de la expresión de genes de defensa. Como puede apreciarse en la Figura 9A y 9B, la presencia de la mutación *pad4* en el mutante *csb3* suprime tanto la resistencia a *Pst. DC3000* como la expresión constitutiva de genes de defensa. Por tanto, la resistencia de las plantas *csb3* es dependiente de PAD4 tal y como ha sido descrito para otros mutantes de similares características (Jirage *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2001). Impidiendo la acumulación de SA en plantas transgénicas *nahG* (Lawton *et al.*, 1995) o inhibiendo su síntesis en plantas *sid2* y *eds5* (Nawrath y Métraux, 1999; Dewdney *et al.*, 2000) se bloquea la activación de la ruta defensiva dependiente del SA. Las plantas *csb3 sid2* y *csb3 eds5* son más susceptibles a *Pst. DC3000* que las plantas *csb3* y tampoco muestran la expresión constitutiva de genes de defensa observada para las plantas *csb3*. En las plantas *csb3 nahG* se observa una hipersusceptibilidad a *Pst. DC3000* y ausencia de expresión de genes inducibles por SA comparable a las plantas *nahG*. Además y como se observa en la Figura 9C, la actividad GUS presente en el tejido foliar procedente del doble *csb3 nahG* ha disminuido drásticamente por la presencia del transgén *nahG*. Las plantas *csb3 npr1* han perdido la resistencia atribuible a *csb3* y la susceptibilidad del doble mutante es similar a la observada en plantas *npr1* (Figura 9A). Así pues, la resistencia dependiente de SA en plantas *csb3* también requiere una copia funcional del gen *NPR1*. Asimismo, el doble mutante *csb3 dth9* también muestra una hipersusceptibilidad similar a la observada en plantas *dth9*. La mutación *dth9* no afecta a la expresión de genes *PR* característica de *csb3* en el doble mutante (Figura 9A y 9B). Por tanto, la mutación *csb3* requiere una copia salvaje del gen *DTH9* para la manifestación del fenotipo de resistencia a *Pst. DC3000*.

## Resultados y Discusión

Por tanto, la resistencia a *Pst.* DC3000 y la expresión de genes *PR* en plantas *csb3* son suprimidas en todos los dobles mutantes evaluados a excepción de la expresión de genes *PR* en el doble mutante *csb3 dth9* (Figura 9A y 9B). De los resultados obtenidos de los dobles mutantes analizados se desprende que el fenotipo de *csb3* requiere que todos los componentes que participan en la ruta de señalización dependiente de SA permanezcan inalterados.



**Figura 9: Requerimiento de la ruta de señalización del SA en la resistencia de *csb3* frente a *Pst.* DC3000.**

A) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria *Pst.* DC3000 en los dobles mutantes *csb3 pad4*, *csb3 sid2*, *csb3 eds5*, *csb3 nahG*, *csb3 dth9*, *csb3 npr1* comparada con la respuesta dada por los mutantes parentales y las plantas wt.

B) Análisis RT-PCR de la expresión de los genes *PR-1* y *GST6* en los dobles mutantes. Como control de la cantidad de RNA, utilizamos el nivel de mensajero del gen *eIF4 $\alpha$*  presente en las muestras.

C) Tinción histoquímica de la actividad GUS en hojas de roseta de las plantas *csb3 nahG*, *csb3* y *nahG*.

**IV.2.4. Análisis global de los cambios transcripcionales que ocurren en el mutante *csb3*.**

Los niveles de expresión de los genes marcadores *PR-1*, *PR-2* y *GST6* en el mutante *csb3* indican un estado de activación transcripcional para los genes dependientes de la ruta de SA. Para tratar de ampliar nuestro conocimiento sobre los cambios transcripcionales conducentes a la manifestación del fenotipo de *csb3*, se hibridó mRNA de tejido foliar procedente de plantas sanas *csb3* y plantas control sobre el chip 22k de Affymetrix. Los genes cuya expresión aumenta o disminuye con respecto al control, aparecen agrupados en las Tablas 2 y 3. En estas dos tablas se muestran solamente aquellos genes en los que la variación en el nivel de expresión difiere al menos 2 veces con respecto al control. Los mismos se han agrupado en distintas categorías funcionales: genes relacionados con la respuesta a estrés biótico, estrés oxidativo, reguladores de la expresión génica, quinasas y fosfatasas, lípidos (lipasas, hidrolasas y metabolismo de lípidos), hormonas, degradación de proteínas y proteasas y otros genes de posible interés. De los 24000 genes analizados en el chip hemos podido identificar 3843 genes que se sobreexpresan en *csb3*. De éstos, 372 genes presentan una expresión aumentada en *csb3* de al menos 2 veces con respecto al control. Con respecto a los genes reprimidos hemos identificado 2626 y tan sólo 101 genes están reprimidos más de dos veces.

En la tabla 2, el apartado A) corresponde a la categoría de estrés biótico, donde se confirman genes ya identificados por análisis *Northern blot* tal y como ocurre para *PR-1* y *PR-2*, y sugiere un estado defensivo en las plantas *csb3* aún en ausencia de patógeno. Destacamos en este grupo de genes relacionados con estrés biótico, los genes implicados en las primeras etapas de la interacción planta-patógeno, así como aquellos que participan en la síntesis del SA y los genes de respuesta defensiva (*PR*). Entre los genes pertenecientes a la primera clase, cabe destacar algunos genes *R* involucrados en el reconocimiento de los

## Resultados y Discusión

factores de avirulencia del patógeno tales como los pertenecientes a las clases LRR y TIR. También a *PAD4* y *EDSI* que participan en las primeras etapas de la ruta de transducción de la señalización mediada por SA. Genes directamente relacionados con la síntesis de SA, tanto de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides (cinamil-alcohol deshidrogenasa y caffeoyl-CoA 3 O-metiltransferasa) así como de la ruta de biosíntesis de SA a partir de isocorismato en el cloroplasto (*ICSI* y *EDS5*). Referente a los genes de respuesta cabe destacar glucanasas, quitinasas, mirosinasas, osmotinas y serín proteasas de la familia de las subtilisinas.

En la categoría de estrés oxidativo, mencionar genes que codifican peroxidases, oxidorreductasas, glutathione transferasas y un elevado número de genes de la familia citocromo P450. Las citocromo P450 monooxigenasas son un grupo de proteínas que catalizan reacciones oxidativas (Donaldson y Luster, 1991; Bolwell *et al.*, 1994; Schuler, 1996; Chapple, 1998). Cuatro de los genes de esta familia se encuentran sobreexpresados en *csb3* (*CYP94B3*, *CYP76C2*, *CYP81D8* y *CYP710A1*) y se inducen tanto por estrés biótico como abiótico, según se describe en Narusaka *et al.*, 2004.

En lo referente a factores de transcripción resalta la abundancia de los factores de tipo WRKY. Las proteínas WRKY son factores transcripcionales específicos de plantas que se unen a elementos W (TTGACCC/T) presentes en multitud de promotores inducibles por patógenos (Eulgem *et al.*, 2000).

En la categoría de lípidos merece la pena resaltar la abundancia de genes que codifican proteínas tipo LTPs (Lipid Transfer Proteins). Estas proteínas son de 9 kDa y presentan actividad antimicrobiana.

En la Tabla 3 se muestran algunos de los genes reprimidos en plantas *csb3*. El número de genes reprimidos es inferior a los genes sobreexpresados. Destaca la abundancia de genes relacionados con el fotosistema I y II. Las plantas expuestas a estrés ambiental suelen reducir el metabolismo fotosintético, aumentan la fotorreducción de O<sub>2</sub>, la fotorrespiración y disipan la excitación



energética en el fotosistema II (Asada, 1999; Ort y Baker, 2002). Aunque la finalidad de estos procesos es protectora, los mismos conducen a la acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) tales como ión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La represión de los genes relacionados con el fotosistema I, y especialmente con el fotosistema II, podría ser una estrategia para contrarrestar el estrés oxidativo presente en las plantas *csb3*, disminuyendo la acumulación de ROS. Así pues, en el doble mutante *lsd1 cao1* se reduce la formación de lesiones con respecto al parental *lsd1* (Mateo *et al.*, 2004). El mutante *cao1* (*chlorophyll a/b binding harvesting-organelle specific*) muestra una reducción en el tamaño de la antena del fotosistema II que disminuye la absorción de energía lumínica (Klimyuk *et al.*, 1999).

**A) Estrés biótico**

ID	csb3/wt	Descripción	AGI
254889_at	7	osmotin-like protein (OSM34)	At4g11650
264514_at	6,3	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) family	At1g09500
260116_at	4,1	AGI1	At1g33960
246406_at	4,1	disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	At1g57650
258377_at	4	cyclic nucleotide-binding transporter 2 (CNBT2/CNGC19)	At3g17690
266385_at	3,9	pathogenesis-related protein 1 (PR-1)	At2g14610
259893_at	3,9	disease resistance protein family (LRR)	At1g71390
260015_at	3,6	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	At1g67980
259382_s_at	3,3	myrosinase binding protein, putative	At3g16430
258805_at	3,2	putative beta-1,3-glucanase	At3g04010
256243_at	2,8	glycosyl hydrolase family 19 (basic endochitinase)	At3g12500
262177_at	2,7	isochorismate synthase 1 (isochorismate mutase) (ICS1)	At1g74710
256431_s_at	2,7	disease resistance protein family (LRR)	At3g11010
246405_at	2,7	disease resistance protein (TIR class), putative	At1g57630
266119_at	2,6	plant defensin protein, putative (PDF2.2)	At2g02100
267546_at	2,4	disease resistance protein family	At2g32680
252373_at	2,4	disease resistance protein (EDS1)	At3g48090
252060_at	2,4	phytoalexin-deficient 4 protein (pad4)	At3g52430
261135_at	2,3	plant defensin protein, putative (PDF1.4)	At1g19610
254741_s_at	2,2	disease resistance protein family	At4g13900
252921_at	2,2	enhanced disease susceptibility 5 (Eds5)	At4g39030
251673_at	2,1	glycosyl hydrolase family 17 (beta-1,3-glucanase bg3)	At3g57240
261240_at	2	subtilisin-like serine protease	At1g32940
261242_at	2	subtilisin-like serine protease	At1g32960
251895_at	2	glycosyl hydrolase family 19 (class IV chitinase)	At3g54420

**B) Estrés oxidativo**

ID	csb3/wt	Descripción	AGI
257185_at	5,2	ABC transporter, putative similar to AtMRP4	At3g13100
262482_at	5	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	At1g17020
254975_at	4,9	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	At4g10500
267565_at	4,9	cytochrome p450 71A12	At2g30750
252368_at	4,7	cytochrome P450 family	At3g48520
256647_at	4,5	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	At3g13610
259429_at	4,5	cytochrome P450, putative	At1g01600
265067_at	3,9	glutaredoxin protein family	At1g03850
267559_at	3,8	cytochrome p450 family	At2g45570
247326_at	3,8	peroxidase, putative	At5g64110
246984_at	3,6	cytochrome P450 family	At5g67310
266778_at	3,5	cytochrome p450 family	At2g29090
255110_at	3,4	peroxidase, putative	At4g08770
265471_at	3,1	peroxidase, putative (ATP2a)	At2g37130
257952_at	3	peroxidase, putative	At3g21770
253505_at	2,9	cytochrome p450 family	At4g31970
253046_at	2,8	cytochrome P450, putative	At4g37370
266267_at	2,8	glutathione transferase, putative	At2g29460
267053_s_at	2,7	peroxidase, putative	At2g38390
260225_at	2,4	glutathione transferase, putative	At1g74590
257623_at	2,4	cytochrome P450 71B23	At3g26210
266270_at	2,3	glutathione transferase, putative	At2g29470
259040_at	2,3	glutathione transferase, putative	At3g09270
267567_at	2,3	cytochrome P450 71A13	At2g30770
266995_at	2,3	cytochrome P450 family	At2g34500
256803_at	2,2	cytochrome P450 family	At3g20960
249754_at	2,2	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	At5g24530
253099_s_at	2,1	peroxidase, putative	At4g37530
261986_s_at	2	cytochrome P450 monooxygenase	At1g33720

C) Factores de transcripción

ID	csb3 /wt	Descripción	AGI
245976_at	5,8	WRKY family transcription factor	At5g13080
257919_at	4,4	myb family transcription factor(MYB15)	At3g23250
249770_at	3,8	WRKY family transcription factor	At5g24110
249890_at	3,6	WRKY family transcription factor	At5g22570
251950_at	3,5	zinc finger - like protein	At3g53600
263963_at	3,3	DNA-binding protein, putative	At2g36080
263963_at	3,3	putative DNA-binding protein RAV2	At2g36080
255149_at	3,2	KNAT1 homeobox-related protein	At4g08150
250666_at	2,9	WRKY family transcription factor	At5g07100
256576_at	2,9	zinc finger protein (PMZ) -related	At3g28210
258975_at	2,8	WRKY family transcription factor	At3g01970
251430_at	2,8	DNA-binding protein family	At3g60110
250287_at	2,4	AP2 domain transcription factor family	At5g13330
247655_at	2,5	zinc finger protein Zat12	At5g59820
267385_at	2,4	CHP-rich zinc finger protein, putative	At2g44380
260166_at	2,4	homeodomain protein GLABRA2 (GL2)	At1g79840
254853_at	2,4	DNA-binding protein -related	At4g12080
257382_at	2,3	WRKY family transcription factor	At2g40750
266052_at	2,3	WRKY family transcription factor	At2g40740
263536_at	2,1	WRKY family transcription factor	At2g25000
263536_at	2,1	WRKY family transcription factor	At2g25000
264616_at	2,1	CHP-rich zinc finger protein, putative	At2g17740
263783_at	2	WRKY family transcription factor	At2g46400

D) Quinasas y fosfatasa

ID	csb3 /wt	Descripción	AGI
246373_at	4,2	leucine rich repeat protein kinase, putative	At1g51860
252511_at	3,7	putative protein serine/threonine-specific protein kinase, lrpk	At3g46280
255340_at	3,6	receptor-related protein kinase	At4g04490
255341_at	3,6	receptor-related protein kinase	At4g04500
264756_at	3,3	receptor protein kinase (IRK1) -related	At1g61370
259559_at	3,3	wall-associated kinase 3	At1g21240
254252_at	3,3	receptor-like protein kinase, putative	At4g23310
254271_at	3	serine/threonine kinase - like protein	At4g23150
254265_s_at	2,9	serine threonine kinase - like protein	At4g23140
254869_at	2,8	protein kinase family	At4g11890
246368_at	2,5	leucine rich repeat protein kinase, putative	At1g51890
259921_at	2,4	protein kinase, putative	At1g72540
247618_at	2,4	receptor like protein kinase	At5g60280
257478_at	2,3	WAK-like kinase (WLK)	At1g16130
249983_at	2,3	putative protein S-receptor kinase PK3 precursor, maize	At5g18470
261339_at	2,2	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	At1g35710
248060_at	2,2	protein kinase family	At5g55560
254253_at	2,2	serine threonine kinase - like protein	At4g23320
264223_s_at	2,1	receptor kinase -related	At1g67520
262671_at	2,1	calcium-dependent protein kinase, putative (CDPK)	At1g76040
262508_at	2,1	S-locus protein kinase family	At1g11300

E) Lípidos

ID	csb3 /wt	Descripción	AGI
253660_at	4,5	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At4g20140
265117_at	4,1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	At1g62500
247713_at	4	hypothetical protein	At5g59330
258675_at	3,9	lipid transfer protein 6 (ltp6)	At3g08770
262254_at	3,7	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At1g53920
266415_at	3,4	nonspecific lipid transfer protein 2 (LTP 2)	At2g38530
246687_at	2,9	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At5g33370
251065_at	2,7	lipid transfer protein, putative	At5g01870
248062_at	2,6	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	At5g55450
258589_at	2,6	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At3g04290
256933_at	2,5	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	At5g22600
256169_at	2,5	leucine rich repeat protein kinase, putative	At1g51800
254327_at	2,4	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	At4g22490
254314_at	2,4	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	At4g22470
248912_at	2,4	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At5g45670
259391_s_at	2,4	fatty acid desaturase family protein	At1g06350
252977_at	2,2	Phospholipase like protein	At4g38560
254818_at	2	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	At4g12470
262630_at	2	phospholipid/glycerol acyltransferase family	At1g06520
252403_at	2	lipase, putative	At3g48080

**F) Hormonas**

ID	<i>csb3</i> /wt	Descripción	AGI
251743_at	4	Yippee-related protein	At3g55890
245108_at	3,8	cytokinin oxidase family	At2g41510
260783_at	3,7	ethylene response factor, putative	At1g06160
245136_at	3,4	auxin-induced (indole-3-acetic acid induced) protein-related	At2g45210
250286_at	3,2	auxin-responsive - like protein	At5g13320
259439_at	3	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 (ACC synthase 2)	At1g01480
248163_at	2,8	auxin-responsive-related protein	At5g54510
255479_at	2,3	late embryogenesis abundant protein family	At4g02380
267461_at	2,2	auxin-regulated protein	At2g33830
257690_at	2	auxin-induced (indole-3-acetic acid induced) protein family	At3g12830
262099_s_at	2	auxin-regulated protein GH3 -related	At1g59500

**G) Degradación de proteínas y proteasas**

ID	<i>csb3</i> /wt	Descripción	AGI
248918_at	4,4	senescence-specific cysteine protease SAG12	At5g45890
260101_at	3,6	trypsin inhibitor -related	At1g73260
259502_at	2,5	Kelch repeat containing F-box protein family	At1g15670
245736_at	2,4	Dr4(protease inhibitor)	At1g73330
261927_at	2,4	RING-H2 zinc finger protein ATL5 -related	At1g22500
266167_at	2,2	(YLS5) proteaseI (pfp1)-like protein, complete cds	At2g38860
248092_at	2	ubiquitin family	At5g55170

**H) Otros de posible interés**

ID	<i>csb3</i> /wt	Descripción	AGI
263228_at	7,9	FAD-linked oxidoreductase family	At1g30700
257185_at	5,2	ABC transporter family protein	At3g13100
263404_s_at	3,9	MATE efflux protein family	At2g04100
261020_at	3,6	FAD-linked oxidoreductase family	At1g26390
263216_s_at	3,3	FAD-linked oxidoreductase family	At1g30720
261005_at	3,3	FAD-linked oxidoreductase family	At1g26420
256319_at	3,3	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	At1g35910
261021_at	3,1	FAD-linked oxidoreductase family	At1g26380
261763_at	2,9	ABC transporter family protein	At1g15520
245523_at	2,9	drought-induced protein (Di21)	At4g15910
266988_at	2,6	jacalin lectin family	At2g39310
259384_at	2,6	jacalin lectin family	At3g16450
264434_at	2,5	ankyrin repeat protein family	At1g10340
259327_at	2,5	jacalin lectin family	At3g16460
263153_s_at	2,5	myosinase-associated protein, putative	At1g54010
254447_at	2,2	FAD-linked oxidoreductase family	At4g20860
245293_at	2,2	heat shock protein hsp70, putative	At4g16660
257315_at	2,1	osmotic stress-induced proline dehydrogenase (pro1)	At3g30775
258984_at	2,1	DnaJ protein family	At3g08970
250994_at	2	heat shock protein hsc70-2 (hsc70.2) (hsp70-2)	At5g02490

**Tabla 2: Relación de genes de expresión aumentada en plantas *csb3* con respecto a las plantas wt.**

**A) Fotosistema**

245047_at	-5,7	PSII 32 KDa protein	psbA
245007_at	-5,1	PSI P700 apoprotein A1	psaA
245002_at	-3,9	PSII D2 protein	psbD
245006_at	-3,5	PSI P700 apoprotein A2	psaB
244975_at	-3,5	PSII 10KDa phosphoprotein	psbH
245017_at	-3,3	PSI I protein	psaI
245011_at	-2,9	photosystem II G protein	psbG
244972_at	-2,9	PSII 47KDa protein	psbB
244967_at	-2,3	PSI J protein	psaJ
244974_at	-2,2	PSII low MW protein	psbN

**B) Transcripción**

251045_s_at	-6,2	CHP-rich zinc finger protein, putative	At5g02360
265878_at	-3,6	putative SUPERMAN-like C2H2 zinc finger transcription factor	At2g42410
262211_at	-3,5	AP2 domain transcription factor, putative	At1g74930
251586_at	-3,3	zinc finger-like protein several zinc finger proteins - Arabidopsis thaliana	At3g58070
261059_at	-2,5	AP2 domain transcription factor, putative	At1g01250
248246_at	-2,3	putative protein contains similarity to MYB family transcription factor	At5g53200
250379_at	-2,1	transcription factor like protein transcription factor TINY, Arabidopsis thaliana, PIR:T01076	At5g11590

**C) Hormonas**

264346_at	-3,4	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACC oxidase), putative	At1g12010
249052_at	-3,2	antifungal protein-like (PDF1.2)	At5g44420
263174_at	-2,8	Kelch repeats protein family inducible by JA	At1g54040
257365_x_at	-2,6	putative antifungal protein	At2g26020
261150_at	-2,6	S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At1g19640
259783_at	-2,4	auxin-induced (indole-3-acetic acid induced) protein, putative	At1g29510
254323_at	-2,4	auxin-induced (indole-3-acetic acid induced) protein family	At4g22620
248676_at	-2,2	male sterility MS5 family	At5g48850
259773_at	-2,1	auxin-induced protein, putative similar to SP:P33083 from [Glycine max]	At1g29500
262212_at	-2	response regulator 7 -related	At1g74890
260773_at	-2	gibberellin 2-oxidase (GA2-oxidase) (ga2ox1)	At1g78440

**D) Lipasas e hidrolasas**

257441_at	-3,6	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At2g04020
247814_at	-2,7	polyneuridine aldehyde esterase-like	At5g58310
253946_at	-2,1	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At4g26790
252363_at	-2	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	At3g48460

**Tabla 3: Relación de genes de expresión reprimida en plantas *csb3* con respecto a las plantas wt.**

#### **IV.2.5. Cartografiado y clonaje posicional del gen *CSB3*.**

Para definir la posición cromosómica y la posterior clonación del gen *CSB3*, se procedió a la generación de una población recombinante mediante el cruzamiento entre las plantas *csb3* (fijada la mutación en el ecotipo Columbia (Col-0)) y plantas de ecotipo Lansberg erecta (Ler). El fenotipo *csb3* fue seleccionado en la población F<sub>2</sub>. En esta población F<sub>2</sub> se estudió la segregación de la mutación *csb3* con respecto a marcadores moleculares basados en técnicas de PCR. Para la aproximación inicial de localización cromosómica se analizaron 76 cromosomas con marcadores moleculares SSLPs (“Single SequenLength Polymorphism”) de los cinco grupos de ligamiento y uniformemente distribuidos en cada uno de ellos (Konieczny y Ausubel, 1993). El marcador CIW10 del cromosoma 5 cosegregaba con el fenotipo *csb3* (Figura 10A). Un análisis más detallado de la zona identificada permitió establecer la localización de la mutación *csb3* en una región comprendida entre los marcadores nga129 y MBK-5 que delimitan una distancia genética aproximada de 15 cM. Para acotar esta distancia se diseñaron SSLPs utilizando la base de datos de Cereon Genomics ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Tras el escrutinio de 1496 cromosomas, se determinó que el gen *CSB3* se ubicaba entre dos clones BAC, denominados MUF9 y MUP24, que comprendían 21 ORFs (Figura 10B). La secuenciación de la región codificante para cada uno de estos genes permitió la identificación de un sólo cambio en el gen *At5g60600*. Este gen contiene 20 exones y la mutación *csb3* (a partir de aquí se denominará *csb3-1*) da lugar a una transición de G por A en la región codificante correspondiente al penúltimo exón. Ello provoca una sustitución de Glicina por Ácido Aspártico en la secuencia de la proteína (Figura 10C). La estrategia general de mapeo queda reflejada en la Figura 10.

El gen *CSB3* es de copia única y codifica la enzima de localización cloroplástica 1-hidroxi-2-metil-2-butenil 4-difosfato [HMBPP] sintasa (HDS). La enzima HDS cataliza la formación de HMBPP a partir de 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-CPP) (Kollas *et al.*, 2002) (Figura 11). Dicha enzima controla uno de los pasos finales conducentes a la síntesis de isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) por la ruta de síntesis de isoprenoides independiente de mevalonato 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). La ruta MEP acontece en el cloroplasto (Figura 11). Tanto la ruta MEP como la ruta citosólica dependiente de mevalonato (MVA) sintetizan los precursores de los isoprenoides. La enzima HDS está conservada en microorganismos y se le designa como GcpE (Kollas *et al.*, 2002). La enzima HDS se diferencia de la enzima microbiana GcpE por la presencia de un dominio adicional interno. Para este dominio extra se han propuesto propiedades reguladoras que son desconocidas hasta la fecha (Querol *et al.*, 2002). Tanto la enzima microbiana como la de plantas muestran un motivo 4Fe-4S de alta conservación de secuencia en la región próxima al C-terminal (aminoácidos 640-684, Figura 10E). La identificación de mutaciones letales en *Escherichia coli* localizadas en esta región o muy próximas a ella apuntan al papel clave de este dominio para la función de la enzima GcpE (Sauret-Güeto *et al.*, 2003). La mutación *csb3* identificada se encuentra muy próxima a este motivo (Figura 10). Muy posiblemente esta mutación introduce una alteración estructural que desestabilizaría la correcta función del dominio 4Fe-4S.

Adicionalmente, se identificó un mutante de inserción de T-DNA (SALK 017595; <http://signal.salk.edu>) en el 16° exón del gen *CSB3*, al cual designamos como *csb3-2* (Figura 10C). Las plantas heterocigotas para dicha inserción segregan plántulas albinas que resultan letales (Figura 10D). Igualmente el mutante *clb4* (*chloroplast biogenesis*; Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004), portador de una mutación inducida por EMS en el locus *CSB3*, consiste en un cambio que genera un codón de parada prematuro en el exón 9 (Figura 10C). Este alelo es

## Resultados y Discusión

designado en el presente estudio como *csb3-3*. Del mismo modo que el mutante *csb3-2*, las plántulas *csb3-3* presentan un fenotipo de albinismo y letalidad (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004). Los mutantes de T-DNA que interrumpen ORFs de otros genes de la ruta MEP poseen el mismo fenotipo (Budziszewski *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que la ruta MEP juega un papel esencial en la planta y que el alelo *csb3-1* identificado en el presente trabajo es una pérdida parcial de función.

### **Figura 10: Clonación por posición en mapa del gen *CSB3*.**

A) Región del cromosoma 5 de aproximadamente 0.8 Mb indicando los BACs comprendidos en esta región y los marcadores SSLPs localizados en los BACs MNC17 y MCI utilizados para el escrutinio de recombinantes en 1496 cromosomas.

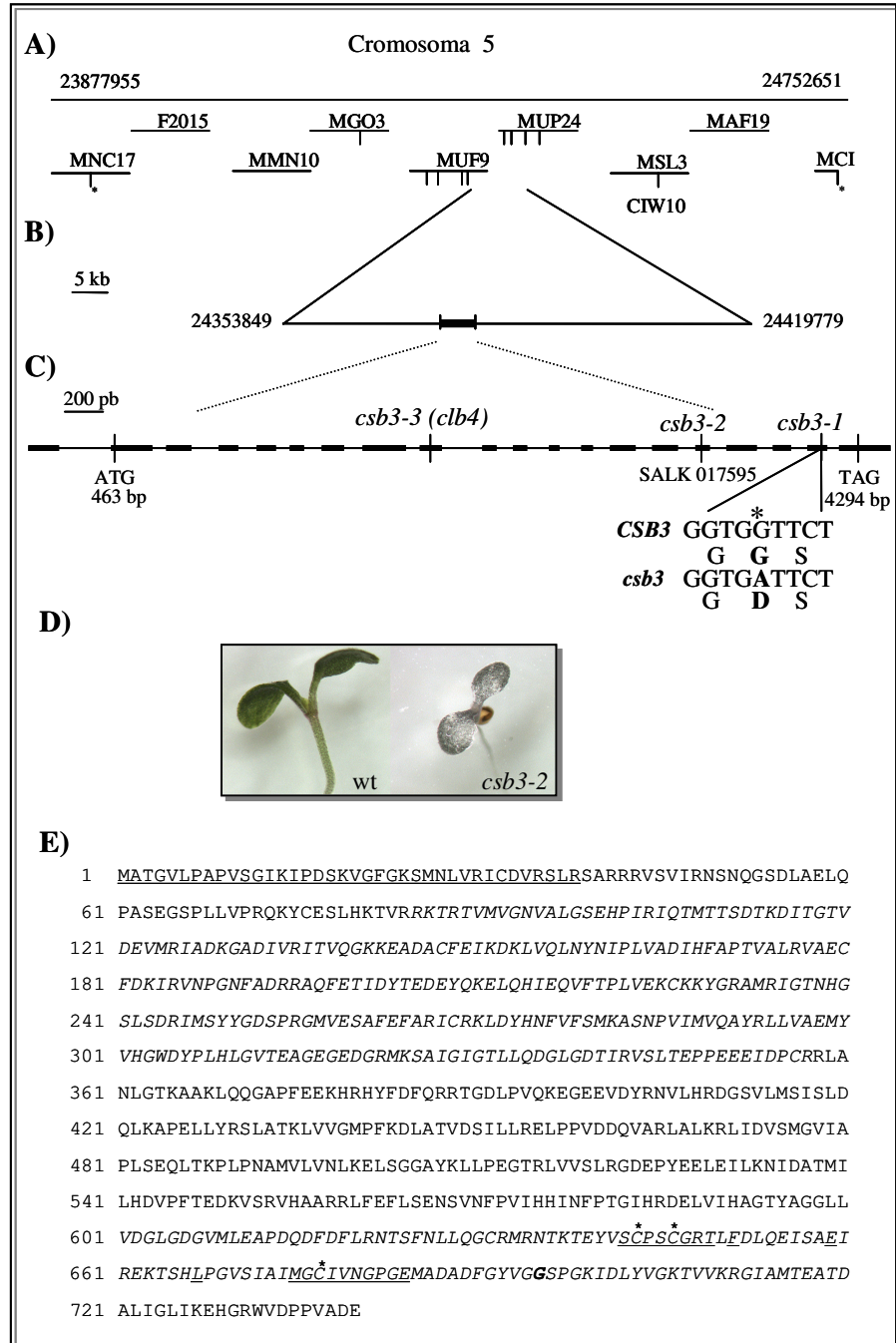
B) Localización del gen *CSB3* en la región de 66 kb comprendida entre los BACs MUF9 y MUP24.

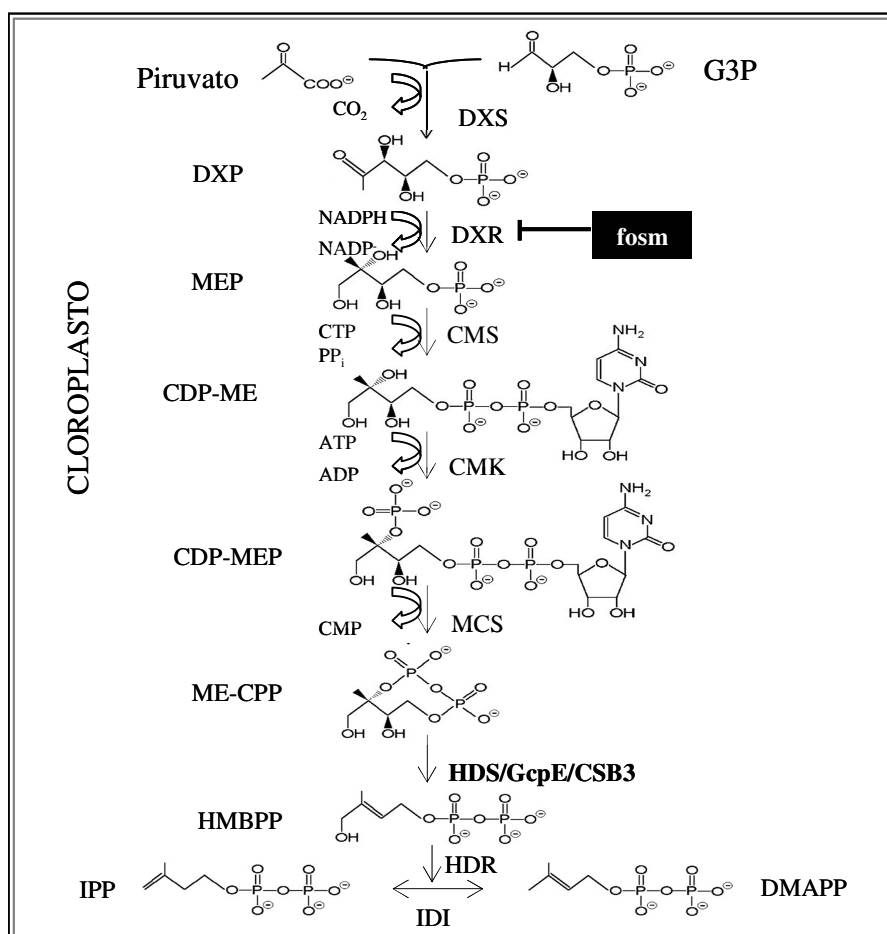
C) Estructura de exones e intrones del gen *CSB3*. Las regiones codificantes se representan con una línea gruesa. Se indica la ubicación del cambio en el mutante *csb3-1* y la sustitución que provoca en la secuencia de la proteína. También se refleja la ubicación de los otros alelos descritos para el gen *CSB3*.

D) Planta wt y planta albina *csb3-2* (SALK 017595).

E) Análisis de secuencia de la proteína GcpE. En el extremo N-terminal, se indica mediante subrayado la secuencia predicha para la localización cloroplástica (programa ChloroP). En cursiva, las regiones homólogas entre la enzima HDS de plantas y la GcpE de microorganismos. El dominio comprendido entre ambas regiones es específico de HDS y no está presente en la enzima GcpE. En el extremo C-terminal, los residuos de cisteína altamente conservados entre especies se han resaltado con un asterisco, y mediante subrayado se indican los residuos conservados del motivo [4Fe-4S] (Sauret-Güeto *et al.*, 2000). El residuo de glicina substituido por aspártico en el mutante *csb3-1* se muestra en negrita en la posición 695 muy próxima a la secuencia que participa en la coordinación [4Fe-4S].





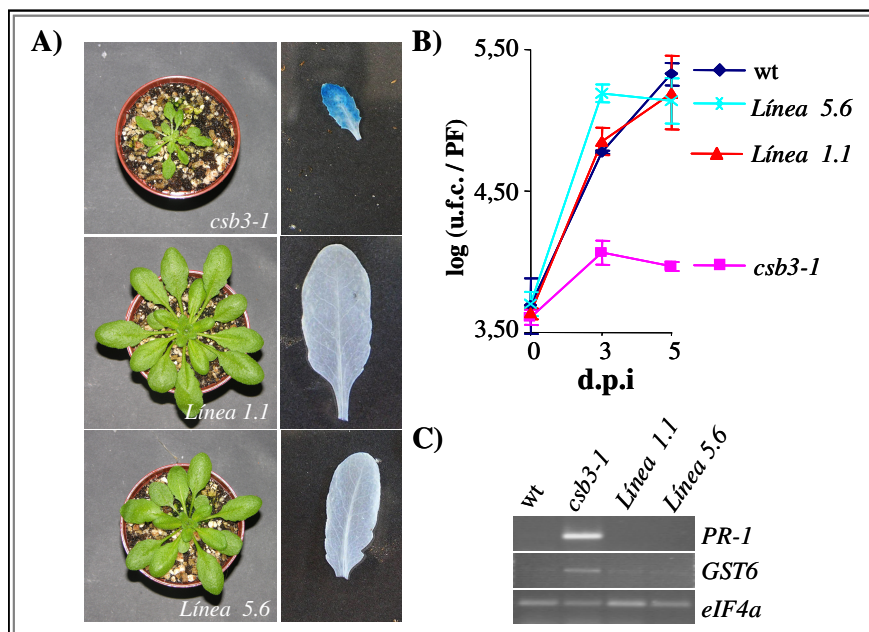


**Figura 11: Ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP).**

Las abreviaturas de las enzimas que catalizan cada paso en la ruta se muestran a la derecha de la figura en el siguiente orden: 1-desoxi-D-xilosa-5 fosfato sintasa (DXS); 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato sintasa (DXR); 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa (CMS); 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato quinasa (CMK) ; 2C-metil-D-eritritol 2,4-difosfato sintasa (MCS); 2C-metil D-eritritol 2,4-ciclodifosfato reductasa (HDS); 1-hidroxi-2-metil butenil 4-difosfato reductasa (HDR); isopentenil difosfato isomerasa (IDI). Se indica el paso de la ruta inhibido específicamente por la fosmidomicina.

#### **IV.2.6. Complementación genética de la mutación *csb3-1*.**

Para confirmar que el gen *At5g60600* corresponde al gen *CSB3*, se procedió a la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* de plantas *csb3-1* con el cDNA correspondiente al gen *At5g60600* bajo el control del promotor 35S CaMV (*35S-At5g60600*). Se generaron varias líneas transgénicas y se estudiaron en profundidad 5 de ellas. Todas las líneas transgénicas analizadas habían perdido el fenotipo morfológico característico y atribuible a la mutación *csb3-1* siendo indistinguibles de las plantas wt (Figura 12A). Otra característica ligada a la mutación *csb3-1*, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, es la expresión constitutiva del gen *P69C-GUS* y genes de defensa dependientes de SA como *PR-1* y *GST6*, que quedó revertida en las plantas complementadas (Figura 12A y 12C). Las plantas complementadas también dejaron de exhibir la resistencia característica a *Pst.* DC3000 de las plantas *csb3-1* alcanzando un crecimiento de la bacteria similar al observado en plantas wt (Figura 12C). Todas estas evidencias indican que *At5g60600* es por tanto equivalente a *CSB3* (Figura 12).



**Figura 12: Complementación genética de la mutación *csb3-1*.**

Caracterización fenotípica y molecular de las plantas *csb3-1* transgénicas y homocigotas para la construcción *35S-CSB3*.

A) Aspecto morfológico de plantas *csb3-1* no transformadas y de dos líneas transgénicas independientes. Obsérvese la reversión fenotípica a plantas wt en las dos líneas transgénicas *35S-CSB3 csb3-1 1.1* (Línea 1.1) y *35S-CSB3 csb3-1 5.6* (Línea 5.6). En el mismo panel se muestra la tinción histoquímica para la detección de la presencia de actividad GUS en estas mismas plantas.

C) Estudio comparativo del crecimiento de *Pst. DC3000* en las dos líneas *csb3-1* portadoras de la construcción *35S-CSB3*, en plantas wt y en plantas *csb3-1* no transformadas.

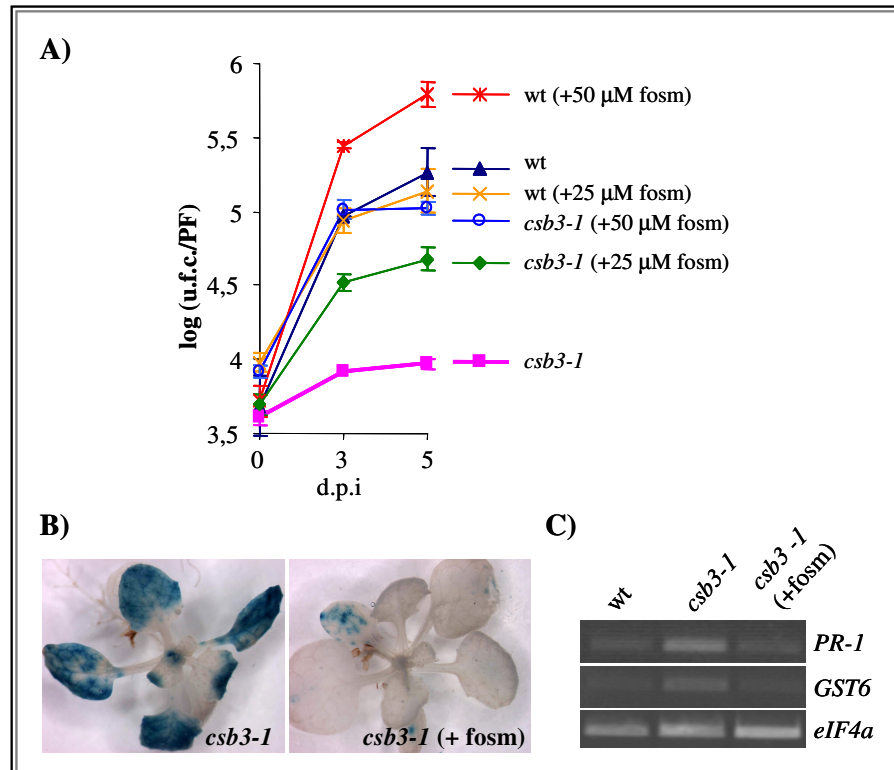
D) Análisis RT-PCR de la expresión de los genes *PR-1* y *GST6* en plantas wt, *csb3-1* y las líneas 1.1 y 5.6. Las plantas transgénicas no expresan los genes marcadores dependientes del SA. El gel inferior muestra los productos RT-PCR para el gen de mantenimiento celular *eIF4 $\alpha$*  utilizado aquí como control de carga de las muestras analizadas.

#### **IV.2.7. Complementación farmacológica de la mutación *csb3-1*.**

Las características ligadas a la mutación *csb3-1* podrían deberse a un descenso en los niveles del producto final de la ruta MEP (IPP) como consecuencia de una menor actividad de la enzima HDS en las plantas *csb3-1* o por el contrario, a la acumulación del sustrato ME-CPP o cualquiera de los intermediarios anteriores. Cualquiera de estas dos posibilidades podría ser la causa de la activación de la ruta de señalización dependiente de SA y por tanto del fenotipo de resistencia a *Pst.* DC3000 en las plantas *csb3-1*. La fosmidomicina (fosm) es un inhibidor de la enzima DXR que interviene en el segundo paso de síntesis de esta ruta y anterior al afectado por la mutación *csb3-1* (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). La utilización de la fosmidomicina podría ser una herramienta útil para dirimir estas dos posibilidades (Figura 11). Con el fin de evaluar el impacto de la fosmidomicina en el fenotipo de resistencia de las plantas *csb3-1*, pero evitando provocar otros efectos como el albinismo o retraso en el crecimiento, se aplicaron tratamientos cortos y a dosis bajas. La aplicación de fosmidomicina consistió en pulverizar plantas wt y *csb3-1* de aproximadamente dos semanas a las 48 h y 24 h antes de la inoculación con *Pst.* DC3000 y a las concentraciones 25 y 50  $\mu\text{M}$  de fosmidomicina. El resultado se muestra en la Figura 13. En las plantas wt no se observa ningún efecto de la fosmidomicina en el crecimiento de la bacteria con respecto a la curva control (sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}$  e inoculadas con *Pst.* DC3000) cuando la concentración de fosmidomicina utilizada es de 25  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en las plantas wt tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de fosmidomicina se registra un aumento de casi 5 veces en el crecimiento de la bacteria (Figura 13A). La utilización de concentraciones más altas de fosmidomicina provoca la aparición de clorosis y retraso en el crecimiento en las plantas tratadas pudiendo enmascarar el efecto del inhibidor en el crecimiento de la bacteria. Estos tratamientos tampoco indujeron la expresión de *P69C-GUS* ni tampoco de

## Resultados y Discusión

genes de defensa *PR-1* y *GST6* (datos no mostrados). No obstante, comprobamos que en las plantas *csb3-1*, se observa una supresión del fenotipo de resistencia a *Pst.* DC3000 tanto a la concentración de 25  $\mu$ M como 50  $\mu$ M de fosmidomicina (Figura 13A). A la concentración más alta utilizada, el crecimiento de la bacteria en plantas *csb3-1* es similar al registrado para las plantas wt control (sólo tratadas con H<sub>2</sub>O e inoculadas con *Pst.* DC3000). A la concentración de 25  $\mu$ M el crecimiento de la bacteria registrado en las plantas *csb3-1* no alcanza los valores de las plantas wt no tratadas aunque son claramente superiores al de las plantas *csb3-1* no tratadas. Estos resultados indican un efecto de la dosis utilizada en la reversión de la resistencia. El mismo tratamiento de fosmidomicina a la concentración de 25  $\mu$ M es suficiente para revertir la expresión del transgén *P69C-GUS* y de los genes *PR-1* y *GST6* en las plantas *csb3-1* (Figura 13C-D). La aplicación de fosmidomicina carece de efecto sobre la inducción de la expresión del gen *P69C-GUS* y genes dependientes de SA como *PR-1* y *GST6* (datos no mostrados) y no disminuye el crecimiento de la bacteria en plantas wt, por lo tanto no parece factible que una bajada en los niveles de IPP sean la causa de la resistencia observada en plantas *csb3-1*. La aplicación de fosmidomicina en las plantas *csb3-1* complementa la resistencia a *Pst.* DC3000 así como el resto de las características ligadas a la mutación *csb3-1*. Además, la aplicación de fosmidomicina incrementa la susceptibilidad de las plantas wt a *Pst.* DC3000. Así pues, se concluye que la acumulación del sustrato de la enzima HDS (ME-CPP) o de los intermediarios anteriores implica la activación de la ruta de señalización dependiente de SA y por tanto de su resistencia a *Pst.* DC3000 en plantas *csb3-1*.



**Figura 13: Complementación farmacológica de la mutación *csb3-1*.**

A) Plántulas wt y *csb3-1* fueron tratadas 48 y 24 h antes de la inoculación con *Pst.* DC3000 con una solución a una concentración de 25 y 50 μM de fosmidomicina (+ fosm). Las plántulas control fueron tratadas de forma similar sólo con la solución tampón. El crecimiento de la bacteria fue registrado a los tiempos 0, 3 y 5 días tras la inoculación (d.p.i) con *Pst.* DC3000.

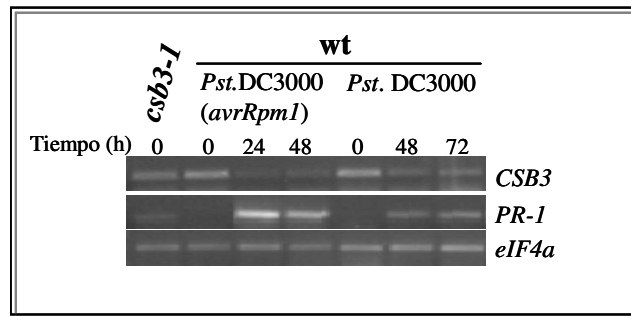
B) Efecto del tratamiento con fosmidomicina (25 μM, condiciones como se describen en A) sobre la expresión del gen *P69C-GUS* en plántulas *csb3-1* (derecha) comparado con plántulas *csb3-1* tratadas sólo con la solución tampón (izquierda).

C) Efecto del tratamiento con fosmidomicina (25 μM, condiciones como se describen en A) sobre la expresión de genes marcadores de la ruta de señalización dependiente de SA en plántulas *csb3-1* comparadas con plántulas *csb3-1* tratadas con solución tampón.

#### **IV.2.8. Expresión del gen *CSB3* en la interacción con *Pst.* DC3000.**

La expresión del gen *CSB3* en respuesta a la infección con *Pst.* DC3000 se analizó en hojas procedentes de plantas wt a diferentes tiempos tras la inoculación tanto con bacteria avirulenta (*Pst.* DC3000 (*avrRpm1*)) como con el aislado virulento de la misma (*Pst.* DC3000). Por tanto se analizó la expresión del gen *CSB3* en el contexto patogénico incompatible y compatible. Dado que los niveles de mRNA de *CSB3* observados por *Northern blot* eran bajos se procedió a su análisis mediante RT-PCR. El nivel de acumulación de mRNA de *CSB3* en tejido inoculado con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*), donde acontece la respuesta HR, es marcadamente inferior comparado con los niveles presentes en las plantas sanas. Esta disminución en el nivel de expresión del gen *CSB3* se observa a las 24 h y se mantiene tras 48 h después de la inoculación (Figura 14). Esta reducción de la expresión del gen *CSB3* se correlaciona en tiempo y espacio con un incremento en la expresión de genes marcadores inducibles por SA (i.e. *PR-1*). Resultados similares en cuanto a la expresión de *CSB3* se obtuvieron con la interacción compatible, aunque la represión observada no era tan acusada como la detectada para la interacción incompatible. Asimismo, la expresión del gen *CSB3* en plantas sanas *csb3-1* revela una reducción en los niveles de mRNA comparado con los niveles de mRNA presentes en plantas sanas wt. La ligera represión en la expresión de *CSB3* tras la infección patogénica, así como en el propio mutante *csb3-1*, su inversa correlación con la expresión inducible de *PR-1* y la naturaleza recesiva de la mutación *csb3-1*, parecen indicar que *CSB3* es un regulador negativo de la resistencia. Esta interpretación es compatible con el modelo planteado en el apartado anterior (IV.2.8), según el cual, una disminución en la expresión de este gen provocaría un descenso en la actividad enzimática y por consiguiente, un aumento de ME-CPP o de los productos intermediarios anteriores que serían responsables de la activación de la ruta de señalización dependiente de SA en plantas wt.





**Figura 14: Expresión del gen *CSB3* en un contexto patogénico.**

Análisis RT-PCR de los genes *CSB3* y *PR-1* en plantas wt inoculadas con *Pst. DC3000* y *Pst. DC3000 (avrRpm1)* a diferentes tiempos tras la inoculación. Los niveles de expresión de ambos genes fueron analizados en plantas *csb3-1* sanas como se muestra a la izquierda del gel. El panel inferior muestra los productos RT-PCR del gen de mantenimiento celular *eIF4α* utilizado aquí como control de carga. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

### IV.3. Aislamiento y caracterización de mutantes supresores de la mutación *csb3-1*.

La identificación de mutantes supresores del fenotipo conferido por una mutación de interés es una estrategia a utilizar cuando se quieren identificar genes que participan en la ruta de señalización materia de estudio. Un buen ejemplo de ello ha sido la identificación de los genes *SN11* (Li *et al.*, 1999), *SNC1* (Li *et al.*, 2001), *SSI2* (Kachroo *et al.*, 2001) y *SON1* (Kim y Delaney, 2002), que participan en la regulación de la señalización dependiente de NPR1. A su vez, se ha abordado la búsqueda de mutantes supresores de los supresores de *npr1*. De este modo, se ha obtenido el mutante *sfd* afectado en la respuesta SAR (Nandi *et al.*, 2004) y el mutante *mos3* (Zhang *et al.*, 2005) necesario en la respuesta defensiva basal. En nuestro caso, y con el propósito de identificar genes implicados en la resistencia a patógenos biotrofos mediada por el gen *CSB3* se emprendió la búsqueda de mutantes supresores del fenotipo conferido por la mutación *csb3-1*. El protocolo seguido para el escrutinio de mutantes fue similar al detallado en el apartado IV.1 y los criterios utilizados para la identificación de mutantes fueron: reversión del fenotipo característico del mutante *csb3-1* y supresión de la expresión constitutiva de *P69C-GUS*. El criterio de reversión del fenotipo morfológico permitió una sencilla y rápida primera selección de 35 individuos revertientes. Además, a estos 35 individuos se les impuso que la reversión morfológica fuera acompañada de la supresión de la expresión del gen marcador *GUS*. Los resultados de estos ensayos de actividad *GUS* permitieron descartar 23 de los 35 mutantes aislados en la 1ª ronda de selección. De los doce mutantes seleccionados, uno de ellos fue descartado al no ser portador de la mutación *csb3-1*. A estos 11 supresores del fenotipo *csb3-1* los denominamos *scs* (*suppressor of c**sb**3-1*). Al ser la resistencia a patógenos biotrofos la característica más relevante de las plantas

*csb3-1* decidimos estudiar los mutantes *scs* en función de la resistencia a *Pst.* DC3000. En función de dicha respuesta de los supresores *scs* a *Pst.* DC3000 se establecieron tres categorías de mutantes *scs*: a) mutantes *scs* que mantienen inalterada la resistencia respecto a la línea parental *csb3-1*; b) mutantes *scs* que revierten la resistencia de *csb3-1* a niveles comparables a los detectados para plantas wt; c) mutantes *scs* que muestran hipersusceptibilidad a *Pst.* DC3000 comparable a mutantes como *dth9* y *npr1*.

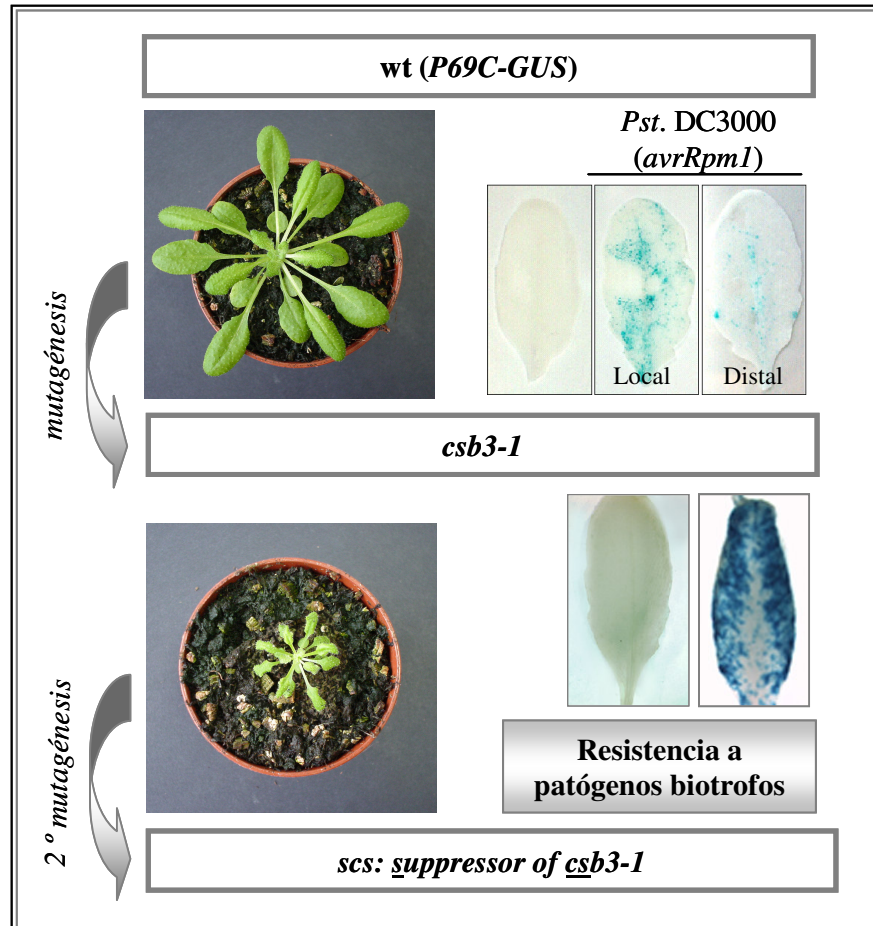


Figura 15: Resumen del abordaje seguido para la identificación de los mutantes supresores de *csb3-1*.

#### **IV.3.1. Análisis genético de los mutantes *scs*.**

El análisis genético de los mutantes *scs* se abordó mediante la determinación del carácter dominante o recesivo de los mismos, así como determinar su naturaleza extragénica o intragénica y por último, mediante test de alelismo entre los mutantes identificados. El carácter de la mutación dominante o recesiva se define mediante análisis segregacionales de la población F<sub>2</sub> obtenida de los cruzamientos entre los distintos mutantes *scs csb3-1* y plantas *csb3-1* (ver Tabla 4A). Como se aprecia en la Tabla 4A, la mayoría de las mutaciones *scs* son monogénicas y de naturaleza recesiva. Las segregaciones correspondientes a las mutaciones *scs5* y *scs6* se ajustan a 11:5 (11 *csb3-1*: 5 *scs*) y 13:3 (13 *csb3-1*: 3 *scs*) indicando la posibilidad de que dos mutaciones participen en la manifestación del fenotipo *scs5* y *scs6*. Dado que la identificación de los mutantes *scs* se realiza a partir de la mutagénesis en una población de plantas *csb3-1* es conveniente realizar cruzamientos entre los mutantes obtenidos y plantas wt para diferenciar mutaciones en el propio locus *CSB3* (intragénicos) de mutaciones en otros loci (extragénicos). Si la mutación *scs* es intragénica cosegregará con la mutación *csb3-1* y por tanto será prácticamente nula la probabilidad de encontrar plantas recombinantes con fenotipo *csb3-1* en la población F<sub>2</sub> generada. Todos los supresores *scs* resultaron ser mutaciones extragénicas como se refleja en la Tabla 4B. Por último, el test de alelismo desarrollado para los mutantes *scs* que afectan al fenotipo patogénico, aunque no concluido en su totalidad, permite anticipar que la mutación *scs4* no es alélica a *scs9*, a *scs11* y *scs12* (Tabla 4C). Asimismo, los mutantes *scs2* y *scs12* tampoco son alélicos (Tabla 4C).

**A) *csb3-1* x *scs*: Carácter de la mutación**

F <sub>2</sub>	<i>csb3-1</i>	<i>scs</i>	total	hipótesis H <sub>0</sub>	valor $\chi^2$	carácter
<i>scs2 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	147	62	209	3:1	2,43	Recesivo
<i>scs3 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	*	*	*	*	*	*
<i>scs4 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	83	24	107	3:1	0,38	Recesivo
<i>scs5 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	134	64	198	3:1 / 11:5	5,66 / 0,71	Epistasia
<i>scs6 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	179	35	214	3:1 / 13:3	8,52 / 0,81	Epistasia
<i>scs7 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	152	55	207	3:1	0,27	Recesivo
<i>scs8 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	135	39	174	3:1	0,63	Recesivo
<i>scs9 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	90	20	110	3:1	2,72	Recesivo
<i>scs10 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	*	*	*	*	*	*
<i>scs11 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	102	26	128	3:1	1,5	Recesivo
<i>scs12 csb3-1</i> x <i>csb3-1</i>	154	44	198	3:1	0,81	Recesivo

**B) wt (*P69C-GUS*) x *scs*: Locus de la mutación**

F <sub>2</sub>	wt	<i>scs</i>	<i>csb3-1</i>	total	locus
<i>scs2 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	54	33	11	98	Extragenico
<i>scs3 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	*	*	*	*	*
<i>scs4 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	100		1	> 101	Extragenico
<i>scs5 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	120	33	27	180	Extragenico
<i>scs6 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	116		19	135	Extragenico
<i>scs7 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	150	61	42	253	Extragenico
<i>scs8 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	117	55	33	205	Extragenico
<i>scs9 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	88	42	20	150	Extragenico
<i>scs10 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	*	*	*	*	*
<i>scs11 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	125		30	155	Extragenico
<i>scs12 csb3-1</i> x wt ( <i>P69C-GUS</i> )	89	40	27	156	Extragenico

**C) Test de alelismo**

<i>scs 2</i>	<i>scs 2</i>				
<i>scs 4</i>		<i>scs 4</i>			
<i>scs 9</i>		No alélico	<i>scs 9</i>		
<i>scs 11</i>		No alélico		<i>scs 11</i>	
<i>scs 12</i>	No alélico	No alélico			<i>scs 12</i>

**Tabla 4: Resumen del análisis genético de los mutantes *scs*.**

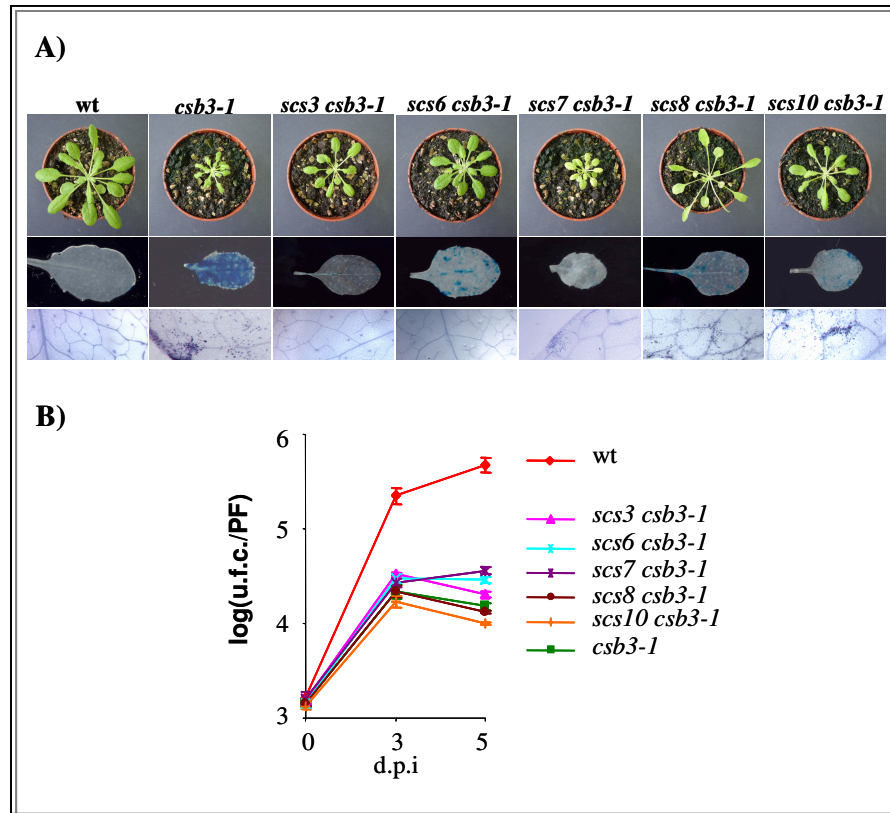
A) Análisis de las segregaciones en las poblaciones F<sub>2</sub> generadas a partir de los cruces entre plantas *csb3-1* y plantas *scs*. Las hipótesis nulas (H<sub>0</sub>) emitidas se aceptan, asumiendo un error máximo del 5% cuando el valor estadístico  $\chi^2 < 3,84$ .

B) Determinación de la naturaleza extragenica o intragenica de las mutaciones *scs* mediante análisis de las segregaciones en las poblaciones F<sub>2</sub> generadas a partir de los cruces entre plantas wt y plantas *scs*.

C) Test de alelismo. Análisis segregacionales en las poblaciones F<sub>1</sub> generadas a partir de los cruzamientos entre los tres mutantes.

#### **IV.3.2. Estudio de los mutantes *scs* resistentes a *Pst* DC3000.**

Los mutantes *scs3 csb3-1*, *scs6 csb3-1*, *scs7 csb3-1*, *scs8 csb3-1* y *scs10 csb3-1* resultaron ser los más similares a la línea parental *csb3-1* en cuanto a la apariencia externa y morfología foliar si se compara con el resto de mutantes aislados (Figura 16A; Panel superior). Se observa que siguen manteniendo un tamaño de roseta reducido comparado con las plantas wt. Además, el mutante *scs10* muestra hojas ligeramente curvadas, que es una característica común de las plantas *csb3-1*. La tinción histoquímica realizada para la determinación de la actividad GUS en hojas de roseta procedentes de plantas *scs3 csb3-1*, *scs6 csb3-1*, *scs7 csb3-1*, *scs8 csb3-1* y *scs10 csb3-1* permite detectar expresión del gen marcador *GUS*, aunque en menor grado que en las plantas *csb3-1* (Figura 16A; Panel central). Estos mutantes retienen otra característica ligada a la mutación *csb3-1* como es la presencia de lesiones celulares uniformemente distribuidas por la superficie foliar (Figura 16A; Panel inferior). El estudio comparativo del crecimiento de la bacteria virulenta *Pst*. DC3000 en esta categoría de mutantes muestra que las plantas *scs3*, *scs6*, *scs7*, *scs8* y *scs10* no consiguen suprimir el fenotipo de resistencia a *Pst*. DC3000 impuesto por la mutación *csb3-1* (Figura 16B). Tras la caracterización de esta categoría de mutantes supresores se desprende que *scs3 csb3-1*, *scs6 csb3-1*, *scs7 csb3-1*, *scs8 csb3-1* y *scs10 csb3-1* mantienen la activación del estado defensivo presente en las plantas *csb3-1*. Por consiguiente, *SCS3*, *SCS6*, *SCS7*, *SCS8* y *SCS10* muy posiblemente no participan en la activación de la señalización responsable del fenotipo de resistencia a *Pst*. DC3000 de las plantas *csb3-1* aunque sí en ciertos aspectos relacionados con el desarrollo y control transcripcional de *P69C-GUS*.



**Figura 16: Panel resumen de los mutantes *scs* resistentes a *Pst.* DC3000.**

A) Caracterización de las plantas *scs3 csb3-1*, *scs6 csb3-1*, *scs7 csb3-1*, *scs8 csb3-1* y *scs10 csb3-1*. Panel superior: Aspecto morfológico. Panel central: Determinación de actividad GUS en hojas de roseta. Panel inferior: Tinción histoquímica con azul de tripano para la detección de lesiones celulares.

B) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria de *Pst.* DC3000 en plantas *scs*, *csb3-1* y wt a las dos semanas de crecimiento. Las barras de error reflejan la desviación de los resultados obtenidos en las tres réplicas independientes del ensayo. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

IV.3.2.1. Clonación del gen SCS8.

El mutante *scs8 csb3-1* exhibe una serie de características fenotípicas comunes al mutante *rim1* (*resistant to inhibition with mevinolin*) descrito por Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002. Estas características comprenden; un alargamiento del hipocótilo en estadio de plántula en condiciones de día largo pero no en oscuridad con respecto al control (Figura 17A), peciolos alargados en hojas de roseta (Figura 16), floración temprana en día corto, etc. Este fenotipo ha sido descrito (revisado por Quail, 2002) para mutantes de respuesta a giberelinas y mutantes hiposensibles a la luz como el mutante *phyB* (*deficient in the photoreceptor phytochrome B*). El mutante *rim1* fue aislado en un rastreo de mutantes resistentes a un inhibidor de la ruta MEV del citosol, capaces de sobrevivir en presencia de fosmidomicina, el inhibidor de la ruta MEP anteriormente empleado (Figura 11). El posible intercambio de los productos derivados de la ruta cloroplástica y citosólica ha sido descrito por varios autores (Eisenreich *et al.*, 1998; Eisenreich *et al.*, 2001; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999). Dado que *csb3-1* provoca un efecto de inhibición de la ruta MEP, un posible supresor sería un mutante que exhibiera activación de la ruta MEV y por tanto, compensaría la carencia de los productos derivados de la ruta MEP provocada por la mutación *csb3-1*. Esto sugiere la posibilidad de que *scs8 csb3-1* pudiera ser alélico a *rim1*. El mutante *rim1* es un alelo de *phyB* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002). Dadas estas evidencias procedimos a secuenciar el gen *PHYB* en el mutante *scs8 csb3-1*. Dicho estudio reveló la transición guanina a alanina en la posición 1656 pb. Dicha mutación provoca la generación de un codón de parada prematuro en la posición W552 de la proteína PHYB (Figura 17). Por tanto, la mutación *scs8* genera una proteína que carece de 620 residuos de la región C-terminal. Este cambio es idéntico al descrito para el mutante nulo *phyB-5* (Reed *et al.*, 1993) y distinto al descrito para el mutante *rim1* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002). Para confirmar que

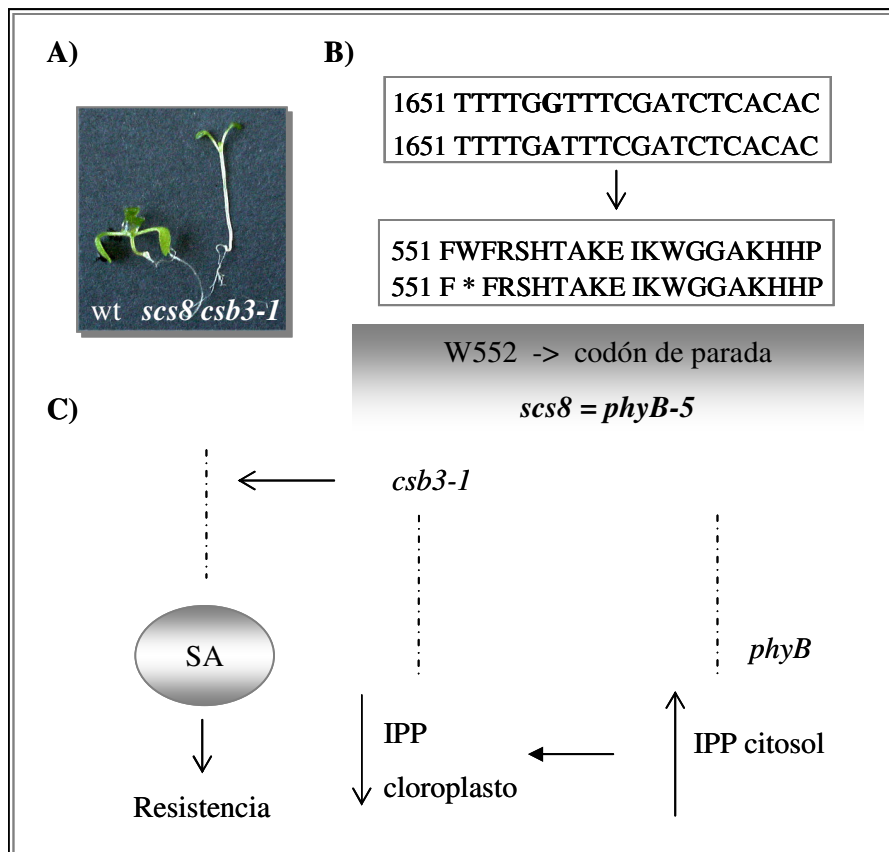


*scs8* es *phyB-5*, se procedió a realizar el cruce entre ellos y testar la población F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> procedente del cruce. En ambas poblaciones todos los individuos analizados exhibieron el fenotipo característico del mutante *phyB*.

A tenor de los resultados obtenidos por Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002 se ha propuesto que la mutación *phyB* provoca la activación de la ruta MEV y por tanto, el aumento del “pool” de IPP citosólico. Por un mecanismo de intercambio entre la ruta citosólica y cloroplástica se compensaría la bajada de IPP que se produce como consecuencia de un tratamiento con fosmidomicina, permitiendo al mutante *phyB/rim1* sobrevivir en presencia del inhibidor. El gen *CSB3* codifica la enzima HDS que cataliza la formación de HMBPP a partir de ME-CPP, el penúltimo paso de la ruta MEP, cuyos productos finales son IPP y su isómero DMAPP. Dado que la mutación *csb3-1* es de pérdida parcial de función, y provocaría una disminución en el “pool” del IPP cloroplástico, la mutación *phyB/rim1/scs8* debería actuar por debajo de *csb3-1* compensando la bajada de IPP con el “pool” acumulado en el citosol. De acuerdo con el modelo propuesto por nosotros para la resistencia a patógenos biotrofos atribuible a la mutación *csb3-1* (Apartado IV.2.8), el mutante *scs8* no es capaz de revertir la resistencia de las plantas *csb3-1* pues los niveles de ME-CPP o de los intermediarios anteriores se mantendrían intactos al ser *phyB/rim1/scs8* un regulador de la ruta MEP posterior a *csb3-1* (Figura 17). Se ha descrito la influencia de la luz en la manifestación del fenotipo de resistencia a *P. syringae* y concretamente como las plantas *phyB* muestran mayor susceptibilidad frente a la bacteria avirulenta *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*) (Genoud *et al.*, 2002). Concluimos, por tanto, que muy probablemente el resto de mutantes *scs* que mantienen el fenotipo de resistencia a *Pst.* DC3000 en presencia de la mutación *csb3-1* van a estar implicados en la regulación de los niveles de IPP o de cualquiera de los productos posteriores. En cambio, aquellos mutantes *scs* que revierten la resistencia a susceptibilidad o hipersusceptibilidad son los

## Resultados y Discusión

reguladores de la función patogénica del gen *CSB3* y por tanto objeto de estudios más detallados.



**Figura 17: Clonación del gen SCS8.**

A) Fotografía en estadio de plántulas de *scs8 csb3-1* y wt crecidas en placa con medio MS donde se aprecia el alargamiento del hipocotilo del mutante *scs8 csb3-1* respecto a la plántula wt.

B) Localización de la transición G por A en la posición 1656 pb de la secuencia del gen *PHYB* en el mutante *scs8 csb3-1*. Este cambio genera un codón de parada prematuro en la posición W552 de la proteína.

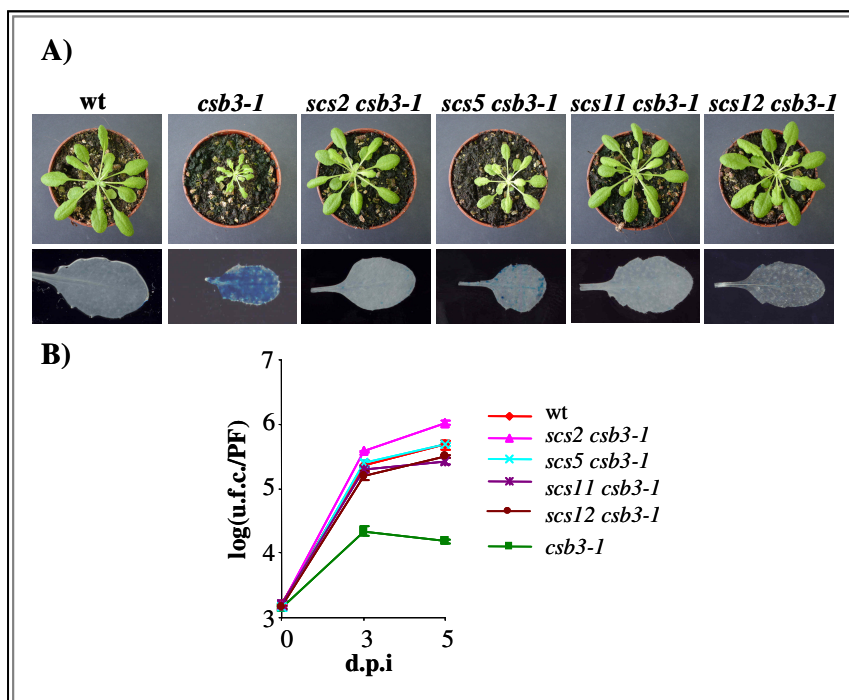
C) Propuesta de un modelo para el mutante *scs8/rim1/phyB* basado en los resultados obtenidos por Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002.

#### **IV.3.3. Estudio de los mutantes *scs* susceptibles a *Pst* DC3000.**

Las plantas mutantes *scs2 csb3-1*, *scs5 csb3-1*, *scs11 csb3-1* y *scs12 csb3-1* muestran un aspecto morfológico prácticamente indistinguible de las plantas wt (Figura 18A: Panel superior). Además apenas se detecta actividad GUS en el tejido foliar analizado a diferencia de la línea parental *csb3-1* (Figura 18A: Panel inferior). El estudio comparativo del crecimiento de la bacteria en los mutantes *scs2 csb3-1*, *scs5 csb3-1*, *scs11 csb3-1* y *scs12 csb3-1* pone de manifiesto que el crecimiento de la bacteria es idéntico al obtenido para las plantas wt (Figura 18B). Por consiguiente, en esta categoría de mutantes se ha revertido, además de las características anteriormente mencionadas, la resistencia a *Pst*. DC3000 de las plantas *csb3-1*. Merece la pena resaltar como característica común a todos ellos la aparición de cierto grado de clorosis en el centro de la roseta. Las plantas wt tratadas con fosmidomicina a una concentración de 50  $\mu$ M exhiben con el tiempo este mismo fenotipo. Puesto que la fosmidomicina inhibe específicamente la enzima DXR que cataliza el segundo paso de la ruta MEP, esta categoría de supresores pudieran estar afectando a las enzimas previas a CSB3 de la ruta MEP, evitando la acumulación del ME-CPP o de alguno de los intermediarios anteriores. Como se ha propuesto en apartados anteriores, la acumulación del ME-CPP, o de alguno de los intermediarios anteriores a su síntesis, podrían ser responsables del fenotipo de resistencia del mutante *csb3-1*. Ante la posibilidad de que los mutantes *scs2 csb3-1*, *scs5 csb3-1*, *scs11 csb3-1* y *scs12 csb3-1* pudieran ser mutaciones de pérdida parcial de función de las enzimas predecesoras a HDS (CSB3), se ha iniciado una aproximación de secuenciación de los genes que codifican DXS, DXR, CMS, CMK y MCS (Figura 11). Hasta la fecha los resultados obtenidos indican que ninguna de estas mutaciones recae en la enzima MCS. La finalización de este estudio podría conducir a la identificación del gen responsable del fenotipo de alguno de los mutantes *scs*. Los genes

## Resultados y Discusión

*SCS2*, *SCS5*, *SCS11* y *SCS12* participarían en la regulación de la resistencia a *Pst*. DC3000 mediada por la mutación *csb3-1*. Esta es la razón que justifica el estudio de las mutaciones identificadas y el cartografiado genético de dichas mutaciones, que se encuentra en fase de desarrollo en el laboratorio.



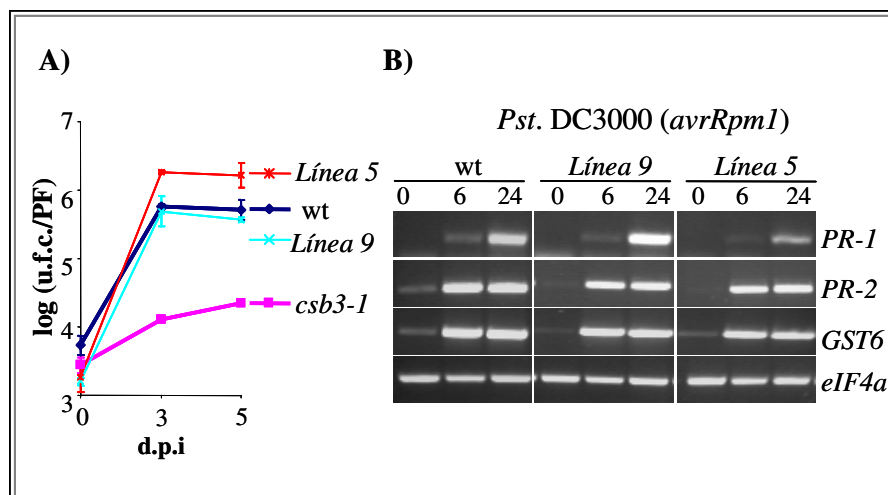
**Figura 18: Panel resumen de los mutantes *scs* susceptibles a *Pst*. DC3000.**

A) Caracterización de las plantas *scs2 csb3-1*, *scs5 csb3-1*, *scs11 csb3-1* y *scs12 csb3-1* a las cuatro semanas de haber sido sembradas. Panel superior: Aspecto morfológico. Panel inferior: Determinación de actividad GUS en hojas de roseta.

B) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria *Pst*. DC3000 en plantas *scs*, *csb3-1* y wt. Las barras de error reflejan la desviación de los resultados obtenidos en las tres réplicas independientes del ensayo. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

*IV.3.3.1. Efecto de la presencia de la mutación csb3-1 en el fenotipo de susceptibilidad de las plantas scs2.*

La presencia de la mutación *csb3-1* en los distintos fondos genéticos *scs* puede alterar el fenotipo de dichos mutantes. Con el fin de estudiar la contribución de la mutación *csb3-1* al fenotipo del mutante *scs2* se analizó la respuesta patogénica de las plantas *scs2* en ausencia de la mutación *csb3-1*. De una población F<sub>2</sub> procedente del cruce entre plantas *scs2 csb3-1* (M<sub>5</sub>) y wt, se identificaron plantas con el fenotipo característico de *scs2*. A continuación, y con la asistencia del marcador molecular generado para la identificación de la mutación *csb3-1*, (Tabla III.1) se obtuvieron varias líneas *scs2* portadoras y no portadoras de la mutación *csb3-1*. Del estudio comparativo del crecimiento de la bacteria en las distintas líneas *scs2* se desprende que la ausencia de la mutación *csb3-1* favorece ligeramente el crecimiento de la bacteria. En la Figura 19A se refleja el resultado obtenido para dos de estas líneas: la línea 9 portadora de la mutación *csb3-1* en homocigosis (*scs2 csb3-1*) y línea 5 portadora de la copia wt del gen *CSB3* también en homocigosis (*scs2 CSB3*). Ante la posibilidad de un comportamiento diferencial en la inducibilidad de los genes marcadores *PR-1*, *PR-2* y *GST6* se procedió a analizar el nivel de RNA mensajero de los mismos mediante RT-PCR en tejido sano de las líneas 9 y 5 tras la inoculación con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Como se aprecia en la Figura 19B, en la línea 9 se suprimen los niveles constitutivos de mensajero de *PR-1*, *PR-2* y *GST6* conferidos por la mutación *csb3-1*. Además se detecta el mismo grado de inducción de dichos genes que el observado en plantas wt. En cambio, detectamos un ligero descenso de los niveles de *PR-1* en la línea 5 a las 24 horas tras la infección con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Por consiguiente, la presencia de la mutación *csb3-1* condiciona la respuesta de las plantas *scs2* frente a *P. syringae*.



**Figura 19: Efecto de la mutación *csb3-1* en el fenotipo patogénico de las plantas *scs2*.**

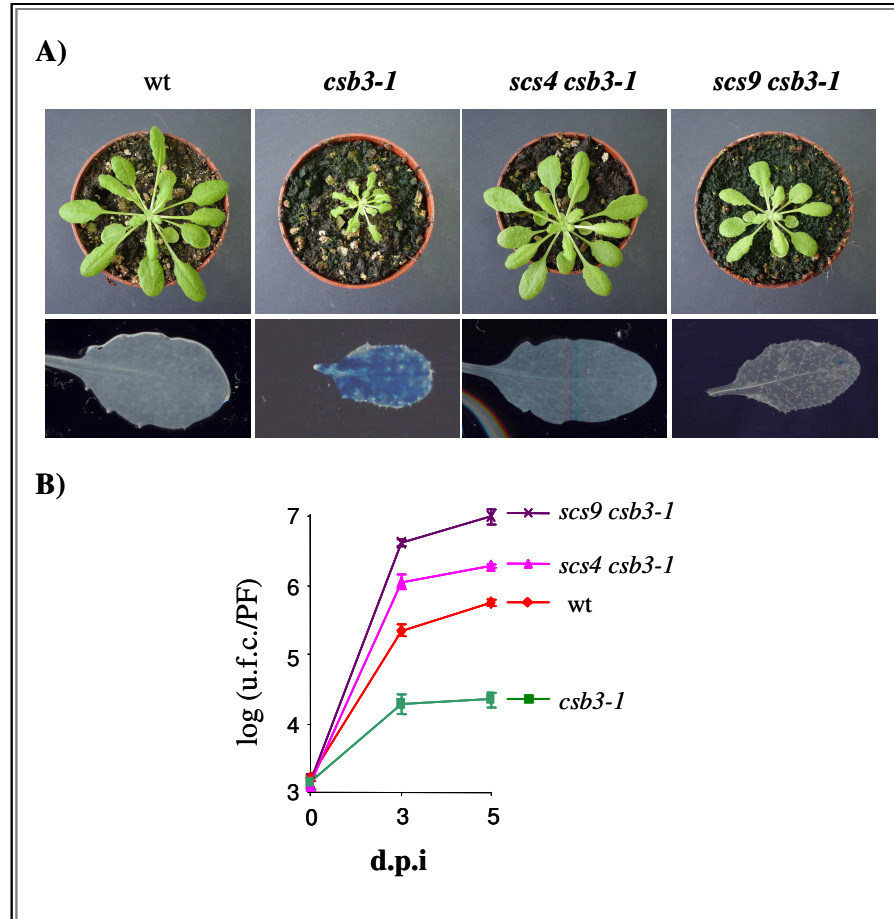
A) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria *Pst. DC3000* en la *línea 5* (*scs2 CSB3*), *línea 9* (*scs2 csb3-1*), wt y *csb3-1*.

B) Análisis de expresión de los genes *PR-1*, *PR-2*, *GST6* y *eIF4a* en plantas control, *línea 9* y *línea 5* a las 6 y 24 h tras la inoculación con *Pst. DC3000* (*avrRpm1*).

#### IV.3.4. Estudio de los mutantes *scs* hipersusceptibles a *Pst DC3000*.

De los once mutantes *scs* identificados en el presente trabajo, *scs4 csb3-1* y *scs9 csb3-1* se caracterizan por revertir todas las características fenotípicas ligadas a la mutación *csb3-1* (Figura 20). Es significativo que la resistencia a *Pst. DC3000* se revierte por encima de los niveles registrados para plantas wt. Así pues las plantas *scs4 csb3-1* y *scs9 csb3-1* son más susceptibles que las plantas wt (Figura 20B). Merece la pena resaltar la susceptibilidad registrada para las plantas *scs9 csb3-1* comparable a la susceptibilidad mostrada por las

plantas *dth9* (dato no mostrado). Todo ello indica que *SCS4* y *SCS9* son claves para el establecimiento de la resistencia a *Pst.* DC3000.



**Figura 20: Panel resumen de los mutantes *scs* hipersusceptibles a *Pst.* DC3000.**

A) Caracterización de las plantas *scs4 csb3-1* y *scs9 csb3-1* Panel superior: Aspecto morfológico. Panel inferior: Determinación de actividad GUS en hojas de roseta.

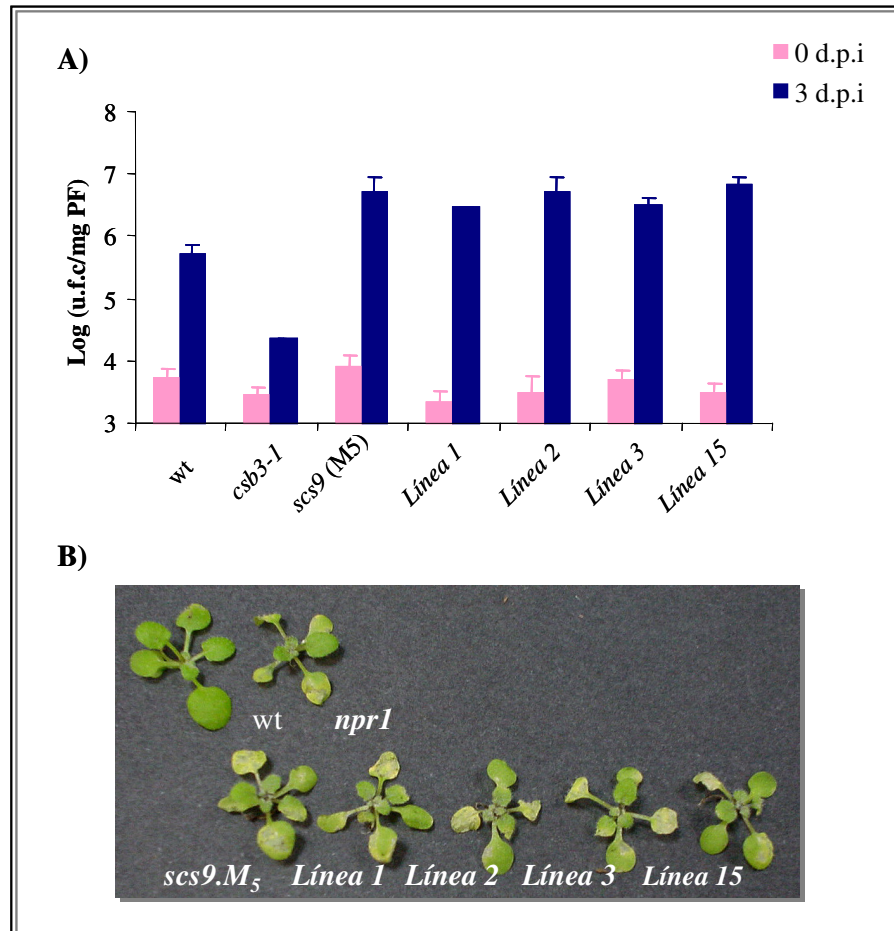
B) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria de *Pst.* DC3000 en plantas *scs*, *csb3-1* y wt. Las barras de error reflejan la desviación de los resultados obtenidos en las tres réplicas independientes del ensayo. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

## Resultados y Discusión

### *IV.3.4.1. Efecto de la presencia de la mutación *csb3-1* en el fenotipo de hipersusceptibilidad de las plantas *scs9*.*

Como se muestra en la Figura 20, en las plantas *scs9 csb3-1* se registra un crecimiento de la bacteria superior en casi 100 veces al crecimiento observado en plantas *csb3-1* y en casi 10 veces al observado para las plantas wt. Con el fin de estudiar el posible efecto de la presencia de la mutación *csb3-1* en el fenotipo de hipersusceptibilidad de las plantas *scs9 csb3-1*, se procedió a identificar plantas *scs9 CSB3*. En la población F<sub>2</sub> generada del cruce entre *scs9 csb3-1* y wt, se identificaron, gracias al marcador molecular diseñado para la detección de la mutación *csb3-1*, varias líneas *scs9* portadoras del alelo *CSB3*. A continuación, se realizó un estudio comparativo del crecimiento de *Pst.* DC3000 en las distintas líneas generadas (Figura 21A). A la vista del resultado obtenido, no se detectan diferencias significativas entre los distintos genotipos evaluados. En lo referente a sintomatología, las plantas *scs9*, con independencia de la mutación *csb3-1*, desarrollan síntomas de manera comparable a las plantas *npr1* (Figura 21B). Por consiguiente, la presencia o ausencia de la mutación *csb3-1* no disminuye ni incrementa la susceptibilidad de las plantas *scs9* a *Pst.* DC3000. Resultados similares se obtuvieron con el supresor *scs4* (datos no mostrados). Los resultados que se detallan a continuación en el presente trabajo hacen referencia a los mutantes *scs9* y *scs4* en un fondo genético *CSB3* dada la independencia de la mutación *csb3-1* en la manifestación del fenotipo.





**Figura 21: Efecto de la presencia de la mutación *csb3-1* en el fenotipo patogénico de las plantas *scs9*.**

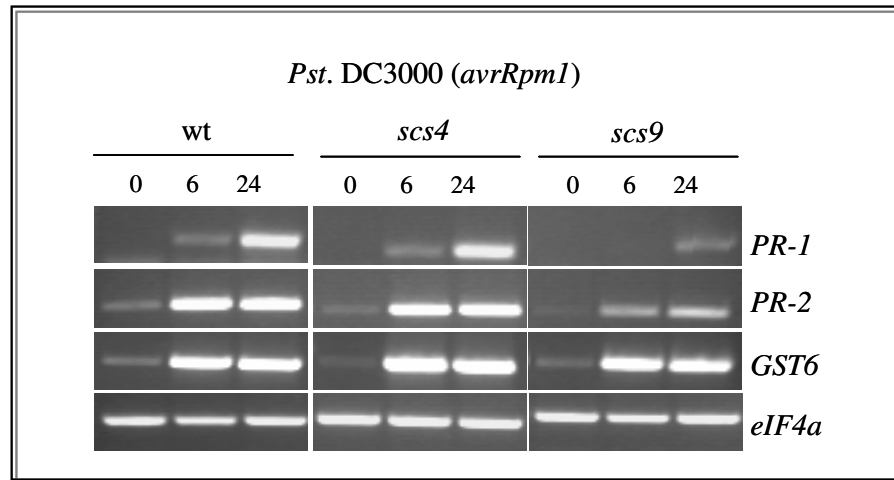
A) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria *Pst.* DC3000 en las distintas líneas identificadas para cada genotipo: *scs9 csb3-1* (Línea 1 y 2), *scs9 CSB3* (Línea 3 y 15), wt y *csb3-1*.

B) Sintomatología en las distintas líneas *scs9*, plantas wt y *npr1* tras cinco días de la inoculación con *Pst.* DC3000.

## Resultados y Discusión

IV.3.4.2. *Expresión de genes marcadores de la ruta de señalización del SA en los mutantes scs4 y scs9.*

Las plantas *scs4* y *scs9* se caracterizan por el fenotipo de hipersusceptibilidad a *Pst.* DC3000. En la bibliografía se han descrito distintas mutaciones que afectan a la susceptibilidad a *Pst.* DC3000 (Hammond y Parker, 2003). Estos mutantes, que pueden agruparse en dos categorías, según tengan afectado o no el metabolismo del SA. Entre estos últimos cabe destacar los mutantes *npr1* y *dth9* mencionados con anterioridad. Con el fin de caracterizar estas mutaciones y estudiar si de algún modo estaban afectando la expresión de los genes marcadores de la ruta dependiente de SA, se analizaron los niveles de expresión de *PR-1*, *PR-2* y *GST6* por RT-PCR tras infección con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Como se aprecia en la Figura 22, las plantas *scs4* inducen al igual que las plantas wt los genes *PR-1*, *PR-2* y *GST6*. En cambio, las plantas *scs9* muestran una ligera disminución en la inducción de los genes *PR-1* y *PR-2* a las 6 y 24 h tras la inoculación con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Resultados similares se obtuvieron en las plantas *scs9* tras inducción por SA (datos no mostrados). Las plantas *scs9* muestran por tanto una alteración en la activación de la señalización defensiva tras infección con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*) o tratamiento con SA que pudiera explicar parte de su elevada susceptibilidad a *Pst.* DC3000 (Figura 21).



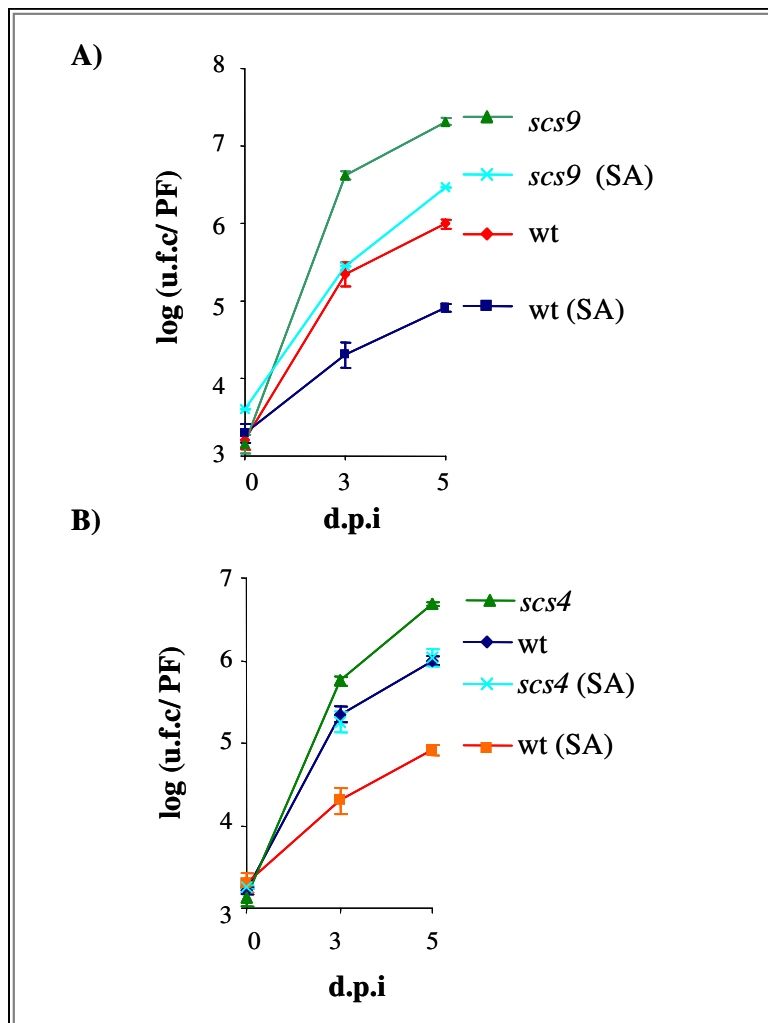
**Figura 22:** Análisis de la expresión de los genes *PR-1*, *PR-2* y *GST6* mediante RT-PCR en los supresores *scs4* y *scs9* tras inoculación con *Pst. DC3000 (avrRpm1)*.

*IV.3.4.2. Inducción de resistencia a Pst. DC3000 por aplicación de SA en los mutantes scs9 y scs4.*

La expresión de los genes *PR-1*, *PR-2* y *GST6* en los supresores *scs4* y *scs9* tras la infección patogénica induce a pensar en un comportamiento patogénico próximo a las plantas *dth9* y diferencial de las plantas *npr1*. En las plantas *dth9*, la aplicación exógena de SA previo al tratamiento con *Pst. DC3000* no induce resistencia, a diferencia de las plantas wt. Con el fin de estudiar la posible complementación por SA de la susceptibilidad de los mutantes *scs4* y *scs9* se procedió a estudiar la respuesta a *Pst. DC3000* tras aplicación de SA. En la Figura 23 se muestra cómo las plantas wt tratadas previamente con 500  $\mu$ M de SA incrementan la resistencia en 10 veces comparado con las plantas wt no tratadas. Resultados similares se obtuvieron con la aplicación de dos tratamientos a 50  $\mu$ M de SA a las 48 h y 24 h antes de la inoculación con *Pst. DC3000* (datos no mostrados). El crecimiento de *Pst. DC3000* registrado para

### Resultados y Discusión

las plantas *scs9* tras tratamiento con SA es similar al de las plantas wt no tratadas (Figura 23A). Resultados similares se observan para las plantas *scs4* (Figura 23B). Dicho de otra manera, las plantas *scs9* y *scs4* responden al tratamiento con SA pero no reestablecen los niveles de crecimiento de las plantas wt tratadas con esta misma molécula. Este resultado indica que muy probablemente los genes *SCS4* y *SCS9* son reguladores de la respuesta a *Pst*. DC3000 anteriores a la síntesis y acumulación de SA.



**Figura 23: Efecto del tratamiento con SA en el crecimiento de *Pst.* DC3000 en plantas *scs4* y *scs9*.**

A) Estudio comparativo del crecimiento de *Pst.* DC3000 en plantas wt y *scs9* tras la aplicación de 500  $\mu$ M de SA.

B) Estudio comparativo del crecimiento de *Pst.* DC3000 en plantas wt y *scs4* tras la aplicación de 500  $\mu$ M de SA.

#### IV.4. Identificación de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* de *Arabidopsis thaliana* con homología a proteasas de tipo subtilisina involucradas en la resistencia frente a patógenos biotrofos.

El presente trabajo de tesis es una continuación de una línea de investigación que se inició con la identificación del gen de tomate *P69C*, que codifica una proteasa de la familia de las subtilisinas implicada en la respuesta defensiva de la planta. Su patrón de expresión, estudiado en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* portadoras de la fusión transcripcional *P69C-GUS*, ha sido descrito con anterioridad (Jordá y Vera, 2000). A la vista de los resultados obtenidos todo indicaba que la señalización conducente a la activación del gen *P69C* se encontraba conservada en *Arabidopsis thaliana*. Por tanto, nos planteamos identificar si alguno de los 56 genes con homología a proteasas tipo subtilisina podían desempeñar una función similar a *P69C* en *Arabidopsis thaliana*. El mutante *csb3-1* (constitutive subtilisin3) descrito en el capítulo anterior fue aislado precisamente por la expresión constitutiva del gen marcador *P69C-GUS*. A partir de los datos aportados por el análisis transcriptómico global de las plantas *csb3-1* se identificaron dos genes que codifican subtilisinas con expresión aumentada en el mutante con respecto a las plantas wt (Tabla 2A). Estos genes, denominados *AtSBT3.5* (*At1g32940*) y *AtSBT3.3* (*At1g32960*) (Tabla 3A), son candidatos a ser considerados ortólogos funcionales del gen *P69C*. Con el fin de confirmar esta hipótesis y determinar el papel de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en un contexto patogénico se ha procedido al estudio de su patrón de expresión génica así como al estudio funcional en dicho contexto patogénico.

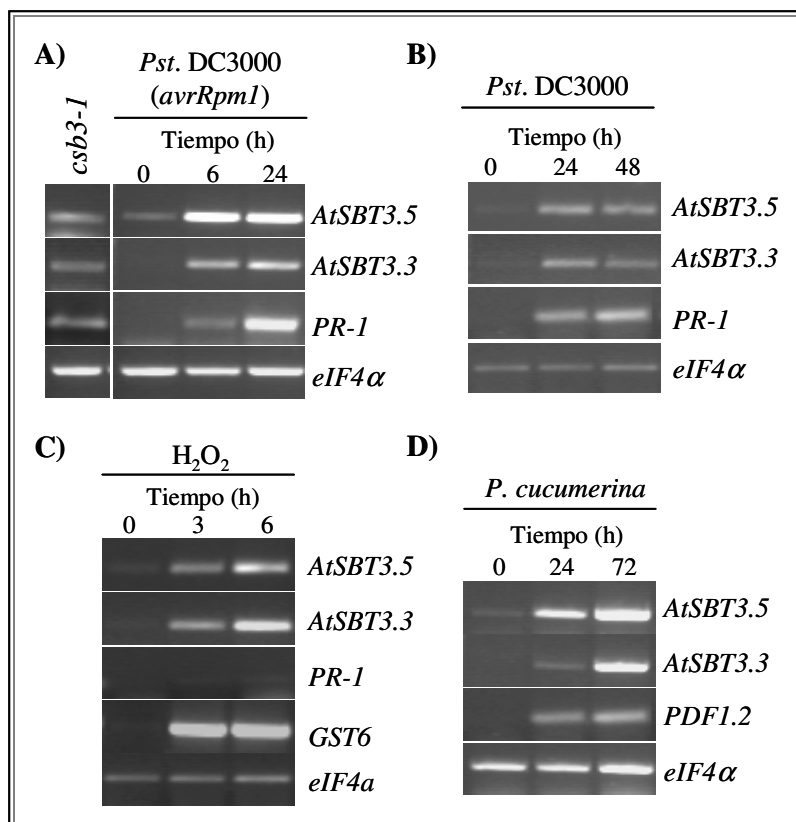
#### **IV.4.1. Patrón de expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en un contexto patogénico.**

Los 56 genes anotados como proteasas tipo subtilisina presentes en la base de datos de *Arabidopsis thaliana* comparten una elevada homología entre ellos y se ha creado un consorcio europeo ([http://csbdb.mpimgolm.mpg.de/association/PSDB/PSDB\\_Home.html](http://csbdb.mpimgolm.mpg.de/association/PSDB/PSDB_Home.html)) en el que participa nuestro grupo y que tiene la intención de caracterizar y analizar la función específica de cada uno de sus miembros. El patrón de expresión de los genes *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* fue estudiado mediante RT-PCR previo diseño de cebadores específicos para cada una de las dos isoformas (Apartado III.11.6). El mutante *csb3-1* muestra elevada la expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* (Figura 24A). Dado que el mutante *csb3-1* se caracteriza por su fenotipo de resistencia a *Pst.* DC3000 parecería razonable pensar que estos dos genes pudieran inducirse en plantas wt tras la inoculación con *Pst.* DC3000. Como se observa en la Figura 24A y 24B, la acumulación de transcritos de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* acontece tanto en la interacción incompatible (*Pst.* DC3000 (*avrRpm1*); Figura 24A) como durante la interacción compatible que desencadena la enfermedad (*Pst.* DC3000; Figura 24B). La expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* puede observarse ya a las 6 horas con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Como control de la infección patogénica se utilizó el gen *PR-1* y se observó que este último alcanza su nivel máximo a las 24 h tras la inoculación. A tenor de la rápida inducción de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* detectada tras la infección con la bacteria avirulenta, se podría argumentar que especies reactivas de oxígeno (ROS) pudieran participar en el mecanismo de inducción de dichos genes. Con el fin de comprobar dicha hipótesis procedimos a determinar la inducibilidad de dichos genes por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una de las ROS características de la interacción planta-patógeno. Como se muestra en la Figura 24C, tras el tratamiento de hojas de *Arabidopsis thaliana* con 3 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observa una rápida inducción de ambos genes, que acontece ya a las tres

## Resultados y Discusión

horas posteriores al tratamiento. De la misma manera el gen de referencia *GST6*, utilizado como control de la eficacia del tratamiento, también sufre una drástica inducción en su expresión. Por el contrario el gen *PR-1*, como marcador de la señalización dependiente de SA, no muestra inducción en los tiempos analizados. Con el fin de estudiar si la regulación transcripcional observada para los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en respuesta a *Pst.* DC3000 era también apreciable tras la infección con patógenos necrotrofos tal como *P. cucumerina* se procedió a la obtención de mRNAs de plantas sanas e infectadas con dicho patógeno (Ver Figura 24D). Se detecta un aumento en los niveles de expresión de ambos genes tras la infección con *P. cucumerina*. Como control de la infección patogénica se ha utilizado el gen *PDF1.2*. En definitiva, del análisis del patrón de expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* se desprende que ambos genes se caracterizan por su rápida inducción en interacciones incompatibles y además, su activación es dependiente de la señalización mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





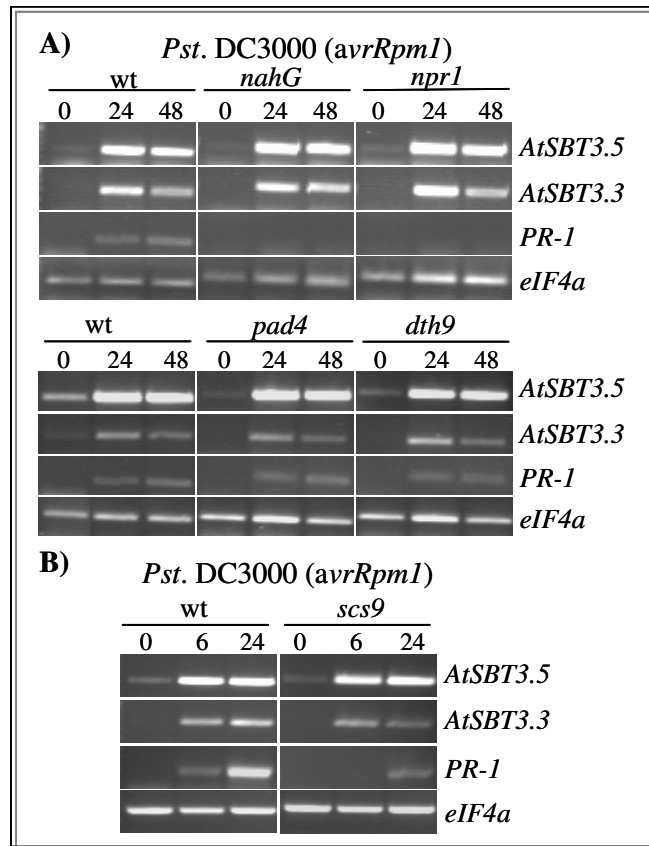
**Figura 24: Análisis de la expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* mediante RT-PCR en un contexto patogénico.**

- A) Tejido sano de plantas *csb3-1* y plantas wt, así como en tejido inoculado con *Pst. DC3000 (avrRpm1)* procedente de plantas wt a las 6 y 24 h.
- B) Tejido sano y tejido infectado de plantas wt a las 24 y 48 h por *Pst. DC3000*.
- C) Tejido de plantas wt tras tratamiento con 3 mM de  $H_2O_2$ .
- D) Tejido sano y tejido infectado de plantas wt a las 24 y 72 h por *Plectosphaerella cucumerina*.

**IV.4.2. Análisis de la expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en mutantes de señalización descritos para la ruta del SA y en los supresores de *csb3-1*.**

De los análisis epistáticos realizados con los dobles mutantes generados entre *csb3-1* y mutantes descritos de la ruta de señalización dependiente de SA, se desprende que la resistencia de las plantas *csb3-1* a *Pst.* DC3000 requiere de la percepción, síntesis y acumulación de SA (Apartado IV.2.3). La expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en el mutante *csb3-1* pudiera ser consecuencia de los elevados niveles de SA en plantas *csb3-1* y estar mediada por *NPR1* o *DTH9*. Para confirmar esta hipótesis se analizaron los niveles de expresión de dichos genes en varios fondos mutantes tras la inducción con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). En la Figura 25A muestra el resultado obtenido mediante RT-PCR en la línea transgénica *nahG* y en los mutantes *npr1-1*, *pad4* y *dth9*. Las plantas *nahG* no acumulan SA, pero en cambio inducen la expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3*. Por consiguiente, la expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* es independiente de la acumulación de SA. De la misma manera, la expresión de los dos genes se ve también inalterada en el fondo *npr1*. Ello indica que al contrario de los genes *PR* “clásicos”, las dos subtilasas no requieren una copia funcional de *NPR1* para su inducción (Figura 25A; Panel superior). Las plantas *pad4* bloquean la acumulación de SA y son más susceptibles a patógenos biotrofos. La expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en el mutante *pad4* es comparable a los niveles de expresión registrados para las plantas wt. El mutante *dth9*, alterado en la respuesta SAR, expresa genes *PR*. *DTH9* muy probablemente es un factor esencial para la respuesta SAR independiente de *NPR1*. La expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* también resultó ser independiente de *DTH9* (Figura 25A; Panel inferior). A la vista de los resultados, la expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* no requiere la acumulación de SA y es independiente de *PAD4*, *NPR1* y *DTH9* (Figura 25A). En el apartado V.4 se ha descrito ampliamente la identificación y caracterización de mutantes supresores de la mutación *csb3-1*. Con

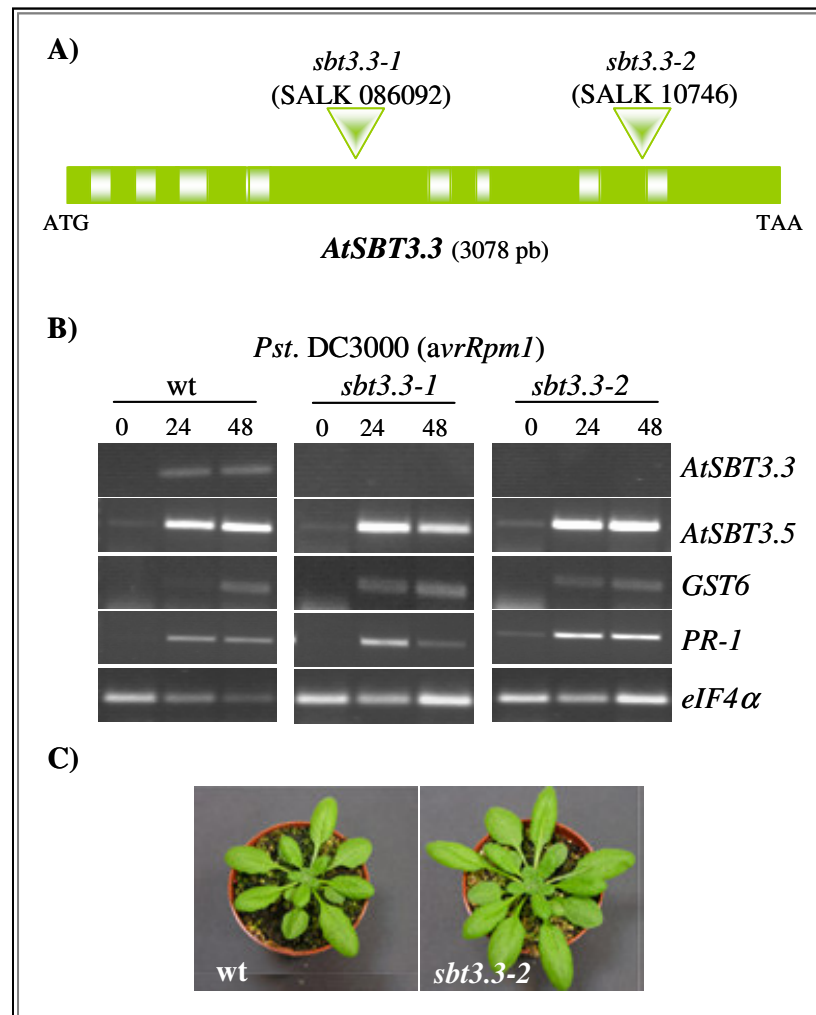
el fin de identificar alguna alteración en la expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* en los mutantes supresores se procedió a su análisis por RT-PCR. Sólo en las plantas *scs9* se detectó un patrón de expresión diferencial de *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* con respecto a las plantas wt (Figura 25B). En estas plantas se detecta menor expresión de genes *PR* tras la inoculación con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*) o tras tratamiento con SA (dato este último no mostrado). Asimismo, la expresión de *AtSBT3.3* y no la expresión de *AtSBT3.5* se encuentra parcialmente reprimida en el supresor *scs9* con respecto a las plantas wt (Figura 25B).



**Figura 25:** Análisis de la expresión de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* mediante RT-PCR en plantas *nahG*, *npr1*, *pad4*, *dth9* y *scs9* inoculadas con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*).

**IV.4.3. Caracterización de la respuesta patogénica en el mutante *sbt3.3* obtenido por inserción de T-DNA.**

Los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* se caracterizan por un patrón de expresión inducible tanto por patógenos biotrofos (i.e. *Pst.* DC3000) como necrotrofos (i.e. *P. cucumerina*). Asimismo, su expresión es rápidamente inducible por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y es independiente de SA. Ello indica que la percepción de la presencia del patógeno por parte de la planta demanda la presencia de dichas proteasas con fines presumiblemente relacionados con el mecanismo de defensa. Por tanto, la ausencia de expresión de estos genes debería alterar el mecanismo defensivo y por tanto la resistencia. Con tal fin hemos identificado dos mutantes de inserción de T-DNA (SALK 086092 y SALK 107460) que interrumpen la zona codificante del gen *AtSBT3.3* y que hemos denominado mutantes *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* (Figura 26A). En el caso del gen *AtSBT3.5* no se encuentran todavía disponible un mutante de inserción de T-DNA en la zona codificante. El estudio de los mutantes *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* revela que son incapaces de inducir la expresión y acumulación del transcrito *AtSBT3.3* tras la inoculación con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*). Sin embargo, sí inducen de forma comparable a las plantas wt los genes *AtSBT3.5*, *GST6* y *PR-1* (Figura 26 B). Así pues, los mutantes *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* no están afectados en la expresión de los genes de defensa *PR-1* y *GST6*. Las plantas *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* no muestran ninguna característica morfológica diferencial a las plantas wt como se observa en la Figura 26C para una planta representativa de la línea *sbt3.3-2* y para una planta wt.



**Figura 26: Caracterización molecular y fenotípica de las plantas *sbt3.3*.**

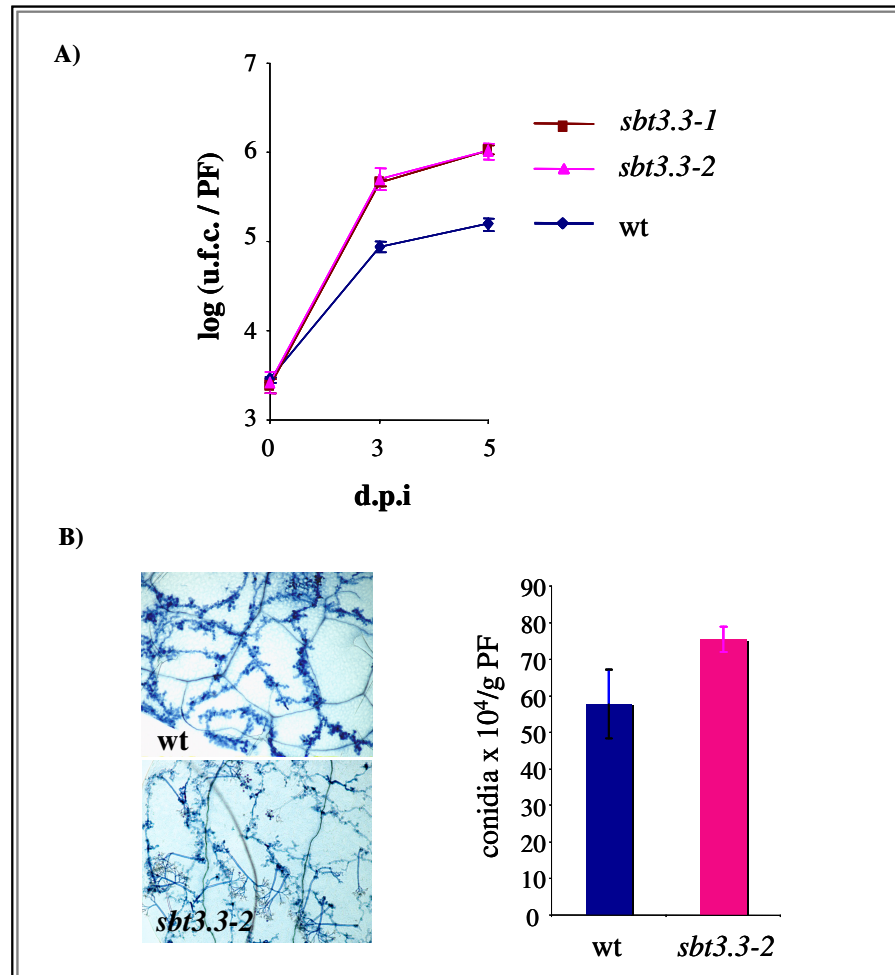
A) Estructura de exones e intrones del gen *AtSBT3.3*. Las regiones codificantes se representan con cajas de color verde. Se indica la ubicación de las dos inserciones de T-DNA.

B) Efecto de las mutaciones *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* en la expresión de los genes *AtSBT3.3*, *AtSBT3.5*, *GST6* y *PR-1* tras la inoculación con *Pst. DC3000* (*avrRpm1*).

C) Aspecto morfológico de las plantas *sbt3.3-2* y plantas *wt* a las cuatro semanas de haber sido sembradas.

**IV.4.4. Estudio del efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta frente a patógenos biotrofos.**

Con el propósito de analizar el posible efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta a la infección con bacteria virulenta *Pst.* DC3000, se inocularon plantas con dicha bacteria y se registró el crecimiento de la misma a tiempo 0, 3 y 5 días postinoculación (Figura 27A). El estudio comparativo del crecimiento de *Pst.* DC3000 en plantas wt, *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* permite apreciar un incremento de 6 a 8 veces superior en el título de bacteria procedente de plantas *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2*. Por consiguiente, las plantas *sbt3.3* tienen afectada negativamente la resistencia a dicho patógeno. Paralelamente se procedió a estudiar la respuesta de este mutante frente a otro patógeno biotrofo tal y como es el caso de *H. parasitica*. Se inocularon 25 plantas *sbt3.3* y 25 plantas silvestres con el aislado NOCO. El crecimiento de este aislado virulento para *Arabidopsis thaliana* Col-0 fue evaluado por observación directa de las hifas teñidas en las hojas infectadas y por conteo de las esporas producidas en este mismo tejido (Figura 27B). De ambas evaluaciones del crecimiento de *H. parasitica* se observa de nuevo un aumento en la susceptibilidad entre las plantas silvestres y las plantas *sbt3.3*. Los resultados obtenidos de incremento de susceptibilidad de 6 a 8 veces en las plantas *sbt3.3* frente a *Pst.* DC3000 y de aproximadamente un 25% más en la producción de esporas de *H. parasitica* en estas plantas indican la implicación de *AtSBT3.3* en la respuesta frente a patógenos biotrofos.



**Figura 27: Respuesta de las plantas *sbt3.3* frente a patógenos biotrofos**

A) Estudio comparativo del crecimiento de la bacteria *Pst.* DC3000 en plantas wt, *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2*.

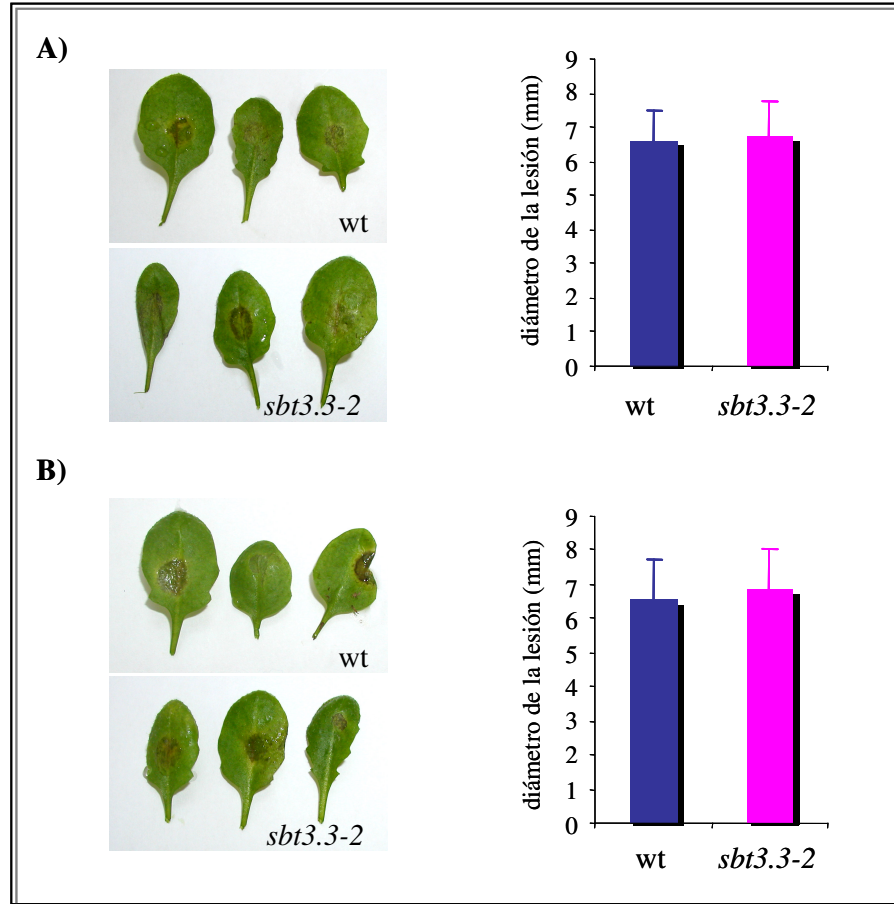
B) Estudio comparativo del ciclo infectivo de *H. parasitica* en plantas *sbt3.3-2* y wt. Tinción histoquímica foliar con azul de tripano de plantas de tres semanas de crecimiento pulverizadas con un inóculo de  $10^5$  conidiosporas por mililitro de *H. parasitica* y observadas al microscopio para la visualización del crecimiento característico de las hifas y conidiosporas. Cuantificación de conidiosporas de *H. parasitica* a los 7 días tras la inoculación.

**IV.4.5. Estudio del efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta frente a patógenos necrotrofos.**

Con el fin de comprobar si la susceptibilidad exhibida por las plantas *sbt3.3-2* frente a patógenos biotrofos se extendía también a patógenos necrotrofos se inocularon plantas *sbt3.3-2* y wt con *P. cucumerina* y *B. cinerea*. Los síntomas postinoculación con *P. cucumerina* se caracterizan por la formación de lesiones que aumentan de tamaño a medida que progresa la infección, degradando la lámina foliar. Como se observa en la Figura 28A, no existen diferencias en el tamaño de la lesión entre las plantas silvestres y plantas *sbt3.3-2*. De la misma manera, procedimos a inocular plantas silvestres y plantas *sbt3.3-2* con *B. cinerea*. Tanto las plantas silvestres como *sbt3.3-2* resultaron altamente susceptibles a *B. cinerea*, mostrando necrosis así como una extensa proliferación y esporulación del micelio fúngico, como queda claramente reflejado en las Figura 28B. Por consiguiente, la mutación *sbt3.3-2* no afecta a la susceptibilidad de la planta frente a patógenos necrotrofos.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la susceptibilidad mostrada por las plantas *sbt3.3-2* a patógenos biotrofos pero no a necrotrofos es una característica íntimamente ligada al locus *AtSBT3.3*.





**Figura 28: Respuesta de las plantas *sbt3.3* frente a patógenos necrotrofos.**

A) Los síntomas de la enfermedad producida por la inoculación con *P. cucumerina* evaluados como el diámetro medio de la lesión a los 6 días en tres hojas de ocho plantas para cada genotipo.

B) Hojas representativas de plantas wt y plantas *sbt3.3-2* a los 4 días de inocular con una suspensión de 6  $\mu$ l de esporas de *B. cinerea* ( $2.5 \times 10^4$  conidia/mL). Tamaño de la lesión producida tras seis días de la inoculación con *B. cinerea*. Los valores representan la media de la lesión  $\pm$  SE de las medidas procedentes de un mínimo de 30 lesiones.



*Discusión General.*



## V. Discusión general.

La aproximación experimental realizada con el fin de identificar genes implicados en la regulación del gen *P69C* y por consiguiente en la respuesta defensiva, consistió en el aislamiento de mutantes que expresaran el gen *P69C-GUS* en ausencia de estímulo patogénico. Se realizó una mutagénesis, con EMS, sobre semillas homocigotas portadoras del transgén *P69C-GUS*, seleccionando posteriormente en la  $M_2$  aquellos individuos que presentaban expresión del gen reportador *GUS*. Se identificaron tres mutantes *csb* (*constitutive subtilisin*) denominados *csb1*, *csb2* y *csb3*. Los análisis genéticos revelaron que *csb1*, *csb2* y *csb3* son mutaciones nucleares monogénicas de carácter recesivo en loci diferentes. El patrón de expresión del gen *P69C-GUS* en el mutante *csb1* se extiende homogéneamente por toda la superficie foliar, mientras que en los mutantes *csb2* y *csb3* se reproduce el mismo patrón de expresión que el observado en la línea parental no mutagenizada *P69C-GUS* tras la inoculación con la bacteria *P. syringae* (en forma de punteaduras distribuidas a lo largo del mesófilo; Figura IV.3). Asimismo, los mutantes *csb2* y *csb3* expresan genes de defensa tales como *PR-1*, *PR-5* y *BGL2*. Además, las plantas *csb2* y *csb3* mostraron una drástica disminución en el crecimiento de la bacteria *Pst.* DC3000 comparado con los niveles de crecimiento registrados para las plantas wt y *csb1*. El mutante *csb1* no muestra alteración en la respuesta a *Pst.* DC3000 aunque sí se encuentra alterado en la expresión del gen *P69C*, indicando la existencia de otros factores no involucrados en la respuesta defensiva como reguladores de la expresión del gen *P69C-GUS*. Por el contrario, en los mutantes *csb2* y *csb3* la expresión de genes de defensa (*PR-1*, *PR-2* y *GST6*) y la marcada resistencia a *Pst.* DC3000 sugieren la activación de la ruta de señalización defensiva mediada por SA frente a patógenos biotrofos.

En la presente tesis se describe ampliamente la identificación y caracterización del mutante de *Arabidopsis* *csb3*. Las plantas *csb3* se

## Discusión

caracterizan por exhibir una elevada resistencia frente a patógenos biotrofos tales como *P. syringae* y *H. parasitica*, mientras que la susceptibilidad frente a patógenos necrotrofos (*P. cucumerina* y *B. cinerea*) permanece inalterada. La resistencia a patógenos biotrofos de las plantas *csb3* se correlaciona con una elevada acumulación de SA. Los elevados niveles de SA registrados en las plantas *csb3* explicarían la activación transcripcional de los genes dependientes de la ruta mediada por SA tales como *PR-1*, *PR-2* y *GST6* (Durrant y Dong, 2004). El SA es totalmente necesario para el fenotipo de resistencia de las plantas *csb3*, como se desprende de los estudios epistáticos llevados a cabo con los dobles mutantes generados en el presente trabajo. Por tanto, los niveles de mensajero de *PR-1*, la expresión de *P69C-GUS* y la resistencia a *Pst.* DC3000 son suprimidos en los dobles mutantes *csb3 pad4*, *csb3 sid2*, *csb3 eds5* y *csb3 nahG* comparado con las plantas *csb3*. Estos resultados indican que tanto la síntesis como acumulación de SA son indispensables para la manifestación del fenotipo de resistencia de las plantas *csb3*. A tenor de los estudios realizados, *csb3* opera en los primeros estadios de la ruta de señalización defensiva dependiente del SA. Además del SA, la resistencia a *Pst.* DC3000 en plantas *csb3* requiere una copia funcional de *NPR1*. El doble mutante *csb3 npr1* se comporta como el parental *npr1* con ausencia de niveles de expresión detectables de *PR-1* e hipersusceptibilidad a *Pst.* DC3000. La reversión de resistencia a hipersusceptibilidad sin alterar los niveles de *PR-1* en el doble *csb3 dth9* implica también dependencia de *DTH9* en la resistencia mediada por *csb3*. Es significativo que el fenotipo de resistencia de las plantas *csb3* está ligado a la aparición de un fenotipo morfológico característico (reducido tamaño y presencia de hojas ligeramente curvadas). Este fenotipo es característico de mutantes de *Arabidopsis* que muestran resistencia frente a patógenos biotrofos (Durrant y Dong, 2004) como los mutantes *cpr* (*constitutive expressor of PR gene*). A diferencia del mutante *csb3*, los mutantes *cpr* muestran independencia de *NPR1* tanto para la resistencia como para la expresión de genes de defensa

(Clarke *et al.*, 2000). El doble mutante *csb3 cpr1* pone de manifiesto el carácter aditivo de ambas mutaciones. Las plantas *csb3 cpr1* muestran un fenotipo extremo que supera marcadamente el que *csb3* y *cpr1* pudieran mostrar por separado. Así pues, tanto las mutaciones *csb3* como *cpr1* contribuyen de manera independiente a la acumulación de SA.

El gen *CSB3* identificado por clonaje posicional complementa la mutación *csb3-1* disminuyendo los niveles de expresión de los genes *PR* así como el fenotipo de resistencia a *Pst.* DC3000. El nivel de expresión de *CSB3* en plantas wt se ve reprimido tras la infección con *Pst.* DC3000 y se correlaciona con la inducción de genes *PR*. Esta represión en el nivel de acumulación del mRNA de *CSB3* es más pronunciada en una interacción incompatible. El gen *CSB3* actuaría como un regulador negativo de la ruta dependiente de SA y por tanto, de la resistencia frente a patógenos biotrofos en las plantas wt. El gen *CSB3* codifica la 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato [HMBPP] sintasa que cataliza la formación de HMBPP a partir de 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato [ME-CPP] (Kollas *et al.*, 2002). Esta actividad enzimática controla uno de los pasos finales de la biosíntesis de IPP y su isómero dimetilalil fosfato [DMAPP] por la ruta MEP independiente de mevalonato y que acontece en el cloroplasto. La proteína mutada *CSB3-1* no es una pérdida total de función puesto que alelos nulos para el gen *CSB3* presentan un fenotipo de albinismo y letalidad (*csb3-2*, *clb4/csb3-3*). Sin embargo, puede atribuirse a la mutación *csb3-1* una pérdida parcial de función dada por la substitución de glicina por aspártico. Esta substitución provoca la introducción de un aminoácido de naturaleza ácida en lugar de un aminoácido neutro en la región próxima al dominio altamente conservado en este tipo de enzimas 4Fe-4S. Esta substitución en la secuencia próxima al dominio 4Fe-4S alteraría, muy posiblemente, la conformación de la proteína y desestabilizaría el correcto plegamiento de la enzima.

## Discusión

Las características ligadas a la mutación *csb3-1* (activación de la ruta de señalización dependiente de SA y resistencia a *Pst.* DC3000) podrían deberse a un descenso en los niveles del producto final de la ruta MEP (IPP) como consecuencia de una menor actividad de la enzima HDS en las plantas *csb3-1* o, por el contrario, a la acumulación del sustrato ME-CPP o cualquiera de los intermediarios anteriores. Comprobamos mediante la utilización de un inhibidor de la ruta MEP (i.e. fosfidomicina) cuál de estas dos posibilidades era responsable del fenotipo de resistencia a *Pst.* DC3000 exhibido por las plantas *csb3-1*. La fosfidomicina es un inhibidor de la actividad de la enzima DXR que interviene en el segundo paso de síntesis de la ruta MEP y anterior al afectado por la mutación *csb3-1* (Schwender *et al.*, 1999; Laule *et al.*, 2003). La complementación farmacológica del fenotipo de resistencia y de la expresión de genes marcadores asociado a la mutación *csb3-1* nos permite concluir que la activación de la ruta del SA en el mutante *csb3-1* es el resultado de la acumulación del sustrato de la enzima HDS/CSB3 (ME-CPP) o cualquiera de sus intermediarios anteriores. Además, se observa un efecto de la fosfidomicina en la respuesta a *Pst.* DC3000 en plantas wt. El tratamiento con fosfidomicina a 50  $\mu$ M favorece el crecimiento de la bacteria indicando la función promotora que el ME-CPP o los intermediarios anteriores a su síntesis poseen en la activación de los mecanismos de resistencia.

Con el fin de profundizar en la resistencia a patógenos biotrofos mediada por la mutación *csb3-1* se procedió a la identificación de mutantes supresores de dicha mutación. Se mutagenizaron semillas homocigotas *csb3-1* con EMS y se realizó un escrutinio en la generación M<sub>2</sub> en base a los siguientes criterios: reversión del fenotipo morfológico y ausencia de expresión del gen marcador *GUS*. Los mutantes *scs* así identificados fueron evaluados por su respuesta frente a *Pst.* DC3000 y adscritos a tres categorías de mutantes: resistentes, susceptibles e hipersusceptibles. En la categoría de *scs* resistentes destaca el mutante *scs8*. Este mutante comparte características comunes al mutante *rim1*,



descrito con anterioridad (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004) y alélico al mutante *phyB*. El mutante *phyB/rim1* se caracteriza por la activación transcripcional de los genes que participan en la ruta MEV. Además, estas plantas son capaces de sobrevivir en presencia de fosmidomicina. Este hecho se explicaría por el intercambio existente entre ambas rutas (MEP y MEV; Rohmer, 1999). El mutante *scs8* identificado en el presente trabajo es también un alelo de *phyB* y concretamente posee la misma mutación que *phyB-5*. El mecanismo exacto en virtud del cual *phyB* regula la ruta MEV de síntesis de isoprenoides se desconoce. Así pues, *phyB* al no alterar los niveles de ME-CPP o de los intermediarios anteriores, no regula la resistencia mediada por *csb3-1* aunque sí otros aspectos del fenotipo de *csb3-1*. Los mutantes supresores que sí revierten la resistencia exhibida por el mutante *csb3-1* a niveles comparables al registrado por las plantas wt o mutantes hipersusceptibles tales como *npr1*, *dth9* etc. constituyen los reguladores de la función patogénica del gen *CSB3*. Merece la pena resaltar, de los mutantes *scs* identificados en el presente trabajo de tesis, el mutante *scs9*, cuya susceptibilidad a *Pst.* DC3000 es similar a la susceptibilidad mostrada por las plantas *dth9* también identificadas en nuestro laboratorio (Mayda *et al.*, 2000). Este fenotipo de susceptibilidad es independiente de la presencia de la mutación *csb3-1* en el fondo genético *scs9*. Las plantas *scs9* muestran una disminución en la inducción de genes *PR* tras infección con *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*) o tratamiento con SA. Además las plantas *scs9* responden al tratamiento con SA pero no reestablecen los niveles de crecimiento de las plantas wt tratadas con SA. Este resultado indica que *SCS9* es un regulador de la respuesta a *Pst.* DC3000 anterior a la síntesis y acumulación de SA.

En resumen, nuestros resultados apuntan a la participación de un factor/señal cloroplástica que se deriva de los pasos iniciales de la ruta MEP en el control de la ruta de señalización defensiva frente a patógenos biotrofos dependiente de SA. Esta evidencia refuerza la implicación del cloroplasto en

## Discusión

aspectos críticos de la respuesta defensiva. La determinación de qué molécula en concreto es responsable de la regulación de la ruta dependiente del SA y cómo su acción es controlada por los productos de los genes SCS identificados en el presente proyecto de tesis doctoral es uno de los objetivos a abordar en el futuro.

Por último, se han identificado los genes *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* a partir del análisis transcriptómico global de *csb3-1*. Estos genes con homología a proteasas de tipo subtilisina presentan niveles de expresión en *csb3-1* superiores al wt. Del estudio de su patrón de expresión en un contexto patogénico, así como en mutantes de la ruta de señalización dependiente de SA, se desprende que *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* son genes cuya expresión se induce tanto por bacteria virulenta como avirulenta (*Pst. DC3000* o *Pst. DC3000 (avrRpm1)*) así como por *P. cucumerina*. Son significativos los niveles de expresión de ambos genes registrados a las 6 h tras la infección con la bacteria *Pst. DC3000 (avrRpm1)* y a las 3 h tras tratamiento con peróxido de hidrógeno. Por tanto, *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* son genes de respuesta temprana y su activación dependiente de la señalización mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La expresión de *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* es independiente de la acumulación de SA, *PAD4*, *DTH9* y *NPR1*. Por el contrario, la expresión de *AtSBT3.3* se encuentra ligeramente reprimida en el mutante *scs9*. Las plantas *sbt3.3-1* y *sbt3.3-2* (mutantes alélicos de inserción de T-DNA en el gen *AtSBT3.3*) se caracterizan por manifestar un fenotipo de hipersusceptibilidad que es específica frente a patógenos biotrofos. Sin embargo, dichas plantas inducen la expresión de genes de la ruta dependiente de SA de forma comparable a las plantas wt. El estudio en profundidad de *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* es clave para el entendimiento de los mecanismos defensivos que subyacen a la resistencia frente a patógenos biotrofos.

*Conclusiones.*



## VI. Conclusiones.

1. Hemos identificado los mutantes *csb1*, *csb2* y *csb3* de *Arabidopsis thaliana* afectados en la regulación transcripcional del gen *P69C-GUS*. Las plantas *csb2* y *csb3* exhiben un fenotipo de resistencia frente a *Pst*. DC3000 y expresión de genes de defensa.
2. Las plantas *csb3* se caracterizan por exhibir una elevada resistencia frente a patógenos biotrofos, como *P. syringae* y *H. parasitica*, mientras que la susceptibilidad frente a patógenos necrotrofos permanece inalterada. Todos los componentes que participan en la ruta de señalización defensiva dependiente de SA analizados en el presente trabajo son necesarios para la manifestación del fenotipo de resistencia de las plantas *csb3*. El gen *CSB3* ha sido identificado por clonaje posicional y complementa a la mutación *csb3-1*. El gen *CSB3* codifica la 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato [HMBPP] sintasa. *CSB3* actuaría como un regulador negativo de la resistencia dependiente de SA. La acumulación del sustrato de la enzima HDS/CSB3 (ME-CPP) o cualquiera de sus intermediarios anteriores provoca la activación de la ruta de señalización defensiva dependiente de SA en el mutante *csb3-1*.
3. Se han identificado mutaciones supresoras del fenotipo de *csb3-1*. Los mutantes supresores que revierten la resistencia asociada a la mutación *csb3-1* a niveles comparables a las plantas wt o a mutantes hipersusceptibles constituyen los reguladores de la función patogénica del gen *CSB3*. Merece la pena destacar las plantas *scs9* que muestran un fenotipo de hipersusceptibilidad a *Pst*. DC3000 así como una disminución en la activación transcripcional de genes de defensa.
4. Los estudios realizados con los genes *AtSBT3.3* y *AtSBT3.5* con homología a proteasas tipo subtilisinas indican la participación de ambos genes en mecanismos de resistencia. Del análisis de su patrón de

### Conclusiones

expresión se desprende que ambos genes son de respuesta temprana, y muy posiblemente participan en las etapas iniciales de la interacción planta-patógeno. Además, la pérdida de función del gen *AtSBT3.3* afecta específicamente a la susceptibilidad frente a patógenos biotrofos.

*Bibliografía.*





## VII. Bibliografía.

**Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J. y Parker, J.E.** (1998). Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signalling pathways in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10306-10311.

**Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. y Ecker, J.R.** (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.

**Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., y Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.

**Asada, K.** (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601-639.

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K.** (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc. Boston. EE.UU.

**Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. y Schulze-Lefert, P.** (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-6.

## Bibliografía

- Axtell, M.J., y Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369-377.
- Bechtold, N., Ellis, J. y Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- Beers, E.P., Jones, A.M. y Dickerman, A.W.** (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 spartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**, 43-58.
- Belkadir, Y., Subramaniam, R., y Dangl, J.L.** (2004). Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 391-399.
- Bell, C.J., y Ecker, J.R.** (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.
- Berger, D., y Altmann, T.** (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **14**, 1119-1131.
- Bi, Y-M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R. y Draper, J.** (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* **8**, 235-245.
- Bolwell, G.P., Bozak, K., y Zimmerlin, A.** (1994). Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **37**, 1491-1506.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F., y Dong, X.** (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., y Dong, X.** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9**, 1573-1584.

- Budziszewski, G.J., Lewis, S.P., Glover, L.W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L.S., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q., McElver, J., Patton, D.A., Martienssen, R., Grossniklaus, U., Ma, H., Law, M., y Levin, J.Z.** (2001). *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**, 1765-1778.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., y Dong, X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., y Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63.
- Cao, H., Li, X., y Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **95**, 6531-6536.
- Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., y Staskawicz, B.J.** (1997). NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science* **278**, 1963-1965.
- Chandra-Shekara, A.C., Navarre, D., Kachroo, A., Kang, H.G., Klessig, D. y Kachroo, P.** (2004) Signalling requirements and role of salicylic acid in *HRT*- and *rrt*-mediated resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis*. *Plant J.* **40**, 647-659.
- Chapple, C.** (1998). Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 311-343.
- Chen, C., y Chen, Z.** (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol.* **129**, 706-716.

## Bibliografía

- Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., y Vartapetian, A.B.** (2004). A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* **16**, 157-171.
- Chong, J., Pierrel, M.A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B., y Saindrenan, P.** (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol.* **125**, 318-328.
- Church, G.M. y Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1991-1995.
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., y Dong, X.** (1998). Uncoupling *PR* gene expression from *NPR1* and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell* **10**, 557-569.
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., y Dong, X.** (2000). Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2175-2190.
- Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X., y Parker, J.E.** (2001). Constitutive disease resistance requires EDS1 in the *Arabidopsis* mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially EDS1-dependent in *cpr5*. *Plant J.* **26**, 409-420.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I.C., Lippok, B., Smith, R.K., Jr., y Bent, A.F.** (2000). The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9323-9328.
- Coffeen, W.C., y Wolpert, T.J.** (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* **16**, 857-873.
- Dangl, J.L., y Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.

- Debeaujon, I., Peeters, A.J., Leon-Kloosterziel, K.M., y Koornneef, M.** (2001). The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**, 853-871.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., y Ryals, J.A.** (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6602-6606.
- Delaney, T.P.** (2000). New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends Plant Sci.* **5**, 49-51.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., y Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., y Marco, Y.** (2003). Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8024-8029.
- Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., y Fobert, P.R.** (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**, 279-290.
- Devadas, S.K., Enyedi, A. y Raina, R.** (2002). The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant J.* **30**, 467-80.

## Bibliografía

- Desveaux, D., Subramaniam, R., Despres, C., Mess, J.N., Levesque, C., Fobert, P.R., Dangl, J.L., y Brisson, N.** (2004). A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **6**, 229-240.
- Devereux, J., Haerberli, P., y Smithies, O.** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Dewdney, J., Reuber, T.L., Wildermuth, M.C., Devoto, A., Cui, J., Stutius, L.M., Drummond, E.P., y Ausubel, F.M.** (2000). Three unique mutants of *Arabidopsis* identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant J.* **24**, 205-218.
- Diener, A.C., Gaxiola, R.A., y Fink, G.R.** (2001). *Arabidopsis* *ALF5*, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell* **13**, 1625-1638.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., y Dangl, J.L.** (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.
- Donaldson, R.P. y Luster, D.G.** (1991). Multiple forms of plant cytochromes P450. *Plant Physiol.* **96**, 669-674.
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, y disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Dong, X., Li, X., Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., y Clarke, J.** (2001). Regulation of systemic acquired resistance by NPR1 and its partners. *Novartis Found Symp.* **236**, 165-173.
- Durrant, W.E., y Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185-209.
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M.H., y Bacher, A.** (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* **5**, R221-233.

- Eisenreich, W., Rohdich, F., y Bacher, A.** (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84.
- Ellis, C., y Turner, J.G.** (2001). The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025-1033.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., y Turner, J.G.** (2002). The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robotzek, S., y Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199-206.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J., y Parker, J.E.** (1999). EDS1, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3292-3297.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., y Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.* **20**, 5400-5411.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willits, M., Cade, R., y Ryals, J.** (2001). NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 1114-1124.
- Frye, C.A., y Innes, R.W.** (1998). An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **10**, 947-956.
- Frye, C.A., Tang, D., y Innes, R.W.** (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 373-378.

## Bibliografía

**Genoud, T., Buchala, A.J., Chua, N.H., y Métraux, J.P.** (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **31**, 87-95.

**Glazebrook, J., y Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8955-8959.

**Glazebrook, J., Rogers, E.E., y Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.

**Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 280-286.

**Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*--2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 301-308.

**Gil, M.J. y Vera, P.** (2004). P69 endopeptidases of the tomato plant. *Handbook of Proteolytic Enzymes 2<sup>nd</sup> Edn.* Elsevier Ltd. **568**, 1835-1838.

**Golldack, D., Vera, P., y Dietz, K.J.** (2003). Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol. Plant.* **118**, 64-73.

**Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., y Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**, 629-643.

**Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., y Ausubel, F.M.** (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563.



- Gu, Y.Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.T., Yang, C., He, X., Han, Y., y Martin, G.B.** (2002). Tomato transcription factors *Pti4*, *Pti5*, and *Pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 817-831.
- Gutiérrez-Nava, M.L., Gillmor, C.S., Jiménez, L.F., Guevara-García, A., y León, P.** (2004). *CHLOROPLAST BIOGENESIS* genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiol.* **135**, 471-482.
- Hammond-Kosack, K.E., y Parker, J.E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 177-193.
- Hanahan, D.J.** (1986). Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 483-509.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., y Hara-Nishimura, I.** (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**, 855-858.
- Innes, R.W.** (1998). Genetic dissection of *R* gene signal transduction pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 299-304.
- Ishikawa, A., Okamoto, H., Iwasaki, Y., y Asahi, T.** (2001). A deficiency of coproporphyrinogen III oxidase causes lesion formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **27**, 89-99.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., y Bevan, M.W.** (1987). *GUS* fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., y Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* **19**, 4004-4014.

## Bibliografía

**Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., y Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13583-13588.

**Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Dong, X., y Glazebrook, J.** (2001). Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires *PAD4*. *Plant J.* **26**, 395-407.

**Jordá, L., Coego, A., Conejero, V., y Vera, P.** (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes in tomato plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 2360-2365.

**Jordá, L., y Vera, P.** (2000). Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of *PR* gene expression. *Plant Physiol.* **124**, 1049-1058.

**Jordá, L., Conejero, V. y Vera, P.** (2000). Characterization of *P69E* and *P69F*, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiol.* **122**, 67-73.

**Jurkowski, G.I., Smith, R.K., Jr., Yu, I.C., Ham, J.H., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Fengler, K.A., y Bent, A.F.** (2004). *Arabidopsis* *DND2*, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 511-520.

**Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., y Klessig, D.F.** (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9448-9453.

**Kawano, T.** (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* **21**, 829-837.

**Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D.R., Kulcsar, F., van Rooijen, G., Waterer, D.R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, R., Howard, R.J., Fischer, R., y Pruffer, D.** (2001). Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6511-6515.

- Keen, NT.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 447-463.
- Kiedrowski, S., Kawalleck, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E., y Dangl, J.L.** (1992). Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis RPM1* disease resistance locus. *EMBO J.* **11**, 4677-4684.
- Kim, H.S., y Delaney, T.P.** (2002). *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell* **14**, 1469-1482.
- Kim, H.S., y Delaney, T.P.** (2002b). Over-expression of *TGA5*, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *Plant J.* **32**, 151-163.
- Kinkema, M., Fan, W., y Dong, X.** (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-2350.
- Kirik, V., Bouyer, D., Schobinger, U., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.M., y Hulskamp, M.** (2001). *CPR5* is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Curr. Biol.* **11**, 1891-1895.
- Klimyuk, V.I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schuenemann, D., Meierhoff, K., Gouet, P., Jones, J.D., Hoffman, N.E., y Nussaume, L.** (1999). A chromodomain protein encoded by the *Arabidopsis CAO* gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. *Plant Cell* **11**, 87-99.
- Koch, E., y Susarenko, A.** (1990). *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2**, 437-445.

## Bibliografía

- Kollas, A.K., Duin, E.C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, I., Ostrovsky, D.N., Hedderich, R., Beck, E., Jomaa, H., y Wiesner, J.** (2002). Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **532**, 432-436.
- Konieczny, A., y Ausubel, F.M.** (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**, 403-410.
- Krüger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L., y Jones, J.D.** (2002). A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* **296**, 744-747.
- Kumar, D., y Klessig, D.F.** (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 16101-16106.
- Laule, O., Furholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W., y Lange, M.** (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6866-6871.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., y Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 863-870.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., y Boedtker, H.** (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., y Dong, X.** (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, *SNII*, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* **98**, 329-339.

- Li, X., Clarke, J.D., Zhang, Y., y Dong, X.** (2001). Activation of an EDS1-mediated *R*-gene pathway in the *sncl* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 1131-1139.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., y Rohmer, M.** (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**, 271-274.
- Lichtenthaler, H.K.** (1999). The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47-65.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., y Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**, 415-429.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balague, C., y Roby, D.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* **8**, 263-271.
- Lorrain, S., Lin, B., Auriac, M.C., Kroj, T., Saindrenan, P., Nicole, M., Balague, C., y Roby, D.** (2004). Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell* **16**, 2217-2232.
- Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R., y Greenberg, J.T.** (2001). The *Arabidopsis-accelerated cell death* gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 771-776.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., y Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743-754.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., y Dangl, J.L.** (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates *RPS2*-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.

## Bibliografía

- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., y Cameron, R.K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 399-403.
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M., y Karpinski, S.** (2004). LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* **136**, 2818-2830.
- Mayda, E., Tornero, P., Conejero, V., y Vera, P.** (1999). A tomato homeobox gene (HD-zip) is involved in limiting the spread of programmed cell death. *Plant J.* **20**, 591-600.
- Mayda, E., Mauch-Mani, B., y Vera, P.** (2000). *Arabidopsis dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. *Plant Cell* **12**, 2119-2128.
- McDowell, J.M., y Dangl, J.L.** (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 79-82.
- Meichtry, J., Amrhein, N., y Schaller, A.** (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol. Biol.* **39**, 749-760.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., y Baulcombe, D.C.** (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J.* **21**, 4511-4519.
- Murray, S.L., Thomson, C., Chini, A., Read, N.D., y Loake, G.J.** (2002). Characterization of a novel, defense-related *Arabidopsis* mutant, *cir1*, isolated by luciferase imaging. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 557-566.
- Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanyom, A., Tor, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., Can, C., Dangl, J.L., y Holub, E.B.** (2002). *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **14**, 993-1003.

- Nandi, A., Krothapalli, K., Buseman, C.M., Li, M., Welti, R., Enyedi, A., y Shah, J.** (2003). *Arabidopsis sfd* mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. *Plant Cell* **15**, 2383-2398.
- Nandi, A., Welti, R., y Shah, J.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **16**, 465-477.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A. y Shinozaki, K.** (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol. Biol.* **55**, 327-342.
- Nawrath, C., y Métraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., y Métraux, J.P.** (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**, 275-286.
- Neuteboom, L.W., Veth-Tello, L.M., Clijdesdale, O.R., Hooykaas, P.J., y van der Zaal, B.J.** (1999). A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res.* **6**, 13-19.
- Ort, D.R., y Baker, N.R.** (2002). A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 193-198.

## Bibliografía

**Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M., y Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant *defensin* gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323

**Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., y Mundy, J.** (2000). *Arabidopsis map kinase 4* negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.

**Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., y van Loon, L.C.** (1998). A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571-1580.

**Ponce de León, I., Sanz, A., Hamberg, M., y Castresana, C.** (2002). Involvement of the *Arabidopsis* alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J.* **29**, 61-62.

**Quail, P.H.** (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: New paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 180-188.

**Querol, J., Campos, N., Imperial, S., Boronat, A., y Rodríguez-Concepción, M.** (2002). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **514**, 343-346.

**Rate, D.N., y Greenberg, J.T.** (2001). The *Arabidopsis aberrant growth and death2* mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J.* **27**, 203-211.

**Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., y Chory, J.** (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor *phytochrome B* alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**, 147-157.



**Ribeiro, A., Akkermans, A.D., van Kammen, A., Bisseling, T., y Pawlowski, K.** (1995). A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* **7**, 785-794.

**Rodríguez-Concepción, M., y Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **130**, 1079-1089.

**Rodríguez-Concepción, M., Fores, O., Martínez-García, J.F., González, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., y Boronat, A.** (2004). Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* **16**, 144-156.

**Rogers S.O. y Bendich A.J.** (1988). Extraction of DNA from plants tissue. *Plant Molecular Biology Manual*, **A6**. Gelvin SB y Schilperoort, (eds) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (Holanda).

**Rohmer, M.** (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574.

**Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., y Delledonne, M.** (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* **6**, 795-803.

**Ross, A.F.** (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340-358.

**Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., y Hunt, M.D.** (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.

## Bibliografía

- Sauret-Güeto, S., Ramos-Valdivia, A., Ibáñez, E., Boronat, A., y Rodríguez-Concepción, M.** (2003). Identification of lethal mutations in *Escherichia coli* genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 408-415.
- Scheel, D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 305-310.
- Schuler, M.A.** (1996). The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.* **112**, 1411-1419.
- Schluter, U., Muschak, M., Berger, D., y Altmann, T.** (2003). Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. *J. Exp. Bot.* **54**, 867-874.
- Schwender, J., Muller, C., Zeidler, J., and Lichtenthaler, H.K.** (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **455**, 140-144.
- Sekizawa, Y., y Mase, S.** (1980). Recent progress in studies on non-fungicidal controlling agent Propenazole, with reference to the induced resistance mechanism of rice plant. *Rev. Plant Protect. Res.* **13**, 114-121.
- Shah, J., Tsui, F., y Klessig, D.F.** (1997). Characterization of a *salicylic acid-insensitive* mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 69-78.
- Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F.** (1999). The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders *defensin* gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**, 191-206.
- Shah, J., Kachroo, P., Nandi, A., y Klessig, D.F.** (2001). A recessive mutation in the *Arabidopsis SSI2* gene confers SA- and NPR1-independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J.* **25**, 563-574.

- Shah, J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 365-371.
- Shah, J.** (2005). Lipids, Lipases, and Lipid-Modifying Enzymes in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 8.1-8.32.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., y Innes, R.W.** (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.
- Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J., y Klessig, D.F.** (2002). A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type *R* gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* **14**, 3149-3162.
- Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B., y Klessig, D.F.** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11640-11645.
- Song, J.T., Lu, H., y Greenberg, J.T.** (2004). Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, *aberrant growth and death2* and *AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1*, encoding novel aminotransferases. *Plant Cell* **16**, 353-366.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., y Métraux, J.P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 235-270.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legry, M., y Fritig, B.** (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**, 687-706.
- Stone, J.M., Heard, J.E., Asai, T., y Ausubel, F.M.** (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of *fumonisin B1-resistant (fbr)* *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* **12**, 1811-1822.

## Bibliografía

**Summermatter, K., Sticher, L., y Métraux, J.P.** (1995). Systemic Responses in *Arabidopsis thaliana* Infected and Challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* **108**, 1379-1385.

**Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Takeda, M., Shah, J., Hase, S., Ikegami, M., Ehara, Y., y Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J.* **32**, 655-667.

**Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., y Machida, Y.** (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* **128**, 4681-4689.

**Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., y Kamoun, S.** (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J. Biol. Chem.* **279**, 26370-26377.

**Tor, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., Can, C., Dangl, J.L., y Holub, E.B.** (2002). *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **14**, 993-1003.

**Tornero, P., Conejero, V., y Vera, P.** (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6332-6337.

**Tornero, P., Conejero, V., y Vera, P.** (1997). Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J. Biol. Chem.* **272**, 14412-14419.

- Tornero, P., y Dangl, J.L.** (2001). A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **28**, 475-481.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.L., Triantaphylides, C., y Roby, D.** (2002). A *R2R3-MYB* gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 10179-10184.
- Vanacker, H., Lu, H., Rate, D.N., y Greenberg, J.T.** (2001). A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **28**, 209-216.
- van Kan, J.A., Joosten, M.H., Wagemakers, C.A., van den Berg-Velthuis, G.C., de Wit, P.J.** (1992) Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol. Biol.* **20**, 513-527.
- van Loon, L.C., y van Kammen, A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". *Virology* **40**, 199-211.
- van Loon, L.C., y van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**.
- van Wees, S.C., de Swart, E.A., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., y Pieterse, C.M.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8711-8716.
- van Wees, S.C., y Glazebrook, J.** (2003). Loss of non-host resistance of *Arabidopsis nahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* **33**, 733-742.

## Bibliografía

**Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., y Linthorst, H.J.** (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* **18**, 779-783.

**Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., y Ryals, J.** (1994). Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *Plant Cell* **6**, 959-965.

**Vidal S., Ponce de León I., Denecke J. y Palva E.T.** (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense via antagonist pathways. *Plant J.* **11**: 115-123

**Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C., y Somerville, S.C.** (2002). *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2095-2106.

**Von Groll, U., Berger, D., y Altmann, T.** (2002). The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* **14**, 1527-1539.

**Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexy, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., y Ryals, J.A.** (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094.

**Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., y Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.

**Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A., y Lamb, C.** (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J.* **23**, 980-988.

- Xiang, C., Miao, Z., y Lam, E.** (1997). DNA-binding properties, genomic organization y expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **34**, 403-415.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., y Lamb, C.** (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**, 2875-86.
- Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X., y Li, X.** (2003). A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in *suppressor of npr1-1, constitutive 1*. *Plant Cell* **15**, 2636-2646.
- Zhang, Y., y Li, X.** (2005). A Putative Nucleoporin 96 Is Required for Both Basal Defense and Constitutive Resistance Responses Mediated by *suppressor of npr1-1, constitutive 1*. *Plant Cell* **17**, 1306-1316.
- Zhao, C., Johnson, B.J., Kositsup, B., y Beers, E.P.** (2000). Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiol.* **123**, 1185-1196.
- Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., y Glazebrook, J.** (1998). PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1021-1030.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., y Klessig, D.F.** (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**, 191-202.