



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural

**Estudio de una salicilato hidroxilasa implicada en la
respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la
infección con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos**

TRABAJO FIN DE GRADO

Titulación: **Biotecnología**

Curso: **2018/2019**

Realizado por:

Silvia María Miguel Montero

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Valencia, Junio 2019

Resumen

Valencia, Junio 2019

Estudio de una salicilato hidroxilasa implicada en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la infección con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd).

Como consecuencia de la selección natural, las plantas han ido evolucionando y desarrollando mecanismos defensivos que les permiten afrontar todas las posibles adversidades presentes en su hábitat. Esta supervivencia dependerá de la capacidad que tenga la planta a su adaptación con el entorno y su tolerancia a una variedad de estreses, ya sean bióticos o abióticos. Cuando la planta reconoce los factores de estrés se produce una red de señalización compleja teniendo como objetivo la activación de los mecanismos defensivos. La activación de dichos mecanismos de defensa resulta en cambios en los niveles de fitohormonas, dentro de las cuales se encuentra el ácido salicílico (SA), considerado como la molécula señal que regula la expresión de los genes relacionados con la defensa frente a patógenos bióticos. Además, en nuestro laboratorio se identificó el ácido gálico (GA), como una señal complementaria al SA en infecciones de tipo sistémico. El catabolismo del SA tiene lugar por la acción del enzima salicilato 5-hidroxilasa (S5H), responsable de la hidroxilación en el carbono 5 del SA para dar lugar a GA.

En el presente Trabajo Final de Grado nos planteamos la caracterización fenotípica, química y molecular de plantas transgénicas de tomate RNAi_5H, previamente generadas en nuestro laboratorio, frente a una infección con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd). Para ello, se llevó a cabo la infección de las plantas tanto transgénicas como parentales con dicho viroide y se han analizado la sintomatología, la acumulación de SA y GA, así como el patrón de expresión de 5H y de PRI –gen marcador de la respuesta defensiva- a lo largo de la infección viroidal.

Hemos observado que los menores niveles de expresión del gen 5H en las plantas transgénicas RNAi_5H llevan consigo una disminución en la actividad salicilato 5-hidroxilasa y, por tanto, unos mayores niveles de acumulación de su sustrato (SA) y unos menores niveles de acumulación de su producto (GA). Nuestros resultados confirman la actividad salicilato 5-hidroxilasa *in vivo* en plantas de tomate. Por otra parte, estos cambios en el metabolismo del SA en las plantas transgénicas provocan un aumento en la expresión de PRI y una mayor resistencia al viroide de la exocortis de los cítricos, lo que parece indicar que este gen juega un papel importante en la respuesta defensiva de las plantas de tomate frente al viroide.

Nuestros estudios refuerzan la importancia de los metabolitos secundarios en la respuesta defensiva de las plantas.

Palabras clave: ácido salicílico (SA), ácido gálico (GA), viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), tomate, salicilato 5-hidroxilasa (S5H).

Autora:

Silvia María Miguel Montero

Directoras:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Abstract

Valencia, June 2019

Study of salicylate hydroxylase involved in the defensive response of tomato plants against infection with the viroid of citrus exocortis (CEVd).

As a result of natural selection, the plants have evolved and developed defensive mechanisms that allow them to face all the possible adversities present in their habitat. The survival will depend on the ability of the plant to adapt to the environment and its tolerance to a variety of stresses, whether biotic or abiotic. When the plant recognizes the stress factors, a complex signaling network is triggered to activate the mechanism. The activation of defense mechanisms results in changes in phytohormone levels, among which is salicylic acid (SA), considered as the signal molecule that regulates the expression of genes related to the defense against biotrophic pathogens. In addition, gentisic acid (GA) was identified in our laboratory as a signal complementary to SA in systemic infections. The catabolism of the SA takes place by the action of the enzyme salicylate 5-hydroxylase (S5H), responsible for the hydroxylation in the carbon 5 of the SA to give rise to GA.

In the present Final Degree Project the phenotypic, chemical and molecular characterization of RNAi_5H tomato transgenic plants created in the laboratory previously against an infection with the viroid of citrus exocortis (CEVd), was performed. Both, transgenic and parental plants, were infected with CEVd. The symptomatology, accumulation of SA and GA, as well as the expression pattern of S5H and PR1 were analyzed throughout the viroidal infection.

It was observed that the lower expression levels of the S5H gene in the RNAi_5H transgenic plants lead to a decrease in salicylate 5-hydroxylase activity and, therefore, higher levels of accumulation of their substrate (SA) and lower levels of accumulation of secondary product (GA). These results confirm the salicylate 5-hydroxylase activity *in vivo* in tomato plants. On the other hand, these changes in the metabolism of SA in transgenic plants cause an increase in the expression of PR1 and a greater resistance to the viroid of citrus exocortis, which seems to indicate that this gene plays an important role in the response defensive of the tomato plants versus the viroid.

Keywords: salicylic acid (SA), gentisic acid (GA), viroid of citrus exocortis (CEVd), tomato, 5-hydroxylase salicylate (S5H).

Author:

Silvia María Miguel Montero

Directors:

Dra. M^a Purificación Lisón Párraga

Dra. M^a Pilar López Gresa

Agradecimientos

Al fin llega el apartado que más ilusión me hace escribir. Llegado este punto, solo me queda agradecer a todas esas personas que han apostado por mí durante todo este tiempo.

Para empezar, me gustaría agradecer enormemente, con la mano en el pecho, con el corazón encogido, con lágrimas entre los ojos y con una sonrisa enorme, a los personajes principales de todo este proyecto: Puri y Mapi. Creo que con vosotras la palabra GRACIAS se queda corta. Por la enorme paciencia, comprensión, confianza, cariño, gratitud, simpatía, ánimo, apoyo, positivismo... y una multitud de adjetivos que podría seguir enumerando, pero no quiero enrollarme demasiado. Gracias por haber sido amigas, madres, tías, pero sobre todo profesionales. Porque desde el primer momento que conocí a Puri en 1 de carrera y a Mapi en prácticas, supe que quería trabajar con vosotras. Me habéis enseñado que la ciencia no es un camino fácil, pero que con constancia, trabajo e ilusión no hay nada que no se pueda conseguir. Gracias por todo lo enseñado, tanto de la vida, como de la ciencia. En definitiva, gracias por haberme hecho crecer tanto como persona, como científica. Sois increíbles.

Por otro lado, también me gustaría agradecer a Ismael y José M^a, que siempre están ahí, para que todo funcione como toca, por vuestra sabiduría, templanza... Gracias por abrirme las puertas en este equipo. Ha sido todo un placer.

Que decir ahora de mis compañeros de trabajo diario, Edu, Fran y Patrick. Me lo he pasado en grande con vosotros. Ha sido todo un placer haber podido compartir gran parte de mis días con vosotros. He aprendido mucho de cada uno de vosotros y tenéis un huequecito en mi corazón. Vais a llegar tan lejos como vosotros queráis, porque sois muy grandes. No cambiéis y mucha suerte. Espero que nuestros caminos se vuelvan a cruzar algún día.

Y ahora quería reservar este apartado especial para Celia Payá Montes. Y es que tú no has sido sólo compañera de trabajo, que también, sino que has sido además el motor del engranaje que me empujaba a seguir y mirar hacia adelante. Porque cuando todo iba mal, las Q's eran desastrosas, o incluso me quedaba sin muestras, tú siempre estabas dispuesta a echarme una mano con positivismo y alegría. La que me animaba a decir que no tirase la toalla, que no todo estaba perdido. Y, es que era llegar al laboratorio, hablar contigo tan solo 5 minutos y ya ponerme de buen humor porque hija lo que no te pase a ti...jjj en fin Celia, no quiero ponerme muy cursi porque sé que esas cosas no van contigo, pero mil gracias por todo, desde el minuto 0 hasta el último has estado ahí conmigo, apoyándome, echándome no solo un cable sino un cableado de telefonía entero si hacia falta. Eres una súper autentica crack. Del laboratorio 2.02/2.03/R, sé que me llevo una amiga.

Agradecer también a mis compañeros de clase, por el día a día, porque siempre os interesabais en saber cómo estaban mis tomates. Especial mención a Carmen Sanz López, porque por las tardes te tocaba a ti escucharme, animarme. Gracias por confiar en mí. Por cierto, ¿para cuando patentamos nuestra BibliOnline? La escritura se me ha hecho mucho más amena estando tú al otro lado de la pantalla. Gracias.

Por último y no menos importante, agradecer a mi familia, mis padres y mi hermano. Porque vosotros si que habéis aguantado de verdad a la RealSilvia en estado puro. Vuestro cariño cálido y paciencia, mucha paciencia, ha sido más que necesario para poder afrontar mi día a día. Especial mención a mi padre, por entender cada paso que daba y ofrecerme siempre una mejora. Os quiero mucho.

Gracias a todos vosotros, hoy soy la persona que soy.

Índice general

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
1.1. VIROIDES: LOS VIRUS “DESCONOCIDOS”	1
1.2. EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS	2
1.2.1. TAXONOMÍA Y SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	3
1.2.2. HOSPEDADORES	4
1.2.3. SÍNTOMAS	4
1.2.4. DETECCIÓN	5
1.2.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA, EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL	5
1.3. SISTEMA DEFENSIVO DE LAS PLANTAS	5
1.3.1. CONSIDERACIONES GENERALES	5
1.3.2. RESPUESTA DEFENSIVA LOCAL	6
1.3.3. RESPUESTA DEFENSIVA SISTÉMICA	7
1.3.4. MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS DE LA RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS	7
1.4. LA ENZIMA SALICILATO 5-HIDROXILASA (S5H) EN PLANTAS DE TOMATE	10
1.4.1. LA ENZIMA SALICILATO 5-HIDROXILASA EN BACTERIAS Y EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	10
1.4.2. LA ENZIMA SALICILATO 5-HIDROXILASA EN PLANTAS DE TOMATE: ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	15
3.1.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS	15
3.1.2. CONDICIONES DE CULTIVO	15
3.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y PROCESO DE INFECCIÓN	16
3.2.1. PREPARACIÓN DE VIROIDE	16
3.2.2. INOCULACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	16
3.3. TOMA DE MUESTRA Y ESTUDIO DE LA SINTOMATOLOGÍA DEL VIROIDE	17
3.4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS SEÑAL: SA Y GA	17

3.4.1.	COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	17
3.4.2.	COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES	18
3.4.3.	ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	18
3.5.	AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	19
3.5.1.	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE EXTRACTOS DE HOJA DE TOMATE	19
3.5.2.	CUANTIFICACIÓN DE RNA	20
3.5.3.	PRECIPITACIÓN DE RNA CON CLORURO DE LITIO (LiCl)	20
3.5.4.	TRATAMIENTO CON DNASA	20
3.5.5.	RETROTRANSCRIPCIÓN	20
3.5.6.	AMPLIFICACIÓN CUANTITATIVA DE DNA (PCR CUANTITATIVA)	21
3.6.	RECURSOS INFORMÁTICOS	21

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **23**

4.1.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA INFECCIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSGÉNICAS RNAi_S5H CON EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS	23
4.1.1.	EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN	23
4.1.2.	SEVERIDAD DE LOS SÍNTOMAS	25
4.2.	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA INFECCIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSGÉNICAS RNAi_S5H CON EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS	27
4.2.1.	ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE SA	27
4.2.2.	ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE GA	29
4.3.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA INFECCIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSGÉNICAS RNAi_S5H CON EL VIROIDE DE LA EXOCORTIS DE LOS CÍTRICOS	30
4.3.1.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>S5H</i>	30
4.3.2.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>PR1</i>	31
		32

CONCLUSIONES **35**

BIBLIOGRAFÍA **37**

Índice de figuras

Figura 1. Esquematación de la estructura secundaria en forma de varilla para los viroides del género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae*. Los dominios están representados en la figura como: C (central), P (patogénico), V (variable), TL (terminal izquierdo) y TR (terminal derecho). Las regiones representadas en verde (TCH), naranja (TCR) y azul (CCR) representan los nucleótidos que forman las regiones conservadas. Estas repeticiones juntos con las que están flanqueadas por flechas en la rama superior de la CCR, indican repeticiones invertidas imperfectas.

Figura 2. Sintomatología CEVD en árboles en la zona de Carrizo. A) Síntomas leves de descamación de la corteza. B) Lesiones en el sistema radicular. C) Lesiones en las raíces. D) Desarrollo pobre en el sistema radicular.

Figura 3. Respuesta defensiva de las plantas tras el ataque de un patógeno. La respuesta local tiene lugar en zona de entrada del patógeno y la respuesta defensiva sistémica, se activa en los tejidos distales por mediación de moléculas señal generadas en el lugar de entrada del patógeno.

Figura 4. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas. Existen dos vías de síntesis de ácido salicílico, a partir del corismato y a partir de la fenilalanina. ICS: Isocorismato Sintasa; IPL: Isocorismato Piruvato Liasa; PAL: Fenilalanina Amonio Liasa; BA2H: ácido benzoico 2-hidroxilasa. (Adaptado de Miura y Tada, 2014).

Figura 5. Reacción de hidroxilación en el C5 del SA por la enzima salicilato 5-hidroxilasa. El ácido salicílico (SA) se hidroxila en el carbono 5 para formar ácido gentísico (GA).

Figura 6. Esquema de la síntesis de GA a partir de SA.

Figura 7. Análisis de expresión de S5H de las distintas líneas transgénicas de tomate Money Maker.

Figura 8. Identificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hojas de tomate. Se muestra un cromatograma con los tiempos de retención específicos para cada uno de los compuestos fenólicos identificados, ácido gentísico y ácido salicílico (de izquierda a derecha) 10,61 y 16,05 respectivamente, con las condiciones cromatográficas empleadas.

Figura 9. Síntomas característicos de la infección causada por CEVD en las plantas MM tras 3spi.

Figura 10. Evolución de la infección por CEVD en plantas de tomate. Aparición de los síntomas a diferentes semanas después de la inoculación de plantas de tomate MM y RNAi_S5H (14.5 y 16.4).

Figura 11. Sintomatología característica por el CEVD tras 2.3spi. De izquierda a derecha se representa, RNAi_S5H 16.4, MM y RNAi_S5H 14.5.

Figura 12. Estudio de la sintomatología en las tres líneas de tomate estudiadas con respecto al tiempo. Se sigue la escala de sintomatología viroidal establecida. Oscila del 0 al 4; siendo 0 identificativo de una planta sin síntoma de infección, y con valor 4 representa una planta totalmente infectada. Se muestra \pm el error estándar de 4 plantas para las plantas infectadas (CEVD), y 3 para las plantas control (MOCK), en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las

plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el $p\text{-value}<0,05$ y con dos asteriscos (**) cuando $p\text{-value}<0,01$.

Figura 13. Acumulación de SA libre y total en plantas MoneyMaker y transgénicas no infectadas (A) o infectadas con CEVd (B). Los extractos metanólicos de las hojas de tomate fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia transcurridas 3 y 4 semanas de la infección. Se muestra \pm el error estándar de 4 plantas para las plantas infectadas (CEVd), y 3 para las plantas control (*mock*), en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el $p\text{-value}<0,05$ y con dos asteriscos (**) cuando $p\text{-value}<0,01$.

Figura 14. Acumulación de GA libre y total en plantas MoneyMaker y transgénicas no infectadas (A) o infectadas con CEVd (B). Se extrajeron compuestos fenólicos de plantas infectadas transcurridas 2,3 y 4 semanas tras la infección. Los extractos metanólicos de las hojas de las plantas de tomate fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia transcurridas 2,3 y 4 semanas de la infección. Se muestra \pm el error estándar de 4 plantas para las plantas infectadas (CEVd), y 3 para las plantas control (*mock*), en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el $p\text{-value}<0,05$, con dos asteriscos (**) cuando $p\text{-value}<0,01$ y con tres asteriscos (***) cuando $p\text{-value}<0,001$.

Figura 15. Análisis de expresión de S5H de las distintas líneas transgénicas de tomate MoneyMaker. Expresión de *S5H* de plantas control y transgénicas a infección con CEVd. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína actina. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes para las infectadas, y de 3 para las *mock*, de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las plantas control y las líneas transgénicas se representan con uno (*) y tres (***) según su valor $p\text{-value}$ oscile entre 0,05 y 0,001, respectivamente.

Figura 16. Expresión de PRI en plantas MoneyMaker control y en las transgénicas RNAi_S5H a lo largo del desarrollo. Niveles de expresión en las plantas transgénicas como en su fondo genético durante la observación del fenotipo de senescencia. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen codificante para la proteína actina. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes para las infectadas, y de 3 para las *mock*, de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las plantas control y las líneas transgénicas se representan con un asterisco (*) cuando el valor $p\text{-value}<0,05$.

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCRs.

Lista de abreviaturas

- 2,3-DHBA:** 2,3-dihidroxibenzoico
- ARN:** ácido ribonucleico
- C:** central
- cDNA:** DNA complementario
- CEVd:** Viroide de la Exocortis de los Cítricos
- DEPC:** Dietilpirocarbonato
- ET:** etileno
- GA:** ácido gentísico
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución
- HR:** Respuesta o reacción hipersensible
- IC:** Isocorismato
- ICS:** enzima isocorismato sintasa
- ICS:** Isocorismato Sintasa
- ICTV:** International Committee on Taxonomy of viruses
- IPL:** enzima isocorismato piruvato liasa
- IPL:** Isocorismato Piruvato Liasa
- JA:** ácido jasmónico
- KDa:** kilo Dalton
- LC-MS:** cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas
- MM:** MoneyMaker
- P:** patogénico
- PR:** Pathogenesis Related
- qRT-PCR:** transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa
- ROS:** Reactive Oxygen Species
- S3H (gen)/ S3H (enzima):** salicilato 3-hidroxilasa
- S5H (gen)/ S5H (enzima):** salicilato 5-hidroxilasa
- SA:** ácido salicílico
- SAR:** Systemic Acquired Resistance
- spi:** semanas post-infección
- TL:** terminal izquierdo
- TMV:** virus del mosaico del tabaco
- TR:** terminal derecho
- V:** variable

Introducción

1.1. Viroides: los virus “desconocidos”

Muchas enfermedades de las plantas, que actualmente se sabe que son causadas por viroides, fueron estudiadas debido al impacto económico perjudicial causado por este patógeno. La enfermedad del tubérculo de la patata se describió por primera vez en los Estados Unidos a principios de la década de 1920, pero tardaron más de 50 años en identificar su agente infeccioso. En 1972, el fisiopatólogo Theodor O. Diener lo describió como un ARN libre de 25-110 KDa, mucho más pequeño que un genoma viral, y lo denominó "viroide". De manera similar, la enfermedad de la "exocortis" de los cítricos se describió por primera vez a finales de los años 40 en los Estados Unidos y hubo que esperar más de 30 años, para que el profesor Joseph S. Semancik demostrara que su agente causal también era un viroide de 125 KDa. En 1977, se descubrió que los viroides causaban enfermedades económicamente importantes en cultivos de hortalizas, árboles frutales, plantas ornamentales y palmeras.

Las moléculas viroidales son ARN circulares muy pequeños, con una longitud de 246 a 401 nucleótidos y con un alto grado de apareamiento de bases internas. Su descubrimiento ha desafiado el dogma central de la herencia genética porque, a diferencia de los virus, están desnudos y carecen de capacidad de codificación de proteínas. Aunque se encuentran solo en las plantas, su descubrimiento allanó el camino para que otros agentes subvirales, como los priones y el virus de la hepatitis delta, fueran reconocidos como patógenos de organismos eucarióticos. Los viroides son los ARN infecciosos más simples de la escala biológica.

Los viroides fueron las primeras moléculas de ARN circular reconocidas en la historia de la biología como genomas no codificantes de replicación independiente (Diener, 1971). Esta propiedad fue demostrada al comparar la eliminación de infectividad del ARN del virus del mosaico del tabaco (TMV) tras tratamientos con exonucleasas frente a la que mostraba el ARN del viroide del tubérculo de la patata (PSTVd) (Diener, 1971). Esta naturaleza circular del genoma viroidal tiene además un papel clave en el proceso de replicación del RNA (Grill y Semanick, 1978). El genoma viroidal se pliega sobre sí mismo adoptando estructuras secundarias en las que los nucleótidos están apareados a través de interacciones Watson-Crick. La circularidad facilita el plegado intramolecular, sirviendo así de protección contra las exonucleasas y endonucleasas (Ricardo Flores, 2012). Aunque el descubrimiento de los viroides está relacionado con alteraciones de las plantas que antes se suponía que eran de etiología viral, el conocimiento de los viroides que las infectan de forma latente ha aumentado considerablemente en las últimas décadas (Flores *et al.*, 2011, 2015; Singh *et al.*, 2003). La aplicación de tecnologías de secuenciación, que analizan el contenido global de ARN y la expansión del campo de investigación del ARN circular, permitirá la identificación de nuevas especies de viroides y hospedadores (Barba *et al.*, 2014; Barba y Hadidi, 2015; Hadidi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014).

Los síntomas de virus y viroides son muy similares tanto a nivel estructural, como metabólico, pero su inducción es diferente ya que los viroides no codifican las proteínas y sus efectos dependen de la estructura de su ARN genómico. Es decir, se tratan de estructuras de RNAs que presentan un genotipo determinado y expresan un fenotipo sin recurrir a la traducción de ninguna proteína (Ricardo Flores *et al.*, 2012). A nivel general, el retraso en el crecimiento es el síntoma viroidal más visible, pero también se pueden observar alteraciones dramáticas a nivel foliar (distorsión, epinastia, rugosidad, clorosis y necrosis), en los tallos (acortamiento y

engrosamiento), en la corteza (agrietamiento, descamación, engomado, picadura y enclavamiento), en los tubérculos (malformación), y en los órganos reproductores como flores, y frutas (alteraciones de color y forma, así como reducción en número). La intensidad de los síntomas varía en función del huésped y de la secuencia del viroide (Hadidi *et al.*, 2003), aunque aparentemente, los hospedadores de los viroides son bastante comunes. (Matsushita y Tsuda, 2015; Singh y Dilworth, 2009; Singh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014). Esto puede convertirse en un problema si se produce una transmisión mecánica desde reservorios de viroides sin síntomas a huéspedes sensibles como ocurre en el cultivo en invernadero de tomates y plantas ornamentales. Además del huésped y su cultivar, las condiciones de crecimiento, especialmente la intensidad de la luz y la temperatura, pueden afectar el desarrollo de los síntomas (Walia *et al.*, 2014). Las altas temperaturas y la intensidad de la luz se han considerado favorables para la expresión de síntomas graves y posiblemente expliquen por qué los viroides son importantes en los sistemas de producción (sub) tropicales y de invernadero (Diener, 1987; Flores *et al.*, 2011).

La transmisión horizontal es el modo de dispersión más importante para la mayoría de los viroides. Los utensilios agrícolas contaminados, maquinaria, herramientas (por ejemplo, tijeras de podar, cuchillos de injerto), incluso manos, guantes y ropa pueden ser fundamentales en la transmisión mecánica de viroides. La agricultura contemporánea se basa en grandes áreas de producción de monocultivos en las que la alta densidad de plantas genéticamente uniformes puede facilitar la transmisión de viroides desde plantas de origen infectadas. Las fuentes de inóculo son frecuentemente hojas y tallos. Los tubérculos, las flores, las frutas y las semillas también pueden ser importantes vehículos de transferencia viroidal, dependiendo de la combinación del huésped-viroide, ya que los viroides se encuentran en prácticamente todos los órganos y tipos de tejidos de las plantas (Di Serio *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2003). En consecuencia, el injerto, la propagación vegetativa o *in vitro* de la planta son modos efectivos de transmisión de viroides que también se usan en procedimientos experimentales. Sin embargo, las inoculaciones mecánicas por corte de tallo, punción del tallo o frotamiento de las hojas se usan con más frecuencia (Hadidi *et al.*, 2003).

1.2. El viroide de la exocortis de los cítricos

La enfermedad de la "exocortis" se describió por primera vez como una descamación de la corteza que afecta al rizoma de cítricos de naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) (Fawcett y Klotz, 1948). Un trastorno similar también se describió como el "trastero escamoso" de la naranja trifoliada en Australia (Benton *et al.*, 1949) y como la "enfermedad de la cal de Rangpur" que afectaba a las raíces de los naranjos (*Citrus limonia*) (Moreira, 1955). Se demostró que esta enfermedad, ahora denominada exocortis, es transmisible por injerto (Benton *et al.*, 1950; Bitters, 1952) y el agente etiológico se consideró un virus hasta que los viroides se describieron como una nueva clase de patógenos de plantas (Diener, 1971; Semancik, 1972). La importancia económica de la exocortis se debe a la reducción del tamaño de los árboles y la producción de frutos producidos por el CEVd. Como ya se ha comentado, las altas temperaturas e intensidades de luz favorecen la expresión de los síntomas y la acumulación de viroides (Carbonell *et al.*, 2008), por lo que los cultivos tropicales, subtropicales e invernaderos son los principalmente afectados.

La presencia del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) también se ha identificado *in vivo* (Flores *et al.*, 1985), tomate (Mishra *et al.*, 1991) y otras especies de cultivos vegetales (Fagoaga *et al.*, 1995; Fagoaga y Duran-Vila, 1996) y ornamentales que generalmente actúan como portadores sin síntomas.

1.2.1. Taxonomía y secuencia nucleotídica

El CEVd consiste en una secuencia de 371 nucleótidos con una estructura secundaria en forma de varilla (Gross *et al.*, 1982; Visvader *et al.*, 1982) que pertenece al género *Pospiviroid* dentro de la familia *Pospiviroidae*, según los criterios de ‘International Committee on Taxonomy of viruses’ (ICTV). Carece de actividad de auto escisión del ARN y contiene una región central formada por dos conjuntos de nucleótidos en la cadena superior e inferior de su estructura secundaria en forma de varilla y una región terminal. La estructura en forma de barra tiene cinco dominios estructurales: terminal izquierdo (TL), patogénico (P), central (C), variable (V) y terminal derecho (TR) (Keese y Symons, 1985) (Figura 1).

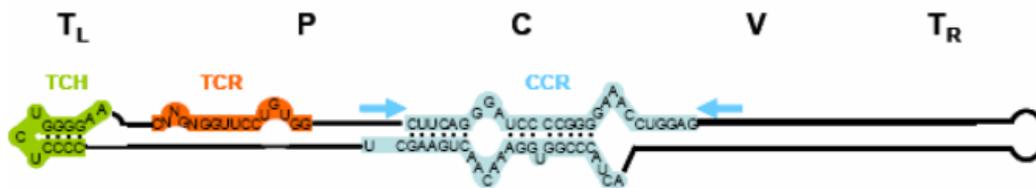


Figura 1. Esquematación de la estructura secundaria en forma de varilla para los viroides del género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae*. Los dominios están representados en la figura como: C (central), P (patogénico), V (variable), TL (terminal izquierdo) y TR (terminal derecho). Las regiones representadas en verde (TCH), naranja (TCR) y azul (CCR) representan los nucleótidos que forman las regiones conservadas. Estas repeticiones junto con las que están flanqueadas por flechas en la rama superior de la CCR, indican repeticiones invertidas imperfectas (Minoia S, 2015).

Estos dominios estructurales, además, tienen un papel importante en la reorganización intramolecular del ARN contribuyendo a la evolución del viroide (Keese and Symons, 1985; Koltunow and Rezaian, 1989), ya que están asociados con funciones específicas; por ejemplo, el dominio P está relacionado con la expresión de la sintomatología (Sano *et al.*, 1992; Qi and Ding, 2003).

Utilizando el tomate como huésped experimental, clasificaron los aislamientos de CEVd en severos (Clase A) y leves (Clase B) (Visvader y Symons 1985, 1986). Ambas clases diferían en tan solo 26 nucleótidos y en la inducción de síntomas en *gynura* (Chaffai *et al.*, 2007). La secuenciación de aislados adicionales evidenció tanto la existencia de cepas diferentes a la Clase A y B, como que la relación entre la secuencia y la patogenicidad era más compleja que la propuesta inicialmente.

Se definió un aislado de CEVd como el ARN de un sólo árbol que podría consistir en una o más variantes de secuencia. Se identificaron aislados que contenían mezclas de variantes y plantearon la hipótesis de que se debía a una alta tasa de errores de copia del ARN polimérico involucrado en la replicación, o al resultado de varias transmisiones de viroides. Sin embargo, posteriormente, se demostró que los viroides muestran una alta diversidad genética debido a la ausencia de actividad de corrección de pruebas de las ARN polimerasas, generando así poblaciones de mutantes que varían en torno a una secuencia de consenso. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos también pueden ser el resultado de la selección del huésped y del tejido (Semancik *et al.*, 1993) (Murcia *et al.*, 2011).

1.2.2. Hospedadores

CEVd, al igual que otros pospiviroides, tiene un amplio rango de hospedadores. Afecta a diferentes especies de cítricos como *Poncirus trifoliata* y sus híbridos, lima rangpur (*Citrus limonia*), limón (*C. limon*) y citron etrog (*C. media*) (Lin *et al.*, 2015^a), tiene varios hospedantes como vid (*Vitis vinífera*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), haba (*Vicia faba*), pepino (*Cucumis sativus*), ortiga de terciopelo (*Gynura aurantiaca*), crisantemo (*Crysanthemum morifolium*), impatiens (*Impatiens walleriana*), verbena (*Verben x hybrida*) (Skoric *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009; Palukaitis 2014) y petunia (*Petunia spp.*) (Van Brunshot *et al.*, 2014).

La transmisión del viroide se lleva a cabo por injerto de yemas infectadas en árboles sanos o de forma mecánica (Lin *et al.*, 2015^a) a través del uso de la herramienta de corte y poda contaminada.

1.2.3. Síntomas

Los efectos de los viroides sobre el rendimiento y calidad de la cosecha de los cítricos son altamente dependientes de la especie, variedad, patrón, tipo de aislamiento viroidal y de las condiciones ambientales en las que se desarrollan (Pethybridge *et al.*, 2008). Los resultados de los ensayos de campo realizados con árboles de clementina de naranja trifoliada mostraron que el CEVd induce los síntomas de descamación de la corteza y los bultos visibles en la madera. Los árboles infectados muestran una reducción de su tamaño y del rendimiento (Vernière *et al.*, 2004). También se inducen síntomas similares, pero más leves en árboles sobre *Carrizo citrange* (Murcia *et al.*, 2015), que desarrollan síntomas de craqueo de la corteza asociados con lesiones de las raíces y un desarrollo deficiente del sistema radicular general (**Figura 2**).

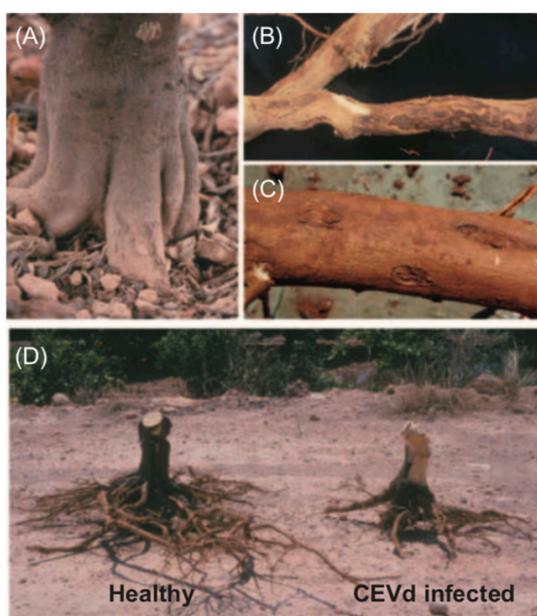


Figura 2. Síntomatología causada por el CEVd en árboles en la zona de Carrizo. A) Síntomas leves de descamación de la corteza. B) Lesiones en el sistema radicular. C) Lesiones en las raíces. D) Desarrollo pobre en el sistema radicular (Adaptado por Hadidi *et al.*, 2017).

Bajo condiciones de campo, el CEVd causa clorosis de racimos y / o hojas en el tomate (Mishra *et al.*, 1991; Verhoeven *et al.*, 2004), mientras que otras plantas naturalmente infectadas como la vid y varias especies vegetales (haba, berenjena, nabo y zanahoria) actúan como portadores sin síntomas (Fagoaga *et al.*, 1995; Fagoaga y Duran-Vila, 1996).

En condiciones experimentales de temperaturas y fotoperiodos controlados, las plantas de tomate infectadas por CEVd presentan claros síntomas de enanismo, espinastia y clorosis.

1.2.4. Detección

Con el desarrollo de los procedimientos de análisis de ácidos nucleicos, las pruebas de clasificación biológica han sido reemplazadas por técnicas moleculares de rápida evolución. La electroforesis teñida con bromuro de etidio fue la primera técnica molecular utilizada para la detección de CEVd, pero la sensibilidad requiere un nivel de acumulación adecuado. Se logró una mayor resolución utilizando sistemas electroforéticos bidimensionales, tras una tinción con plata que permitieron la visualización de formas circulares de viroides.

Actualmente, se han propuesto varios enfoques de RT-PCR (Hadidi y Yang, 1990; Levy *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1992) con algunas modificaciones para simplificar la preparación de la muestra y definir los pares de cebadores más adecuados. Ya se ha conseguido una RT-PCR de un solo paso para evitar la contaminación cruzada del amplicón durante el diagnóstico de rutina (Bernad y Duran-Vila, 2006). Una serie de protocolos de extracción y tipos de enfoques analíticos se presentan con gran detalle en (Owens *et al.*, 2012).

1.2.5. Distribución geográfica, epidemiología y control

El CEVd y otros viroides cítricos están muy extendidos en todos los países productores de cítricos. El control químico para el combate de la enfermedad no existe y el único medio de control es la prevención con el uso de material propagativo libre de viroides (Papayiannis, 2014; Gergerich *et al.*, 2015) que provenga de bancos de germoplasma y viveros que cumplan de forma obligatoria con diagnósticos biológicos y moleculares.

Por otra parte, para disminuir las pérdidas causadas por los viroides, se han desarrollado diferentes estrategias (Flores *et al.*, 2017). Entre ellas cabe destacar la búsqueda de cultivos resistentes, el uso de ribonucleasas que actúan en RNAs de doble cadena o anticuerpos catalíticos provistos con actividad ribonucleasa intrínseca, y el uso de RNAs de ambos sentidos, autocatalíticos con cabezas de martillo y RNAi.

1.3. Sistema Defensivo de las Plantas

1.3.1. Consideraciones generales

Las plantas luchan por su supervivencia, y para ello, han desarrollado mecanismos defensivos que afrontan todas las posibles adversidades presentes en su hábitat. Esta supervivencia dependerá de la capacidad que tenga la planta a su adaptación con el entorno y su tolerancia a una gran variedad de estreses, ya sean bióticos (como viroides, virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos) como abióticos (salinidad, sequía, frío, calor, contaminación, etc).

En cuanto a los estreses bióticos, la planta desarrolla unos mecanismos defensivos constitutivos (resistencia pasiva) o inducibles (resistencia activa) muy eficaces para poder hacer frente a un amplio abanico de patógenos.

Por un lado, la resistencia pasiva se caracteriza por el conjunto de elementos que ya dispone la planta antes de que tenga lugar la interacción con el patógeno. Pueden ser tanto de naturaleza estructural (cutículas, tricomas, pared celular etc.) como de naturaleza química (compuestos fenólicos, derivados sulfonados, saponinas, proteínas de defensa, etc.). Estos compuestos

químicos reciben el nombre de “secundarios”, y su función es fundamentalmente defensiva (Baker *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 2001; Staal y Dixelius, 2007).

Por otro lado, la resistencia activa toma protagonismo cuando la planta reconoce los factores de estrés producidos o liberados por el patógeno. En este punto, se produce una red de señalización compleja, interconectada y coordinada, cuya finalidad es la activación de los mecanismos de defensa inducibles (Conejero *et al.*, 1990; Ebel y Cosio, 1994; Hahn, 1996; Nürnberger, 1999). Las moléculas más estudiadas que participan en esta red señalización son el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Pieterse *et al.*, 2001; Kunkel y Brooks, 2002).

Una vez que ha sido reconocido el patógeno por parte de la planta, se desencadena una activación de la respuesta defensiva tanto a nivel local como sistémico. La primera respuesta defensiva en activarse es la local, que tiene lugar en zona de entrada del patógeno e impide que la infección se extienda a toda la planta. En cuanto a la respuesta defensiva sistémica, se activa por mediación de moléculas señal generadas en el lugar de entrada del patógeno y tiene como consecuencia la protección a la planta frente futuros ataques patogénicos (**Figura 3**).

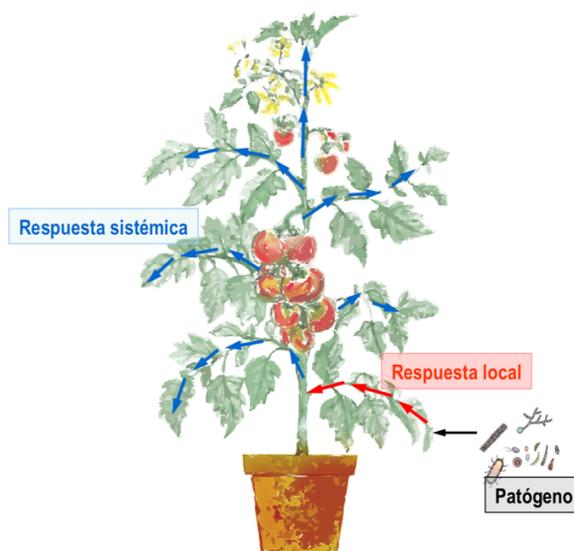


Figura 3. Respuesta defensiva de las plantas tras el ataque de un patógeno. La respuesta local tiene lugar en zona de entrada del patógeno y la respuesta defensiva sistémica, se activa en los tejidos distales por mediación de moléculas señal generadas en el lugar de entrada del patógeno.

1.3.2. Respuesta defensiva local

Ya reconocido el patógeno por parte de la planta, se produce una despolarización muy rápida de la membrana plasmática de la célula vegetal que ha sido infectada; los transportadores iónicos, como la bomba H^+ -ATPasa, se ven alterados. Como consecuencia, se acumula Ca^{2+} en el citoplasma y provoca la salida extracelular de Cl^- y K^+ , por tanto, se produce una acidificación en el citoplasma y una alcalinización del apoplasto (Trewavas y Malhó, 1998; White y Broadway, 2003).

La variación de concentración de Ca^{2+} en el citosol juega un papel muy importante en el establecimiento de las barreras defensivas, ya que está implicado en la deposición de callosa en las paredes, en la síntesis de fitoalexinas y en la alteración en las quinasas y fosfatasa que se traducen en una activación del complejo NADPH oxidasa (Blumwald, *et al.*, 1998).

La activación del complejo NADPH oxidasa provoca la presencia de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) como el radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Xiang *et al.*, 1997). Estas especies ROS resultan tóxicas para la planta, a pesar de que contribuyen a los mecanismos de defensa de la planta (Torres *et al.*, 2006) y son las responsables de activar algunos genes protectores que van a activar el proceso de muerte celular programada en la respuesta hipersensible (HR) (Romero-Puertas *et al.*, 2004).

Cuando tiene lugar el reconocimiento gen a gen entre el factor codificado por el gen *R* de la planta y el correspondiente factor de avirulencia del patógeno codificado por el gen *Avr* (Flor, 1971) se desencadena una respuesta local de tipo incompatible, y la HR es el primer síntoma fenotípico que permite reconocer que la planta ha respondido al patógeno, ya que se produce la muerte celular en el lugar de la entrada del patógeno. Aunque, se ha observado también que la inoculación del patógeno provoca muerte celular en hojas distales no inoculadas, proceso conocido como microHR (Alvarez *et al.*, 1998). Cuando no tiene lugar el reconocimiento gen a gen y la interacción es de tipo compatible, la HR no tiene lugar, por lo que no se establece, la respuesta defensiva y la infección se extiende por toda la planta (Lorrain *et al.*, 2003).

1.3.3. Respuesta defensiva sistémica

La infección con un patógeno necrosante o la aparición de la respuesta hipersensible (HR) lleva consigo la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR, Systemic Acquired Resistance) en los tejidos distales. Este fenómeno va a proteger a la planta frente a futuros ataques patogénicos.

La SAR conlleva la activación de genes de defensa, ya sea en tejidos distales como en locales, entre los que se encuentran las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, Pathogenesis-Related) (Ward *et al.*, 1991; Glazebrook, 1999; 2001; Maleck *et al.*, 2000).

Las proteínas PR se clasifican en 17 familias (van Loon *et al.*, 1994) y, todas tienen como función la limitación de avance del patógeno (van Loon *et al.*, 2006). Su acumulación es diferencial y específica tras una determinada señal patogénica. Esto explica el hecho de que las plantas transgénicas que sobreexpresan una única o unas pocas de estas proteínas resultan sólo eficaces para generar resistencia frente a patógenos muy concretos (van Loon *et al.*, 2006).

Por otra parte, las proteínas PR también se inducen en interacciones de tipo compatible, en otras palabras, en infecciones sistémicas. Este sería el caso de las plantas de tomate infectadas con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd). En este tipo de interacción se observa la acumulación de hasta 10 PRs diferentes. La mayoría de estas proteínas se inducen también en plantas de tomate tratadas con etefón (compuesto que libera etileno en la planta) y algunas de ellas, como P23, P32 y P34, no responden a la aplicación exógena de SA (García-Breijo *et al.*, 1990; Rodrigo *et al.*, 1991 y 1993). Por tanto, esto implicaría que dichas PRs, propias de una interacción compatible, podrían no estar relacionadas con el establecimiento de SAR (Brederode *et al.*, 1991; Durner *et al.*, 1997).

1.3.4. Moléculas señalizadoras de la respuesta defensiva de las plantas

Las fitohormonas son metabolitos que controlan un gran número de procesos en las plantas, entre ellos destacan su crecimiento y desarrollo. Además, desempeñan un papel fundamental en la respuesta frente a diferentes tipos de estrés. Se ha estudiado que la infección de plantas con patógenos de distinta naturaleza provoca variaciones en los niveles de las hormonas vegetales (Adie *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Entre ellas caben destacar: el etileno (ET), el

ácido salicílico (SA), el ácido gentísico (GA) y el ácido jasmónico (JA) (Bellés et., al 1999; Broekaert *et al.*, 2006; Loake y Grant, 2007; Balbi y Devoto, 2008).

Estudios recientes han demostrado la implicación de otras fitohormonas en la señalización de la respuesta defensiva en plantas, tales como, el ácido abscísico, las auxinas, el ácido giberélico, las citoquininas, los brasinoesteroides y hormonas peptídicas (Bari y Jones, 2009).

Se dedica a continuación unos apartados al ácido salicílico y al ácido gentísico, las moléculas señalizadoras implicadas en la interacción planta-patógeno objeto de estudio, en los que se desarrollan con detalle el papel de estos compuestos en las respuestas defensivas de las plantas frente a ataques patogénicos.

1.3.4.1. Ácido salicílico

El SA (ácido 2-hidroxibenzoico) es un compuesto fenólico implicado en multitud de procesos en las plantas. Este compuesto es de especial interés en la industria farmacéutica debido a, su efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético (Pierpoint, 1997; Mackowiak, 2000). En plantas, participa en procesos de desarrollo como la germinación de semillas o el crecimiento celular, aunque su función mejor caracterizada es la de actuar como molécula señal capaz de activar la respuesta defensiva y aumentar así la resistencia frente a diferentes ataques patogénicos (Boatwright y Pajeroska-Mukhtar, 2013).

El incremento de los niveles endógenos de SA y sus derivados glicosilados en plantas infectadas está relacionado con la activación de genes que codifican proteínas PR y establecen la resistencia de la planta (Delaney *et al.*, 1994).

La mayor parte del SA presente en la planta se conjuga a una molécula de glucosa, a través de su grupo alcohol para formar SA-O- β -glucósido, y queda almacenado en el interior de la vacuola, evitando su efecto tóxico en las células y aumentando su solubilidad, lo que favorece su transporte en la planta. Cuando la planta es infectada por un patógeno, el SA conjugado se libera por la acción de glucosil hidrolasas (Dean *et al.*, 2005). El incremento de los niveles de SA en una infección coincide con la activación de los genes que codifican proteínas PRs, relacionándose así con la resistencia de la planta (Shah, 2003).

En cuanto a la biosíntesis del SA, se ha descrito que puede ser formado a partir de dos vías enzimáticas que comparten el mismo sustrato, el corismato, producto final de la vía del shikimato (Garcion y métraux, 2006; Chen *et al.*, 2009).

El corismato puede ser convertido en SA via isocorismato (IC), en un proceso de dos etapas que implica la participación de los enzimas Isocorismato Sintasa (ICS) e Isocorismato Piruvato Liasa (IPL) (Verberne *et al.*, 2000; Wildermuth *et al.*, 2001). Y, por otra parte, el corismato también puede convertirse en pefrenato, en la vía para la producción de fenilalanina. A partir de este aminoácido se genera ácido cinámico el cual puede ser oxidado (ácido benzoico) o hidroxilado (ácido cumárico) para sintetizar el SA (**Figura 4**). La mayor parte del SA producido durante la infección patogénica y el establecimiento de la SAR es sintetizado en la planta a partir de la ruta biosintética del isocorismato (Willdermuth *et al.*, 2001).

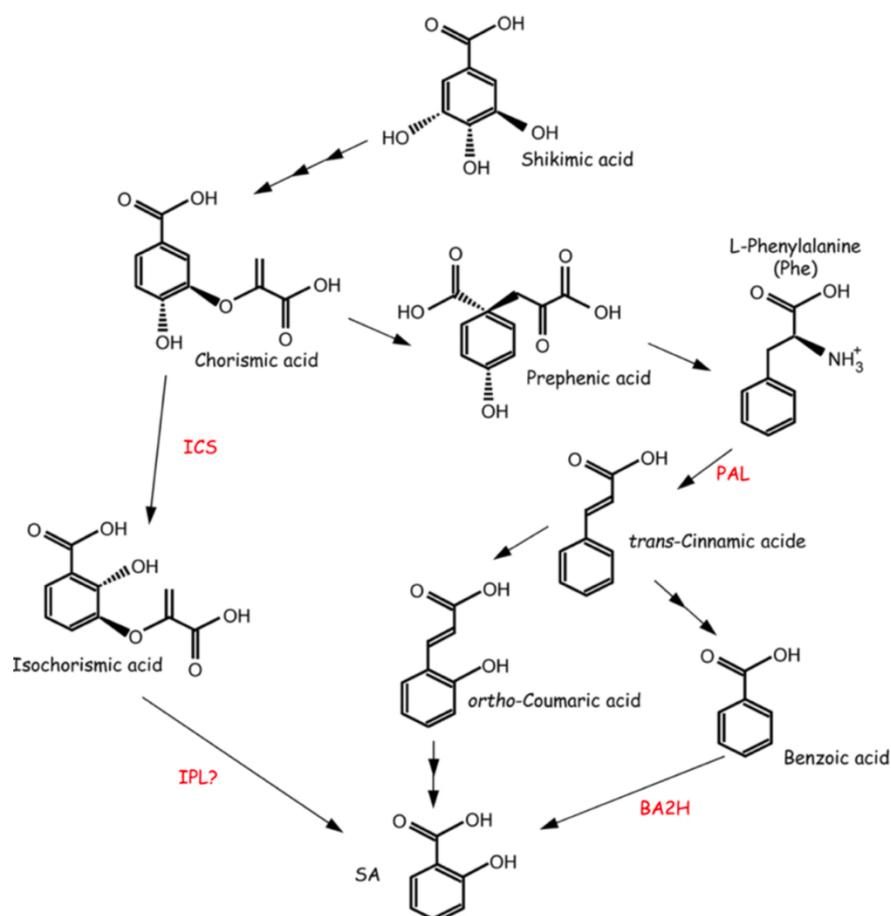


Figura 4. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas. Existen dos vías de síntesis de ácido salicílico, a partir del corismato y a partir de la fenilalanina. ICS: Isocorismato Sintasa; IPL: Isocorismato Piruvato Liasa; PAL: Fenilalanina Amonio Liasa; BA2H: ácido benzoico 2-hidroxilasa. (Adaptado de Miura y Tada, 2014).

1.3.4.2. Ácido gentísico

Se admite que el SA posee una función esencial en la activación de la respuesta defensiva en las plantas frente a infecciones de tipo incompatible (Conejero *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1997; Durrant y Dong, 2004). Sin embargo, los estudios sobre la inducción de defensas de tipo compatible son más escasas. En estos casos, al no ser reconocido el patógeno, la respuesta se produce demasiado tarde y no se puede evitar el desarrollo de la enfermedad. Por lo que, todavía son muchas incógnitas las que quedan por resolver en este tipo de interacciones.

El ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, GA) es un compuesto fenólico, formado a partir de la hidroxilación en el carbono 5 del ácido salicílico y es llevada a cabo por la enzima salicilato 5-hidroxilasa (S5H) (**Figura 5**). Esta hidroxilación fue descrita por primera vez en tejido animal (Lutwak-Mann, 1943) y más tarde en planta (Ibrahim y Towers, 1959).

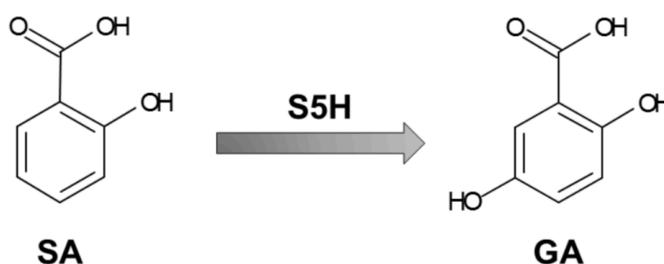


Figura 5. Reacción de hidroxilación en el C5 del SA por la enzima salicilato 5-hidroxilasa (S5H). El ácido salicílico (SA) se hidroxila en el carbono 5 para formar ácido genticóico (GA).

Dicho compuesto fue identificado en nuestro laboratorio por primera vez durante el estudio de una interacción de tipo compatible en plantas de tomate infectadas con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) (Bellés *et al.*, 1999). Se observó que las plantas infectadas acumulaban niveles de GA mucho más altos que los de SA, tanto en la forma libre como en la conjugada.

El GA en general se conjuga con una molécula de xilosa a través del alcohol en la posición 5, a diferencia del SA que lo hace con la glucosa (Fayos *et al.*, 2006). La acumulación de GA coincide con la aparición de los primeros síntomas y aumenta paralelamente con la enfermedad. En nuestro laboratorio se ha demostrado que tratamientos exógenos con GA, así como con SA, inducen resistencia a ToMV en tomate y a CEVd en *Gynura auriantica*, confirmando así el papel señalizador de esta molécula (Granell *et al.*, 2014). Así pues, se puede afirmar que el GA es una molécula, complementaria al SA, implicada en la señalización y en la activación de respuesta defensiva en infecciones compatibles.

1.4. La enzima Salicilato 5-hidroxilasa (S5H) en plantas de tomate

1.4.1. La Enzima Salicilato 5-hidroxilasa en bacterias y en *Arabidopsis thaliana*

A día de hoy sigue sin resolverse el catabolismo del SA en planta, por lo que este tema es de gran interés por parte de nuestro grupo de investigación, interesado en el estudio de la señalización y respuesta de las plantas frente a un estrés biótico. Como se ha comentado anteriormente, el SA puede ser degradado convirtiéndose en GA, mediante una hidroxilación en el C5 del anillo aromático. Esta actividad salicilato 5-hidroxilasa ha sido descrita en bacterias (*Ralstonia* sp. Cepa U2) y es llevada a cabo por un conjunto de 3 proteínas codificadas por 4 genes: la monooxigenasa NahGH, codificada por los genes *NahG* y *NahH*, una ferredoxina reductasa codificada por *NagAa* y una ferredoxina codificada por *NagAb* (Zhou *et al.*, 2002) (**Figura 6**).

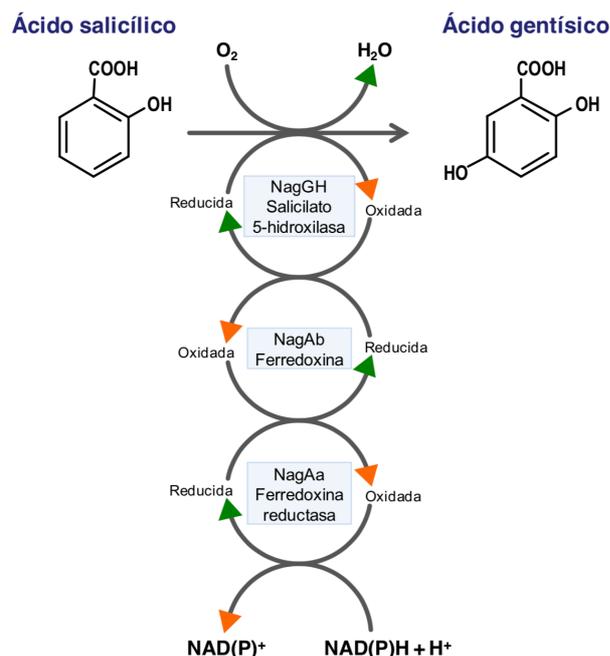


Figura 6. Esquema de la síntesis de GA a partir de SA. (Adaptado de Fuenamyor *et al.*, 1998).

En plantas, se ha descrito una salicilato 3-hidroxilasa (S3H) como enzima implicada en el catabolismo de SA. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* muestran que el gen *S3H*, que es inducido por SA, es capaz de convertir *in vitro* el SA en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y GA (2,5-DHBA) evitando la acumulación de SA (Bartsch *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Además, los mutantes *s3h* confirman la actividad catalítica hacia 2,3-DHBA *in vivo*. Estos mutantes presentaron una senescencia precoz, lo que llevó a los autores a pensar que el SA es un componente clave en la senescencia foliar (Zhang *et al.*, 2013). Posteriormente, estos mismos autores describieron *S5H/DMR* (Downy Midlew Resistant6) como gen que codifica para una salicilato 5-hidroxilasa, que resulta ser una isoforma de la anteriormente descrita como *S3H* (Zhang *et al.*, 2017).

1.4.2. La Enzima Salicilato 5-hidroxilasa en plantas de tomate: Antecedentes

En nuestro laboratorio se llevó a cabo la búsqueda del gen de tomate ortólogo al *S3H* que había sido descrito en *Arabidopsis* y se propuso la secuencia NM_001246911.1 como su posible ortólogo (Camps, 2014). Para verificar la expresión del gen propuesto, se llevaron a cabo varias infecciones de plantas de tomates con patógenos de distinta naturaleza. Como consecuencia de la infección, se observó una correlación entre la cantidad de GA acumulada y la inducción del gen propuesto como *S5H* (salicilato 5-hidroxilasa), cuyo producto es precisamente este compuesto fenólico.

Para comprobar la actividad *in vivo* del enzima, se preparó una construcción en un vector binario para lograr la sobreexpresión de *S5H* mediante expresión transitoria con *Agrobacterium tumefaciens* (Hernández, 2015). El estudio fue realizado en plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas exógenamente con SA, el sustrato de la enzima *S5H*. Ya comprobada la expresión de esta enzima en las plantas a las que se les ha aplicado este tratamiento, se procedió al estudio de la actividad salicilato 5-hidroxilasa *in vivo* mediante análisis de SA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por un lado, se analizaron los niveles de SA libre y total, se observó que

las plantas que habían sido inoculadas con las cepas de *Agrobacterium* que contenían la construcción pGWB8-S5H presentaban una reducción significativa en la cantidad de SA libre y total con respecto a las plantas control. Por otro lado, se analizaron los niveles libres y totales de GA y de 2,3-dihidroxibenzoico con el fin de detectar los productos de la reacción, pero no se observó un incremento significativo de ninguno de los dos compuestos (Hernández, 2015). Estos resultados, indicaron que el SA es el sustrato de la enzima codificada por el gen propuesto como *S5H*.

A continuación, se procedió a la transformación de plantas de tomate de la variedad MoneyMaker (MM) para que silencien o en su defecto reduzcan la expresión del gen *S5H* mediante RNA de interferencia (RNAi_ *S5H*). La finalidad de este experimento es estudiar la función que desempeña el gen *S5H* en la regulación de los niveles endógenos de SA, utilizándose la secuencia usada anteriormente para expresión transitoria en *Nicotiana*.

Para la caracterización molecular de las plantas de tomate transgénicas RNAi_ *S5H* generadas previamente en el laboratorio, se llevó a cabo en primer lugar un estudio de su expresión génica mediante qRT-PCR en las líneas transgénicas (RNAi_ *S5H* 16; 14; 6.1) y en su fondo genético (MM Control), a las 24h después de haber sido infectadas con la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* (Minguillón, 2018) (Figura 7).

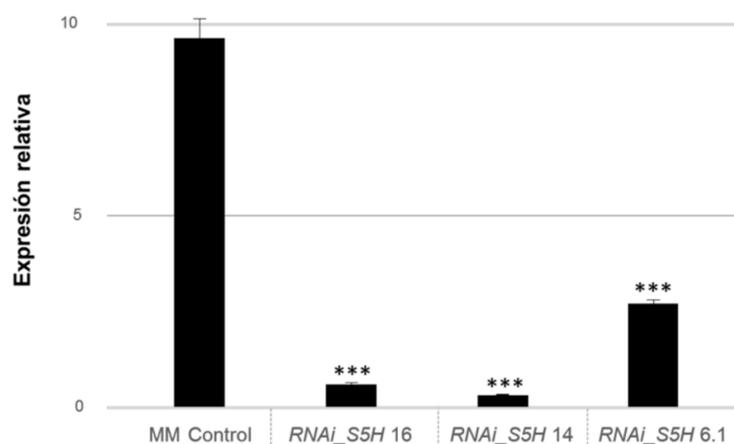


Figura 7. Análisis de expresión de *S5H* de las distintas líneas transgénicas de tomate Money Maker.

Como se observa la figura 7, las tres líneas transgénicas presentan una disminución significativa de la expresión del gen con respecto a su fondo genético MM tras la infección con la bacteria, confirmando el silenciamiento de *S5H* en las plantas transgénicas en el laboratorio.

Asimismo, estas líneas transgénicas presentaron unos niveles basales de SA superiores a las de sus correspondientes plantas control y una mayor resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae pv. tomato*, confirmando así la actividad *in vivo* de este enzima y su función en la respuesta defensiva. Por último, se observó un fenotipo de senescencia avanzada en estas plantas transgénicas, sugiriendo que el catabolismo del SA desempeña un papel importante en la senescencia de las plantas (Minguillón 2018).

A lo largo de esta Introducción se han descrito los mecanismos defensivos de las plantas frente al viroide exocortis de los cítricos (CEVd), las moléculas señal implicadas en la respuesta defensiva, así como el uso de plantas transgénicas con niveles alterados de las mismas como estrategia para estudiar su posible papel en defensa. Además, hemos visto que la salicilato 5-hidroxilasa podría actuar como un enzima que conectara las rutas de señalización mediadas por SA y GA en interacciones compatibles. El presente Trabajo Final de Grado pretende profundizar en estudio del papel defensivo del SA, y GA, así como de la salicilato 5-hidroxilasa, en la respuesta defensiva de las plantas de tomate.

2

Objetivos

En el presente Trabajo Fin de Grado se pretende llevar a cabo la caracterización de las plantas transgénicas de tomate RNAi_55H frente a una infección con el viroide exocortis de los Cítricos (CEVd). Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

- I. Estudio fenotípico de las plantas transgénicas de tomate RNAi_55H así como de sus líneas parentales Money Maker frente a la infección con el viroide exocortis de los cítricos (CEVd).
- II. Estudio químico de las plantas transgénicas RNAi_55H y sus parentales Money Maker tras la infección con el viroide exocortis de los cítricos (CEVd). Análisis de la acumulación de SA y GA en las plantas de tomate objeto del estudio.
- III. Estudio molecular de la infección en plantas transgénicas RNAi_55H y Money Maker. Análisis de la expresión de los genes *S5H* y *PRI*.

3

Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

En el presente Trabajo Final de Grado se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad *MoneyMaker* (MM), así como dos líneas independientes de plantas transgénicas *S5H* que tienen suprimida la expresión del gen *S5H* mediante la tecnología de RNA antisentido obtenidas a partir del mismo fondo genético MM y generadas previamente en el laboratorio. Como consecuencia del bloqueo de la actividad 5-hidroxilasa, no se produce la hidroxilación del SA y estas plantas transgénicas son caracterizadas por la acumulación de ácido salicílico.

Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran los resultados de un experimento representativo.

3.1.1. Germinación de semillas

Mediante técnicas de cultivo *in vitro*, en condiciones de total esterilidad en cabina de flujo laminar, se llevó a cabo la germinación de las semillas. Para ello se envolvieron en papel *Miracloth* y se prepararon pequeños sacos que se desinfectaron mediante series de agua. En primer lugar, se sumergieron durante 30 minutos en un bote con lejía al 50% añadiendo, 4-5 gotas de detergente Tween 20 para romper la tensión superficial del agua. Transcurrido este tiempo, se lavaron sucesivamente en botes con agua destilada autoclavada durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente, con el objetivo de eliminar progresivamente los restos de lejía. Una vez las semillas fueron esterilizadas, se sembraron en placas *Petri* que contenían un filtro de papel empapado con agua.

3.1.2. Condiciones de cultivo

Una vez sembradas las semillas en las placas *Petri*, se cerraron con cinta Micropore™ que permite un intercambio de gases sin llegar a contaminar el medio y permanecieron en completa oscuridad durante 48-72 horas a 24°C. Pasado este tiempo se descubrieron y permanecieron en cámaras de cultivo *in vitro*, con unas condiciones de 23°C (día y noche), fotoperiodo de 8h oscuridad/ 16h de luz (lámparas SYLVANIA GRO-LUX F58W/GRO-T8) hasta que empezaron a germinar (72-96 horas aproximadamente). A continuación, las pequeñas plántulas se trasplantaron a macetas individuales (12cm de profundidad por 13 cm de diámetro inferior) con mezcla de turba y perlita al 50% y fueron trasladadas a un fitotrón con unas condiciones de un fotoperiodo de día largo (16h de luz y 8h de oscuridad), temperatura entre los 20-26°C y humedad relativa de entre el 50 y el 70%. Las macetas se regaron de manera habitual y manual con solución nutritiva de Hoagland.

3.2. Material microbiológico y proceso de infección

3.2.1. Preparación de viroide

El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) empleado para infectar las plantas de tomate se extrae a partir del material vegetal previamente infectado según el siguiente protocolo. A partir de 80 g de hojas de tomate infectadas, congeladas y homogeneizadas, se añaden 80 mL de Tris Base (Roche) 0,2M pH 8,9, 20 mL de EDTA 0,1M pH 7, 10 mL de Mercaptoethanol (Sigma®) y 320 mL de Fenol (Sigma®). Una vez triturado el material en el politrón, se centrifuga a 7000 rpm durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante y se ajusta con agua milliQ hasta llegar a un volumen de 160 mL. A continuación, se añade a un tubo nuevo 1,25 g de CF11 (Fibrous Celulose 11, Watman®), 20 mL de sobrenadante anterior, 3,7 mL de tampón STE 10X (Sodium Clorure, EDTA, Tris Base) y 13,4 mL de EtOH y se deja en agitación durante 12 horas. Pasado este tiempo, se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 5 minutos y deseamos el sobrenadante, ya que el viroide permanece adherido a la celulosa en el precipitado. Se realizan tres lavados con 30 mL de STE 1x (en EtOH), se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Finalmente, para conseguir disolver el viroide, se añade al precipitado 3,3 mL de STE 1x (en H₂O). Los lavados se repitieron 3 veces, obteniendo un volumen final de 10 mL (aproximadamente). Se adicionan 20 mL de EtOH absoluto y se dejan a -20°C durante 12 horas, para que el viroide precipite. Tras una centrifugación a 8000 rpm durante 30 minutos, el precipitado se resuspende en 1,9 mL de STE 1x (en H₂O), añadiéndose 1 mL de LiCl 10M para conseguir una concentración final de 2M en cada tubo y se incuba a 4°C durante horas. Nuevamente, se centrifuga a 8000 rpm durante 30 minutos y al sobrenadante, se añaden 15 mL de EtOH para precipitar de nuevo el viroide dejándolo a -20°C durante 12 horas. Por último, tras una última centrifugación a 8000 rpm durante 30 minutos, se decanta el sobrenadante, y al precipitado totalmente seco, se añaden 0,5 mL de H₂O estéril para resuspenderlo.

3.2.2. Inoculación del material vegetal

Las plantas de tomate fueron inoculadas con el viroide exocortis de los cítricos (CEVd), al transcurrir la fase de aclimatación de la planta a tierra, siete días posteriores al trasplante. En ese estadio, la planta ya muestra los dos cotiledones y está comenzando a salir la primera hoja. Para facilitar la infección, la temperatura del fitotrón se aumenta a 24°C la mínima y 28°C la máxima. Además, es aconsejable la presencia de un deshumidificador para evitar anomalías fenotípicas en las hojas de las plantas por exceso de humedad.

Para cada experimento independiente se emplearon aproximadamente 35 plantas transgénicas *S5H* de las líneas 14.5 y 16.4, y 45 plantas de su parental MM. Todas las plantas, excepto 9 por cada genotipo fueron inoculadas mecánicamente con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd). Para ello se espolvorea una pequeña cantidad de carborundum, un agente abrasivo, sobre el haz de la primera hoja y de un cotiledón. La función principal de este compuesto es hacer heridas en la hoja para facilitar la entrada del viroide en la planta. Posteriormente, se añaden 10 µL del inóculo a estas mismas hojas y se distribuye cuidadosamente. Las plantas *mock*, que no fueron sometidas a la infección, sufrieron el mismo proceso, pero en lugar de inóculo se añade 10 µL H₂O milliQ.

3.3. Toma de muestra y estudio de la sintomatología del viroide

Para los diferentes análisis, el material vegetal correspondiente a la 3ª y 4ª hoja de la planta de tomate se recogió a las 2 spi (semanas post-inoculación), 3 spi y 4 spi en contenedores de plástico con tapa de 20 Ml. Inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido, se homogeneizaron en frío en un molino de bolas *Retsch* MM 400 y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

Se tomaron muestras de 3 réplicas de las plantas *mock* y de 4 réplicas de las plantas infectadas de todas las líneas estudiadas y a todos los tiempos analizados.

Periódicamente, 3 veces por semana, se realizó la lectura de síntomas en las plantas de tomate objeto del estudio. Para ello, se acordó una escala de sintomatología de 0 al 4. En el que el valor 0, refleja que la planta todavía no muestra ningún síntoma de infección por el CEVd. El valor 1, corresponde al inicio de los síntomas propios del viroide. Para el valor 2 es notable el arrugamiento de los folíolos de la 3ª y 4ª. El valor 3 representa, el progreso de la infección, al arrugamiento foliar se le adiciona una ralentización en el crecimiento vegetativo de la planta. El valor 4 se asigna a la planta totalmente infectada y clorótica.

Cabe destacar que, a medida que pasan las semanas, los síntomas del viroide van aumentando. Por lo que, los datos recogidos en la 2spi muestran valores que oscilan de 0 a 2, durante la 3spi de 2 a 3, y durante la última semana, 4 spi, valores de 3 y prácticamente la mayoría de 4.

3.4. Extracción y análisis de las moléculas señal: SA y GA

Se pesaron 0,5 gramos del tejido foliar, previamente homogeneizado, en tubos Eppendorf de 2 mL y se añadieron rápidamente 1,5 mL de metanol. Tras mezclarse las muestras en el vórtex, se sometieron a un proceso de ultrasonidos durante 10 minutos, con el fin de lograr una completa disgregación del tejido y, facilitar la extracción de los compuestos.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C y se separó el sobrenadante a un nuevo vial de vidrio de 4 mL. El sedimento fue reextraído con 500 µL de metanol y centrifugado en las mismas condiciones.

El nuevo sobrenadante se adicionó al anterior y se dividió en dos viales diferentes, uno para la extracción de los compuestos fenólicos libres y otro para los totales. Posteriormente, todos los viales se secaron bajo una corriente de nitrógeno seco a una temperatura de 37°C.

3.4.1. Compuestos fenólicos totales

Para determinar el contenido en compuestos fenólicos totales es necesaria la liberación del azúcar conjugado a través de una hidrólisis enzimática empleando la enzima β-glucosidasa.

A las muestras previamente secas, se le añaden 100 µL del enzima β-glucosidasa (Fulka) con una concentración de 1mg/mL y 900 µL de tampón acetato sódico 0,1 mM pH 4,5 y se dejan incubando 12 horas a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se añaden 77 μL de ácido perclórico al 70% para detener la reacción enzimática y precipitar las proteínas. A continuación, se añaden 2,5 mL de una mezcla acetato de etilo y ciclopentano al 50% para extraer los compuestos fenólicos que se encuentran en la fase orgánica. Para ello simplemente se transfiere la parte superior a nuevo vial y se evapora el disolvente bajo una corriente de nitrógeno seco.

3.4.2. Compuestos fenólicos libres

En este caso, a las muestras previamente secas sólo se les añade 1 mL de tampón acetato sódico 0,1mM pH 4,5, y se dejan incubando 12 horas a 37°C. A partir de aquí el proceso de extracción es exactamente igual que el descrito en el apartado 3.4.1.

Una vez completamente secas, se resuspenden en 300 μL de metanol, se homogenizan con la ayuda de un vórtex y se filtran con una jeringa a la que se intercambia la aguja por un filtro de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de poro (Waters). Finalmente, se guardan en la nevera del laboratorio y las muestras ya estarían listas para el análisis por HPLC.

3.4.3. Análisis y cuantificación de compuestos fenólicos

El análisis de HPLC de los extractos fenólicos se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos por Yalpani *et al.*, (1993) y Bellés *et al.*, (1999).

Los extractos fenólicos, se resuspenden en 300 μL de metanol, se homogenizan con la ayuda de un vórtex y se filtran con una jeringa a la que se intercambia la aguja por un filtro de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de poro (Waters). Se trasvasan 100 μL a los viales (Accuform PP vial 0,7 mL, Thermo Scientific) destinados al análisis por HPLC y se inyectan directamente 30 μL en una columna de fase reversa Sahlrau C18 (5 μm , 4,6 x 150 mm; Waters) equilibrada con ácido acético al 1% (J. T. Baker). Se aplica un gradiente de metanol (0 a 100% en agua) durante 20 minutos, con un flujo constante de 1 mL/minuto. Los compuestos fenólicos SA y GA se detectaron con un detector de fluorescencia (Waters 2475), empleando una λ de 313 nm y una λ de emisión de 405 nm.

En la **Figura 8**, se muestra un cromatograma, en el que el ácido gentísico (GA) presenta un tiempo de retención de 10,61 minutos; y el ácido salicílico 16,05 minutos, empleando las condiciones cromatográficas determinadas.

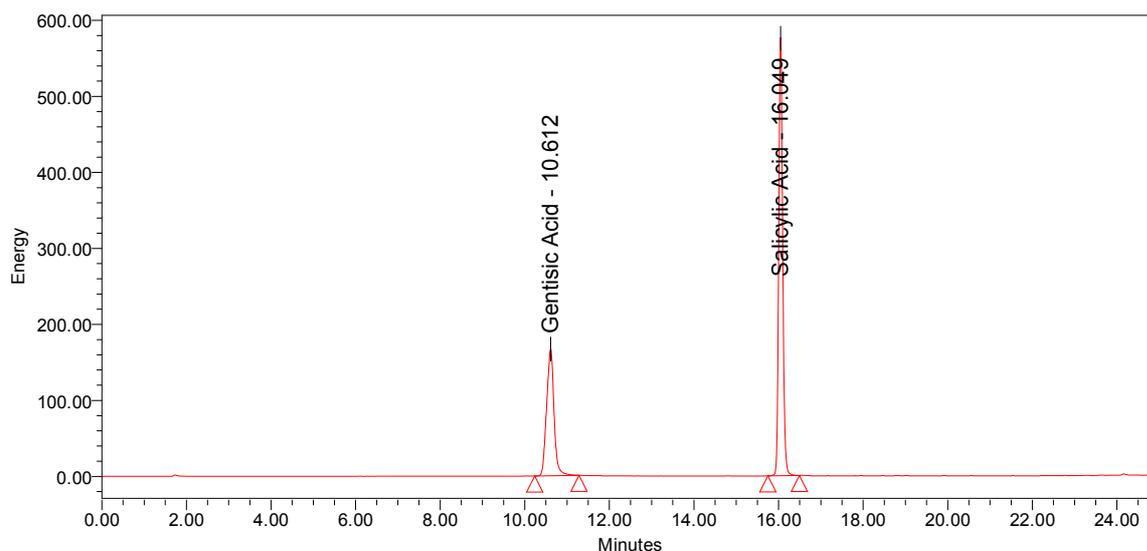


Figura 8. Identificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hojas de tomate. Se muestra un cromatograma con los tiempos de retención específicos para cada uno de los compuestos fenólicos identificados, ácido genticónico y ácido salicílico (de izquierda a derecha) 10,61 y 16,05 respectivamente, con las condiciones cromatográficas empleadas.

Para la cuantificación de estos compuestos, se realizaron curvas patrón con diferentes concentraciones de GA y SA.

3.5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

3.5.1. Extracción de RNA total de extractos de hoja de tomate

La extracción de RNA de los tejidos foliares se llevó a cabo mediante el reactivo Trizol (Trizol[®] Reagent; Ambition[®] Life Technologies) de acuerdo con el protocolo facilitado por el fabricante. Para evitar la degradación del RNA, se mantuvieron las muestras en hielo y todas las centrifugaciones se hicieron a 4°C. Todo el material utilizado se autoclavó.

Se añadieron a un Eppendorf aproximadamente 100 mg del material vegetal congelado y previamente triturado (cantidad suficiente para cubrir la parte del cono) y 1 mL de Trizol. Se completó la homogenización con ayuda de un vórtex para facilitar la disociación de los complejos nucleoproteicos y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, se adicionaron 200 μ L de cloroformo al sobrenadante, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron de nuevo a 12000 rpm durante 15 minutos y, la fase acuosa se transfirió a los nuevos tubos. Se añadieron 500 μ L de isopropanol, se agitaron y se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente. El RNA precipitado fue recuperado centrifugando a 12000 rpm 10 minutos, y fue lavado con 1 mL de etanol al 75% en agua DEPC. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar unos minutos al aire para que se evaporasen por completo el etanol. Se resuspendió en 35 μ L de agua DEPC y se calentó a 65°C durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante pasándolo a un tubo nuevo.

3.5.2. Cuantificación de RNA

Para cuantificar el RNA extraído se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000, haciendo el blanco con agua DEPC y realizando la lectura de la absorbancia a 260nm.

La calidad del RNA extraído se comprobó midiendo los ratios de absorbancia a distintas longitudes de onda. Todos los RNAs analizados mostraron valores comprendidos entre 1,8 y 2,0, para los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, indicando la buena calidad de la muestra.

3.5.3. Precipitación de RNA con cloruro de litio (LiCl)

A las muestras de RNA extraído y resuspendido en 35 μL de H_2O DEPC, se añadieron 165 μL más de H_2O DEPC hasta un volumen final de 200 μL . A continuación, se adicionó 1 volumen de LiCl 6M (200 μL) y se dejó reposar en hielo entre 2-3 horas para facilitar precipitación del RNA. Se utiliza el LiCl para que tenga lugar la precipitación de ácidos nucleicos y así aumentar su concentración. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4°C, a 13000rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de LiCl 3M para lavar el precipitado. Posteriormente, se realizó otra centrifugación igual que la precedente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 44 μL H_2O DEPC.

3.5.4. Tratamiento con DNasa

Para así eliminar posibles contaminantes de DNA genómico, se utilizó el kit comercial TURBO DNasa (Ambition® Life Technologies). Para obtener un volumen de reacción de 50 μL , a los 44 μL obtenidos en el apartado 5.3, se le añadieron 5 μL de tampón de reacción (10x TURBO DNasa Buffer) y 1 μL de la enzima TURBO DNasa (2U/ μL). Tras 30 minutos a 37°C, se añadieron 5 μL inactivador de DNasa (DNase Inactivation Reagent) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos para detener la reacción. Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo. El RNA obtenido se cuantificó en el Nanodrop tal y como se detalla en el apartado 3.5.2.

3.5.5. Retrotranscripción

Este proceso se basa en la obtención de cDNA a partir de RNA, empleando el kit comercial *PrimeScript™* RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para un volumen de reacción de 10 μL , se empleó 1 μg de RNA, 2 μL de tampón (5x PrimeScript Buffer), 0,5 μL de oligoDT Primer 50 μM , 0,5 μL de enzima retrotranscriptasa (PrimeScript RT enzymeMix I) y H_2O DEPC hasta obtener el volumen final de 10 μL . La mezcla se incubó primero a 37°C durante 15 minutos y posteriormente unos segundos (~15s) a 85°C.

Las muestras se pasaron a hielo y se diluyeron 1:10 con H_2O DEPC, obteniendo así un volumen final de cDNA de 100 μL . Estas muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

3.5.6. Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

Este análisis se llevó a cabo con el reactivo *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y ensayo se empleó una placa de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems), que contenía 10 µL del cDNA en cada uno de ellos. Se realizaron tres técnicas por cada réplica biológica. La placa fue sellada cuidadosamente evitando burbujas de aire y se dio un golpe de centrifuga (spin) antes de introducirla en el equipo de PCR cuantitativa.

La amplificación fue monitorizada a tiempo real con el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Life Technologies) y el software empleado fue la versión 2.04 del mismo equipo. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se describen en la **Tabla 1**. Como control positivo del experimento, se utilizó en todos los casos el gen que codifica para la proteína actina.

Gen	Cebador Directo	Cebador Reverso
Actina	5'... CTA GGC TGG GTT CGC AGG AGA TGA TGC ...3'	5'... GTC TTT TTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC AC ...3'
S5H	5'...ATC TTG GGG ATC AAT TGC AG...3'	5' ...AAA CGA AGC CAC TGA CAT CC...3'
PR1	5'...ACT CAA GTA GTC TGG CGC AAC...3'	5'...AGT AAG GAC GTT GTC CGA TCC...3'

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados como cebadores en los experimentos de qRT-PCRs.

3.6. Recursos informáticos

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba *t* de Student para comparar dos tipos de muestras, utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de Microsoft Office. En todos los análisis, un *p-value* < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados y Discusión

En el presente trabajo final de grado se pretende llevar a cabo la caracterización fenotípica, química y molecular fenotípica de las plantas transgénicas de tomate RNAi_5H infectadas con el viroide exocortis de los cítricos (CEVd), con el fin de confirmar la función de este gen y su participación en la respuesta defensiva de las plantas.

4.1. Caracterización fenotípica de la infección de plantas de tomate transgénicas RNAi_5H con el viroide de la exocortis de los cítricos

Con el fin de caracterizar fenotípicamente el desarrollo de la infección viroidal se evaluaron dos parámetros tanto en las plantas transgénicas RNAi_5H como en su fondo genético MoneyMaker: (i) la evolución de la infección y (ii) la severidad de los síntomas.

4.1.1. Evolución de la infección

Tras la infección de las plantas transgénicas RNAi_5H (líneas 14.5 y 16.4) y sus parentales MM con CEVd, se realizó un seguimiento fenotípico de la aparición de los síntomas característicos del viroide, tales como la epinastia y rugosidad de las hojas, así como la reducción del crecimiento de las plantas (**Figura 9**).



Figura 9. Síntomas característicos de la infección causada por CEVd en las plantas MM tras 3spi.

Para evaluar la progresión de la infección se realizó un conteo periódico de las plantas que comenzaban a manifestar la típica sintomatología de la enfermedad viroidal. En la **Figura 10** se representa esta evolución en una gráfica cuyo eje X corresponde al tiempo de infección y en el eje Y al porcentaje de plantas que presentan síntomas. Basándonos en los datos que muestra la figura se deduce que la aparición de síntomas es diferente en las líneas de tomate estudiadas y que las dos líneas transgénicas, y sobre todo la línea 16.4, muestran un retraso evidente en la aparición de los síntomas.

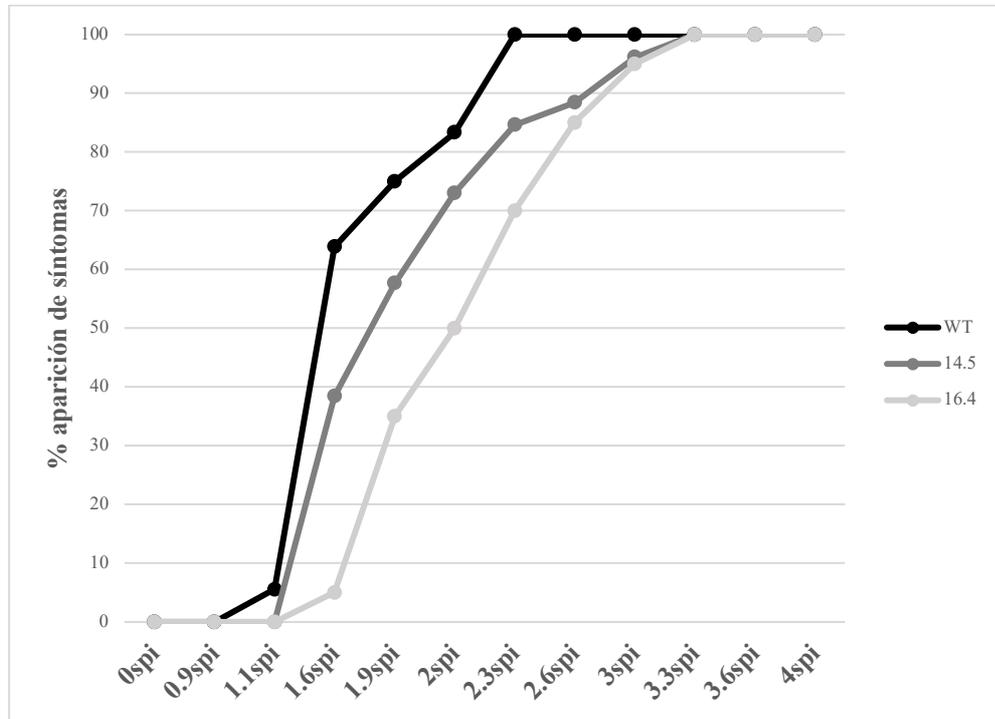


Figura 10. Evolución de la infección por CEVd en plantas de tomate. Aparición de los síntomas a diferentes semanas después de la inoculación de plantas de tomate MM y RNAi_55H (14.5 y 16.4).

A partir de la primera semana de la inoculación del viroide, en la que se observaron síntomas únicamente en las plantas MM, las diferencias en el avance de la infección comenzaron a ser evidentes. Así tras 11 días (1.6 spi) sólo el 5% de las plantas transgénicas correspondientes a la línea 16.4 estaban infectadas, frente al 65% de sus correspondientes parentales MM. Del mismo modo, mientras que el 82% de las plantas MM presentan síntomas, a los 14 días de la infección (2spi), las líneas RNAi_55H mostraron entre un 50% y un 70% de las plantas con síntomas. Asimismo, a las 2.3 spi, cuando el 100% de las plantas de tomate de la variedad MM presentaron síntomas, las líneas transgénicas se mantuvieron al 70% (línea 16.4) y 85% (línea 14.5) de infectividad. Finalmente, a las 3.3 spi todas las plantas, tanto MM como RNAi_55H, presentaron los síntomas propios de la infección.

Este análisis muestra que las líneas transgénicas RNAi_55H son más resistentes a la infección viroidal en comparación con la línea parental MM. Además, se observa que la línea 16.4 es la línea más resistente ya que precisa de más tiempo para la aparición de los síntomas característicos del viroide. Para corroborar las diferencias observadas, se analizó la severidad de los síntomas de esta interacción planta-patógeno.

4.1.2. Severidad de los síntomas

Además de un estudio de la evolución de la infección, se analizó la severidad de los síntomas en las plantas transgénicas y su parental tras la inoculación del CEVd. Como se observa en la **Figura 11**, a las 2.3 spi las plantas MM mostraron los síntomas característicos del viroide, principalmente el arrugamiento en las hojas y enanismo, mientras que en las plantas transgénicas RNAi_5SH la sintomatología fue mucho menos severa (14.5) o prácticamente nula (16.4).



Figura 11. Sintomatología característica por el CEVd tras 2.3spi. De izquierda a derecha se representa, RNAi_5SH 16.4, MM y RNAi_5SH 14.5.

Para evaluar la severidad de los síntomas se asignó una numeración a la sintomatología que sigue una escala del 0 al 4, en la que el valor 0 refleja que la planta todavía no muestra ningún síntoma de infección y valor 4 se asigna a la planta totalmente infectada y clorótica. Al valor numérico, le acompaña una escala gradual de colores en tonos verdoso; el valor 0 está representado con un verde claro que va gradualmente oscureciendo conforme la infección del viroide va progresando, hasta llegar al color marrón en el que la planta está totalmente infectada coincidiendo con el valor 4 en la escala de sintomatología.

En la **Figura 12** se observa la evolución y severidad de la infección representando en el eje vertical, el porcentaje y el grado de plantas infectadas con respecto al tiempo, en el eje horizontal.

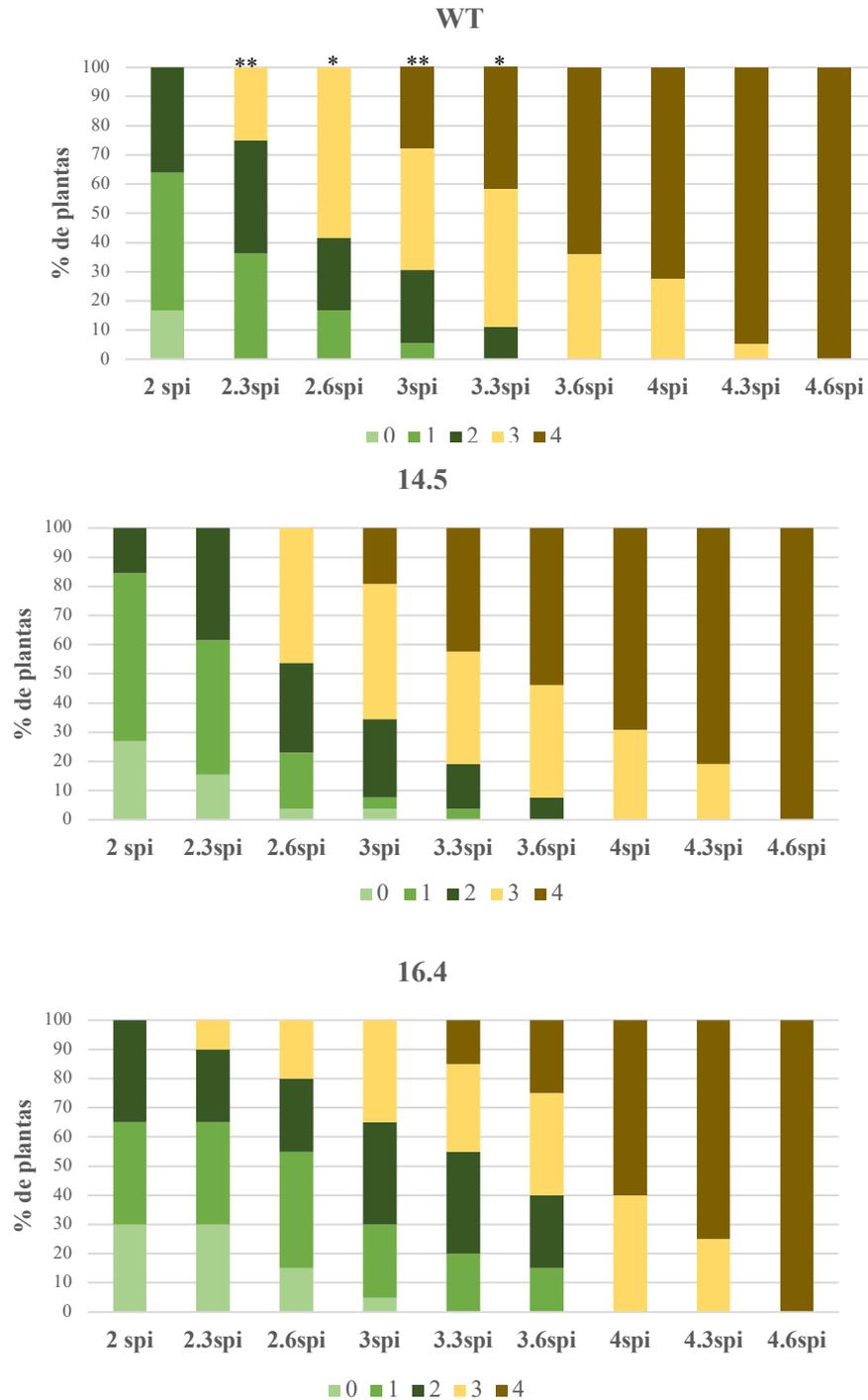


Figura 12. Estudio de la sintomatología en las tres líneas de tomate estudiadas con respecto al tiempo. Se sigue la escala de sintomatología viroidal establecida. Oscila del 0 al 4; siendo 0 identificativo de una planta sin síntoma de infección, y con valor 4 representa una planta totalmente infectada. Se muestra \pm el error estándar de 4 plantas para las plantas infectadas (CEVd), y 3 para las plantas control (MOCK), en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el p -value < 0,05 y con dos asteriscos (**) cuando p -value < 0,01.

Analizando la sintomatología a las 3spi, ninguna planta transgénica RNAi_5SH (línea 16.4) mostró una escala de 4, mientras que el 30% de las plantas MM estaban totalmente afectadas, acompañado en color marrón en la gráfica. Conforme va avanzando el tiempo, a su vez lo hace la infección con el viroide. A las 3.6 spi la línea MM presenta un alto porcentaje de plantas totalmente infectadas, un 65% de plantas cloróticas, y sin embargo las líneas transgénicas sólo muestran un 22% (línea 16.4) y un 50% (línea 14.5).

Con este estudio se confirma que las líneas transgénicas RNAi_5SH son más resistentes a la infección que su correspondiente parental, siendo la línea 16.4 más resistente que la 14.5.

4.2. Caracterización química de la infección de plantas de tomate transgénicas RNAi_5SH con el viroide de la exocortis de los cítricos

Con el fin de asociar la actividad salicilato 5-hidroxilasa a la enzima codificada por el gen 5SH propuesto, se llevó a cabo un análisis mediante HPLC del sustrato (SA) y el producto (GA) de la reacción catalizada por esta enzima en las plantas de tomate a lo largo de la infección viroidal.

Ambos compuestos fenólicos, además de en su forma libre, se acumulan de forma mayoritaria conjugados a un azúcar, después de una infección (Yalpani *et al.*, 1993) (Fayos *et al.*, 2006). Por esta razón, el análisis de estos ácidos se realiza tanto en su forma libre como total.

El estudio metabólico del SA y GA se llevó a cabo sobre las muestras obtenidas de la infección con CEVd, con el fin de observar la evolución de ambos compuestos cuando la planta activa sus mecanismos de defensa.

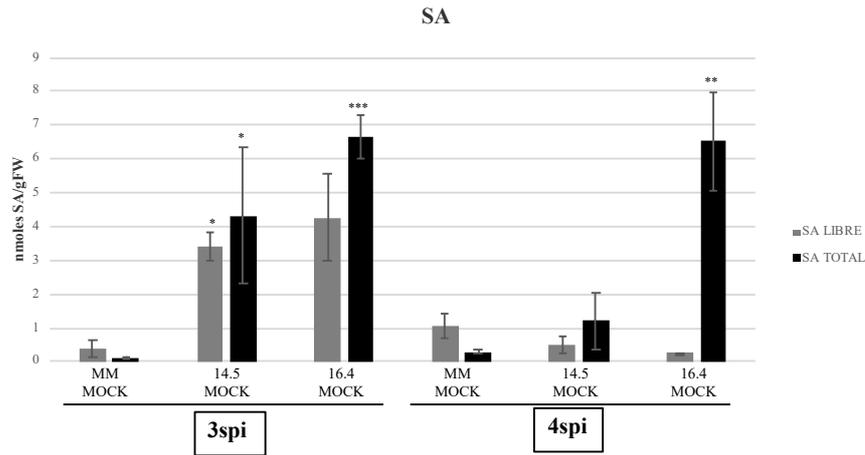
4.2.1. Análisis de los niveles de SA

Se llevó a cabo el análisis de la acumulación de ácido salicílico libre y total en las plantas de tomate transgénicas RNAi_5SH (líneas 14.5 y 16.4) y en su fondo genético MM después de 3 y 4 semanas de la inoculación con el viroide. A su vez, para conocer los niveles de estos compuestos en condiciones normales, sin ningún tipo de estrés, se midieron también en las plantas sin infectar (*mock*).

Analizando las plantas transgénicas no infectadas, las líneas mostraron niveles significativamente mayores de SA que sus parentales, a todos los tiempos estudiados; (**Figura 13A**), pudiendo ser estos mayores niveles los responsables de la resistencia observada. El incremento de los niveles endógenos de SA y sus conjugados con glúcidos en plantas infectadas está relacionado con la activación de genes que codifican proteínas PR y el establecimiento de la resistencia de la planta (Delaney *et al.*, 1994).

Asimismo, a las 3spi y 4spi, cuando los síntomas de viroide son más severos, las plantas infectadas acumulan mayor cantidad de SA, siendo estos niveles mayores en las plantas transgénicas RNAi_5SH (**Figura 13B**).

A



B

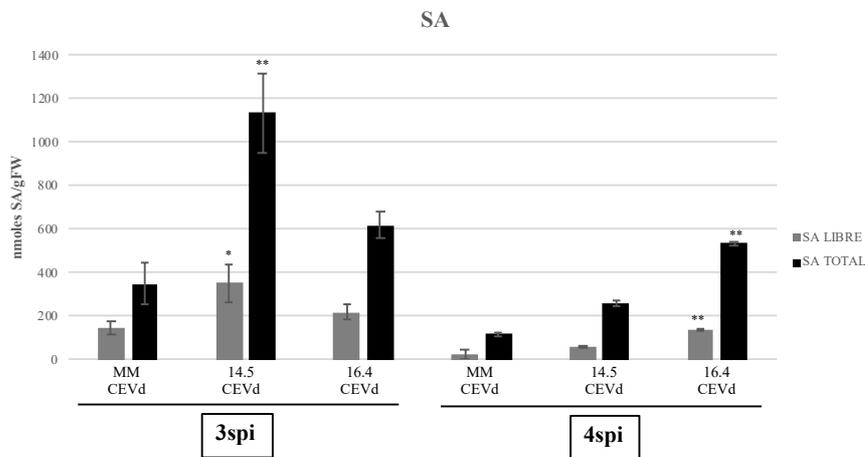


Figura 13. Acumulación de SA libre y total en plantas MoneyMaker y transgénicas no infectadas (A) o infectadas con CEVd (B). Los extractos metanólicos de las hojas de tomate fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia transcurridas 3 y 4 semanas de la infección. Se muestra \pm el error estándar de 4 plantas para las plantas infectadas (CEVd), y 3 para las plantas control (*mock*), en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el *p-value* < 0,05 y con dos asteriscos (**) cuando *p-value* < 0,01.

Los mayores niveles de acumulación de SA en las líneas de tomate transgénicas RNAi_5H confirman la actividad S5H *in vivo* propuesta, puesto que la reducción de la expresión de la enzima salicilato 5-hidroxilasa (S5H) conlleva una disminución de la hidroxilación del SA hacia GA, produciendo el aumento significativo del sustrato. Asimismo, nuestros resultados confirman el papel defensivo del SA en la resistencia de las plantas de tomate a la infección por CEVd. Resultados similares han sido previamente descritos en nuestro grupo, puesto que plantas transgénicas de tomate NahG, que no acumulan SA, presentan una mayor susceptibilidad al CEVd (López Gresa *et al.*, 2016).

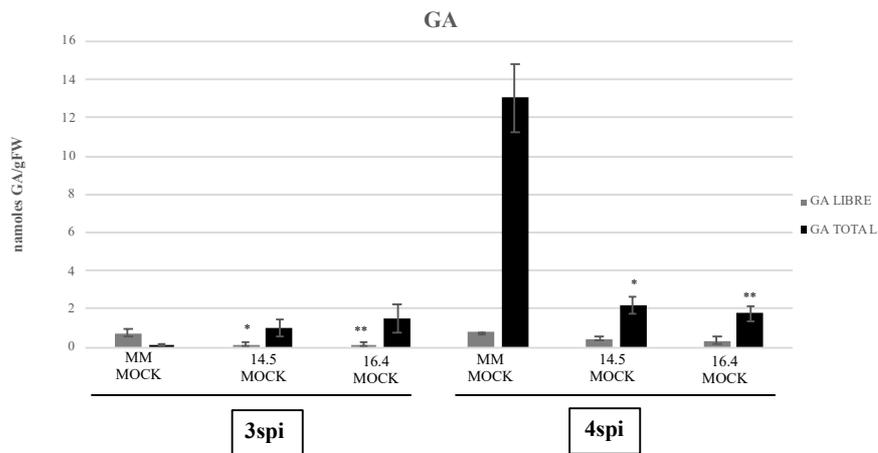
4.2.2. Análisis de los niveles de GA

Tras el estudio de los niveles de SA se procedió a la cuantificación de los niveles de GA tanto en su forma libre como en su forma conjugada. En primer lugar, y en coherencia con los mayores niveles de SA detectados en las plantas RNAi_5SH (14.5 y 16.4) no infectadas (*mock*), se observó una reducción en los niveles de GA que resultó ser significativa en los niveles de GA libre a las 3spi y en los de GA conjugados a las 4spi (**Figura 14A**).

Asimismo, como muestra la **Figura 14B**, en las plantas MM infectadas con CEVd, se observó una fuerte y significativa acumulación creciente del GA a las 3 y 4spi, que apenas tuvo lugar en las líneas transgénicas RNAi_5SH (14.5 y 16.4). Esto demuestra que mientras que el SA es metabolizado rápidamente a GA en las plantas MM, esta actividad se encuentra silenciada en las plantas transgénicas tal y como cabía esperar.

Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre con el SA, prácticamente todo el GA se encuentra en forma conjugada, por lo que confirma los resultados demostrados en otras investigaciones, en las que el GA libre se acumula mayoritariamente en su forma conjugada (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2006). La Figura 13B muestra también como a medida que aumentan los síntomas, se produce un fuerte incremento del GA, llegando hasta valores de 1200 nmmoles GA/gFW a las 4spi. Este pico de acumulación de GA coincide con el descenso en los niveles de SA en la misma semana, hecho debido a que el SA es el precursor del GA en plantas de tomate (Bellés *et al.*, 1999).

A



B

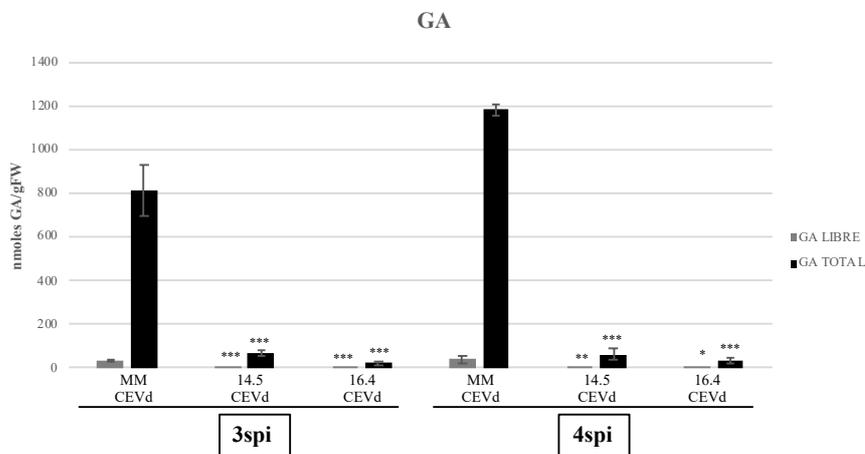


Figura 14. Acumulación de GA libre y total en plantas MoneyMaker y transgénicas no infectadas (A) o infectadas con CEVd (B). Se extrajeron compuestos fenólicos de plantas infectadas transcurridas 2,3 y 4 semanas tras la infección. Los extractos metanólicos de las hojas de las plantas de tomate fueron analizados mediante HPLC de fluorescencia transcurridas 2,3 y 4 semanas de la infección. Se muestra \pm el error estándar de 4 plantas para las plantas infectadas (CEVd), y 3 para las plantas control (*mock*), en un experimento representativo. Se llevaron a cabo 3 experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas control se representan con un asterisco (*) cuando el p -value $<0,05$, con dos asteriscos (**) cuando p -value $<0,01$ y con tres asteriscos (***) cuando p -value $<0,001$.

Tal y como se ha descrito, las plantas parentales MM infectadas, muestran un aumento en los niveles de GA como consecuencia de una infección de tipo sistémico por CEVd (Bellés *et al.*, 2006; López-Gresa *et al.*, 2010). Sin embargo, las líneas transgénicas muestran una reducción significativa en los niveles totales de GA con respecto a las utilizadas como control, tanto en las plantas no inoculadas como en las infectadas. Estos datos coinciden con los obtenidos tras el estudio de infección de plantas de tomate con la bacteria *Pseudomonas syringae* (Minguillón, 2017) y confirman la actividad *in vivo* propuesta S5H.

Estas acumulaciones de GA no son exclusivas de plantas de tomate, sino que también se producen en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) y *Gynura aurantiaca* como consecuencia de infecciones no necrotizantes (Bellés *et al.*, 2006), por lo que sería de interés el estudio de la actividad S5H en estas especies y su función en la respuesta defensiva de las mismas.

4.3. Caracterización molecular de la infección de plantas de tomate transgénicas RNAi_S5H con el viroide de la exocortis de los cítricos

Para llevar a cabo la caracterización molecular de las plantas de tomate transgénicas RNAi_S5H infectadas, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica tanto de S5H, gen implicado en el catabolismo del SA, como de PRI, gen implicado en respuesta defensiva de la planta asociado al SA (Ryals *et al.*, 1996; Shah, 2003). Para ello, se llevaron a cabo qRT-PCR a partir de RNAs de plantas a las 2, 3 y 4 semanas después de haber sido inoculadas con CEVd.

4.3.1. Análisis de la expresión del gen S5H

Como se observa en la **Figura 15** los niveles de expresión relativa de S5H aumentaron en todas las plantas tras la infección con el viroide. Este resultado coincide con los previamente obtenidos en nuestro laboratorio, en los que se estudió la inducción de S5H en tomate tras la infección con diferentes patógenos: bacterias, virus y viroide. En todas estas interacciones compatibles es crucial la presencia de GA, producto de la reacción catalizada por esta enzima. En coherencia, se detectó la inducción de S5H en todas ellas (Minguillón, 2017).

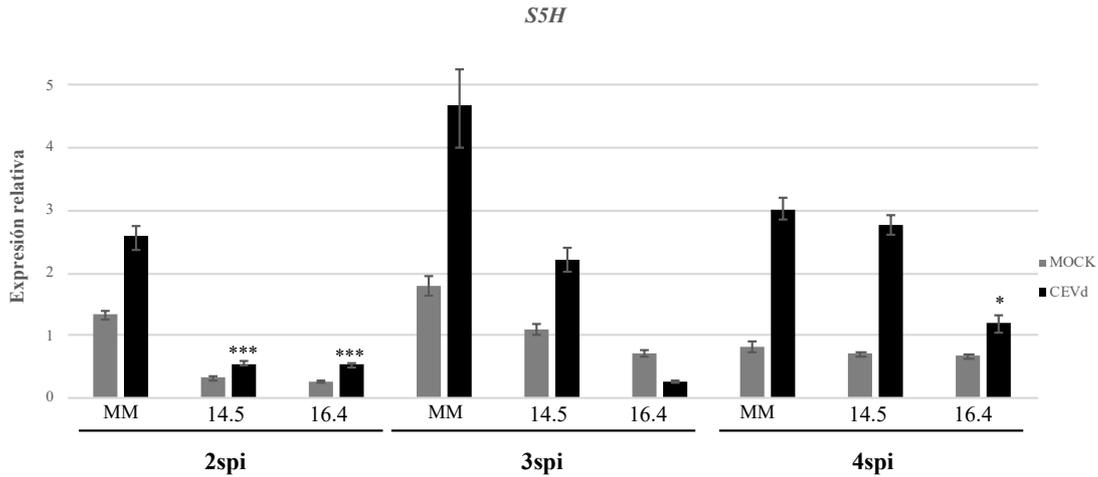


Figura 15. Análisis de expresión de *S5H* de las distintas líneas transgénicas de tomate MoneyMaker. Expresión de *S5H* de plantas control y transgénicas a infección con CEVd. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína actina. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes para las infectadas, y de 3 para las *mock*, de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las plantas control y las líneas transgénicas se representan con uno (*) y tres (***) según su valor *p-value* oscile entre 0.05 y 0,001, respectivamente.

Por otra parte, como cabía esperar, las dos líneas transgénicas RNAi_ *S5H* 14.5 y 16.4 presentaron una disminución de la expresión del gen con respecto a su parental MM, debido a su silenciamiento génico, estando o no infectadas. Dicha reducción resultó ser significativa en las plantas infectadas a las 2spi y en la línea 16.4 a las 4spi. Los mejores niveles de silenciamiento génico detectados en la línea 16.4 correlacionan con la mejor resistencia observada en esa línea, pudiendo decir que tuvo lugar un efecto dosis.

4.3.2. Análisis de la expresión del gen *PR1*

Para apoyar los datos obtenidos mediante la visualización fenotípica, se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa, un análisis de la expresión génica de *PR1* (Pathogenesis Related 1), gen marcador de la respuesta defensiva señalizada por SA (Ryals *et al.*, 1996; Shah, 2003).

Como se muestra en la **Figura 16**, los niveles de expresión de *PR1* aumentaron en todas las plantas que han sido sometidas a la infección viroidal, para todos los tiempos estudiados, tal y como cabía esperar para este gen marcador. Por otra parte, con la única excepción de la planta transgénica 14.5 a las 4spi, los niveles de expresión *PR1* fueron superiores en las plantas transgénicas RNAi_ *S5H* con respecto a su parental MM, tanto en las plantas control no infectadas (*mock*) como en las infectadas con el viroide (CEVd), para todos los tiempos. Estos resultados correlacionan tanto con los mayores niveles de acumulación de SA (Figura 13) como con la mayor resistencia observada en las plantas transgénicas (Figuras 11 y 12).

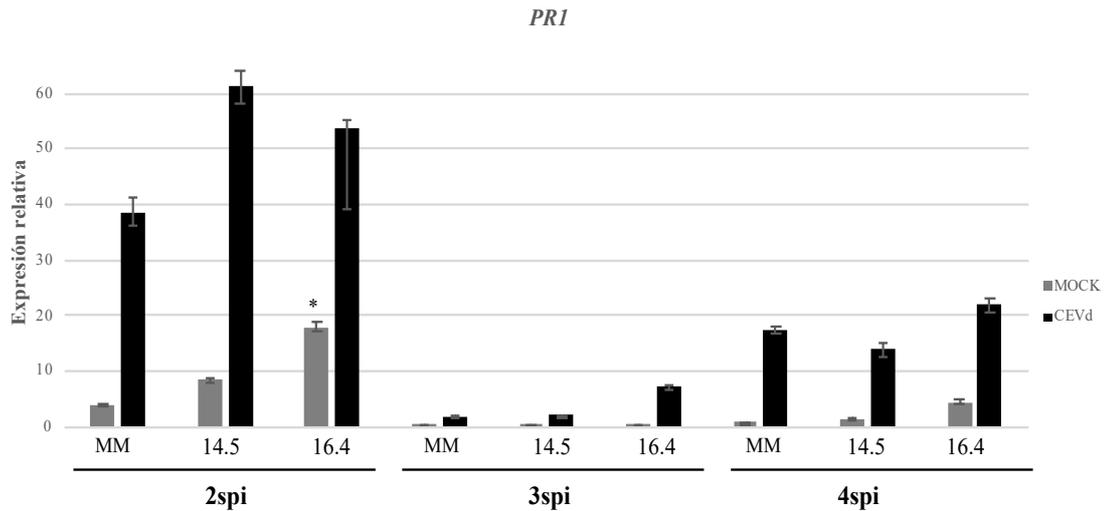


Figura 16. Expresión de *PRI* en plantas MoneyMaker control y en las transgénicas RNAi_5SH a lo largo del desarrollo. Niveles de expresión en las plantas transgénicas como en su fondo genético durante la observación del fenotipo de senescencia. Los valores de qRT-PCR fueron normalizados con el nivel de expresión del gen codificante para la proteína actina. Los niveles de expresión corresponden a la media \pm el error estándar de 4 plantas independientes para las infectadas, y de 3 para las *mock*, de un experimento representativo. Las diferencias significativas entre las plantas control y las líneas transgénicas se representan con un asterisco (*) cuando el valor *p-value* < 0,05.

A modo de resumen, hemos observado que las plantas transgénicas RNAi_5SH presentan unos menores niveles de expresión del gen *S5H* que llevan consigo una disminución en la actividad salicilato 5-hidroxilasa y, por tanto, unos mayores niveles de acumulación de su sustrato (SA) y unos menores niveles de acumulación de su producto (GA). Nuestros resultados confirman la actividad salicilato 5-hidroxilasa *in vivo* en plantas de tomate. Por otra parte, los cambios producidos en el metabolismo del SA en las plantas transgénicas provocan un aumento en la expresión del gen marcador de respuesta defensiva *PRI* y una mayor resistencia al viroide de la exocortis de los cítricos, lo que parece indicar que este gen juega un papel importante en la respuesta defensiva de las plantas de tomate al viroide de la exocortis de los cítricos.

Con los resultados obtenidos en este TFG, se amplía la implicación de la enzima salicilato 5-hidroxilasa, previamente implicada en la respuesta defensiva frente a la bacteria *Pseudomonas syringae* tanto en tomate (Minguillón, 2017) como en *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al*, 2017), a la defensa de las plantas de tomate frente al CEVd. La caracterización de dicha enzima aporta datos aclarativos de cómo el ácido salicílico es hidroxilado por la planta para evitar su toxicidad. Estos resultados ponen de manifiesto no solo la importancia del SA en la planta, sino también de los productos derivados de su metabolismo, el GA.

Merece la pena destacar que la extraordinaria disminución en los niveles de GA observada en las plantas transgénicas RNAi_5SH infectadas por viroide (Figura 14) no se corresponde con un aumento muy acusado en los niveles de SA (Figura 13). Resultados similares han sido observados previamente en nuestro laboratorio, puesto que las plantas transgénicas RNAi_5SH infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* presentaron una disminución en los niveles de GA con respecto a sus correspondientes parentales MM, que no fue acompañada por un aumento en los niveles de SA (Minguillón 2017). Estos resultados sugieren que el SA se dirige hacia otras rutas metabólicas que actualmente no han sido todavía estudiadas y que está sujeto a una regulación muy fina. Con el fin de conocer el destino del SA, sería interesante llevar a cabo un experimento metabólico dirigido a los compuestos fenólicos utilizando una plataforma analítica basada en la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS). Se trata de una técnica que combina el poder de la separación del HPLC con la gran selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la

espectrometría de masas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa. El estudio de la acumulación de metabolitos de naturaleza fenólica como consecuencia de la infección de estas plantas transgénicas RNAi_55H, serán de gran utilidad para comprender mejor las distintas rutas que toma el SA para evitar la toxicidad en la planta.

Como perspectiva futura también sería de gran interés llevar a cabo estudios *in vitro* de la actividad que podrán ayudarnos a determinar los productos de la reacción. Estudios similares han sido llevados a cabo con las proteínas ortólogas de *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2013; 2017) o de *Ralstonia* (Fang y Zhou, 2014).

Por último, puesto que se ha descrito que existe un *cross-talk* negativo entre la ruta de SA, implicado en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos de tipo biótrofo, y la del ácido jasmónico, molécula señal fundamental en la respuesta defensiva frente a patógenos necrótrofos tales como algunos hongos (Glazebrook, 2005; Caarls *et al.*, 2015), resultaría de gran interés el estudio de las plantas transgénicas RNAi_55H de tomate frente a una infección fúngica.

5

Conclusiones

- I. Las plantas transgénicas de tomate RNAi_5H son más resistentes al viroide de la exocortis de los cítricos, en comparación con su fondo genético Money Maker.
- II. Las plantas transgénicas de tomate RNAi_5H, presentan una mayor cantidad de SA y unos menores niveles de acumulación de GA, confirmando la actividad salicilato 5-hidroxilasa (S5H) *in vivo*, responsable de la hidroxilación en el carbono 5 del SA para dar lugar a GA.
- III. La mayor resistencia al viroide de la exocortis de los cítricos y los mayores niveles de SA observados en las plantas transgénicas de tomate RNAi_5H correlacionan con unos menores niveles de expresión del gen S5H y una mayor inducción de PRI.
- IV. El gen S5H juega un papel importante en la respuesta defensiva de las plantas de tomate a la infección por el viroide de la exocortis de los cítricos.

6

Bibliografía

- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1665-1681
- Alvarez, M., Pennell, R., Meijer, P., Ishikawa, A., Dixon, R. and Lamb, C. (1998). Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity. *Cell*, 92(6), pp.773-784.
- Baker, B. (1997). Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science*, 276(5313), pp.726-733.
- Balbi V, Devoto A (2008) Jasmonate signaling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* 177: 301-318
- Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A., 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6, 106136.
- Barba, M., Hadidi, A., 2015. An overview of plant pathology and application of next-generation sequencing technologies. *CAB Rev.* 10, 121.
- Bari, R. and Jones, J. (2008). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), pp.473-488.
- Bartsch M, Bednarek P, Vivancos PD, Schneider B, von Roepenack-Lahaye E, Foyer CH, Kombrink E, Scheel D, Parker JE (2010) Accumulation of isochlorismate-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O-beta-D xyloside in Arabidopsis resistance to pathogens and ageing of leaves. *J Biol Chem* 285 (33): 25654–25665.
- Bellés JM, Garro R, Navarro P, Primo J, Conejero V (1999) Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 227-235.
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I, Conejero V (2006) Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* 223: 500-511.
- Benton, R.J., Bowman, F.T., Fraser, L., Kebby, R.G., 1949. Selection of citrus budwood to control scaly butt in trifoliata rootstock. *Agr. Gaz. N. S. Wales* 60, 3134.
- Benton, R.J., Bowman, F.T., Fraser, L., Kebby, R.G., 1950. Stunting and scaly butt associated with Poncirus trifoliata rootstock. *N. S. Wales Dept. Agr. Sci. Bull.* 70, 120.
- Bernad, L., Duran-Vila, N., 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol. Cell. Probes* 20, 105113.
- Bitters, W.P., 1952. Exocortis disease of citrus. *California Agric.* 6, 56.
- Blumwald, E., Aharon, G. and C-H. Lam, B. (1998). Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 3(9), pp.342-346.
- Boatwright JL, Pajeroska-Mukhtar K (2013) Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Mol Plant Pathol.* 14(6):623-34.
- Brederode FT, Linthorst HJM, Bol JF (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethphon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol. Biol.* 17: 1117-1125.
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC, Cammue BPA (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393-416.

- Caarls L., Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., (2015) How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science* 6 (170). GLAZEBROOK J., (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43 (1):205-227.
- Campos L, Granell P, Tárrega S, López-Gresa P, Conejero V, Bellés JM, Rodrigo I, Lisón P. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol Biochem.* 2014 Apr;77:35-43.
- Camps G, 2014. Caracterización del fenotipo metabólico de plantas transgénicas NagI. Estudio del patron de expression del posible gen de tomate S5H. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Carbonell, A., Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Gago, S., 2008. Double-stranded RNA interferes in a sequence specific manner with infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371, 4453.
- Chaffai, M., Serra, P., Gandía, M., Hernández, C., Duran-Vila, N., 2007. Molecular characterization of CEVd strains that induce different phenotypes in *Gynura aurantiaca*: structure-pathogenicity relationships. *Arch. Virol.* 152, 12831294.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai, Z. y Fan B (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior.* 4: 493-496.
- Conejero V, Bellés JM, García-Brejío F, Garro R, Hernández-Yago J, Rodrigo I, Vera P (1990) Signaling in Viroid Pathogenesis. Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. 233-263 Springer-Verlag. Heidelberg.
- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221: 287-96.
- Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Di Serio, F., Martínez de Alba, A.-E., Navarro, B., Gisel, A., Flores, R., 2010. RNA- dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J. Virol.* 84, 24772489.
- Diener, T.O., 1971. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ. *Virology* 43, 7598.
- Diener, T.O., 1987. Biological properties. In: Diener, T.O. (Ed.), *The Viroids*. Plenum Press, New York, NY, pp. 935.
- Durner J, Shah J, Klessing DF (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.
- Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148:1-36.
- Fagoaga, C., Duran-Vila, N., 1996. Natural occurrence of variants of the citrus exocortis viroid in vegetable crop species. *Plant Pathol.* 45, 4553.
- Fagoaga, C., Semancik, J.S., Duran-Vila, N., 1995. A citrus exocortis viroid variant from broad bean (*Vicia faba* L.): infectivity and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 76, 22712277.
- Fawcett, H.S., Klotz, L.J., 1948. Exocortis on trifoliolate orange. *Citrus Leaves* 28, 8.
- Fayos J, Bellés JM, López-Gresa MP, Primo J, Conejero V (2006) Induction of gentisic acid 5-O- β -D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* 67: 142-148.
- Flor H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:257-296.
- Flores, R., Ambrós, S., Llácer, G., Hernández, C., 2011. Pear blister canker viroid. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. (Eds.), *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. APS Press, St. Paul, MN, pp. 6366.
- Flores, R., Duran-Vila, N., Pallás, V., Semancik, J.S., 1985. Detection of viroid and viroid- like RNAs from grapevine. *J. Gen. Virol.* 66, 20952102.
- Flores, R., Minoia, S., Carbonell, A., Gisel, A., Delgado, S., López-Carrasco, A., *et al.*, 2015. Viroids, the simplest RNA replicons: how they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Res.* 209, 136145.
- Flores, R., Navarro, B., Kovalskaya, N., Hammond, R. W., & Di Serio, F. (2017). Engineering resistance against viroids. *Current Opinion in Virology*, 26, 1-7.

- Fuenmayor SL, Wild M, Boyes AL, Williams PA (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2. *J Bacteriol.* 180: 2522-30
- García-Breijo FJ, Garro R, Conejero V (1990) C7(P32) and C6(P34) PR proteins induced in tomato leaves by citrus exocortis viroid infection are chitinases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 249-260
- Garcion, C y Métraux JP(2006) Salicylic acid in Plant Hormone Signaling. 24: 229–255. Oxford: Blackwell Publishing Ltd
- Gergerich, R.C., Welliver, R.A., Gettys, S., Osterbauer, N.K., Kamenidou, S., Martin, R.R., *et al.*, 2015. Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization. *Plant Dis.* 99, 176187.
- Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 280-286.
- Granell Albert P, 2011. Estudio de la Resistencia a patógenos mediada por ácido genticónico en plantas. Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- Grill, L.K., Semancik, J.S., 1978. RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 896900.
- Gross, H.J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., *et al.*, 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.* 121, 249257.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., Barba, M., 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Front. Microbiol.* 7, 1325.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (Eds.), 2003. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC.
- Hadidi, A., Yang, X., 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods* 30, 261270.
- Hahn, M. (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), pp.387-412.
- Hernández M. 2015. Caracterización de plantas transgénicas NagI frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv . tomato DC3000 y estudio de la posible actividad Salicilato 5-Hidroxilasa en tomate. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- Keese, P., Symons, R.H., 1985. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 45824586.
- Koltunow, A.M., Krake, L.R., Johnson, S.D., Razian, M.A., 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. Gen. Virol.* 70, 34113419.
- Kunkel, B. and Brooks, D. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), pp.325-331.
- Levy, L., Hadidi, A., Garnsey, S.M., 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. *Proc. Int. Soc. Citricul.* 2, 800803.
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 466-472
- López-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2010) Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem. Anal.* 21: 89-94.
- Lorrain, S. (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science*, 8(6), pp.263-271.
- Lutwak-Mann C, 1943. The Excretion of a Metabolic Product of Salicylic Acid. *Biochemical Journal* 37, 246–2.
- Mackowiak PA (2000) Brief history of antipyretic therapy. *Clin. Infect. Dis.* 31: S154-S156.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26(4): 403-410.

- Matsushita, Y., Tsuda, S., 2015. Host ranges of potato spindle tuber viroid, tomato chlorotic dwarf viroid, tomato apical stunt viroid, and columnnea latent viroid in horticultural plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 141, 193197.
- Minguillón Campos S, 2018. Papel de *MTSI* y *S5H* en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae*. Trabajo final de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Minoia S, 2015. Degradación in vivo de un viroide de replicación nuclear: rutas catalizadas por proteínas Argonauta cargadas con pequeños RNAs viroidales y por otras ribonucleasas que generan RNAs subgenómicos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R., Diener, T.O., 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *J. Gen. Virol.* 71, 17811785.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R., Diener, T.O., 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *J. Gen. Virol.* 71, 17811785.
- Miura K and Tada Y (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant. Sci.*, 23.
- Moreira, S., 1955. Sintomas de “exocortis” em limoneiro cravo. *Bragantia* 14, 1921.
- Murcia, M., Bani Hashemian, V., Serra, P., Pina, V., Duran-Vila, N., 2015. Citrus viroids: symptom expression and performance of Washington navel sweet orange trees grafted on Carrizo citrange. *Plant Dis.* 99, 119124.
- Murcia, N., Bernad, L., Duran-Vila, N., Serra, P., 2011. Two nucleotide positions in the citrus exocortis viroid RNA associated with symptom expression in Etrog citron but not in experimental herbaceous hosts. *Mol. Plant Pathol.* 12, 203208.
- Nürnbergger, T. (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(2), pp.167-182.
- Owens, R.A., Sano, T., Duran-Vila, N., 2012. Plant viroids: isolation, characterization/ detection, and analysis. *Methods Mol. Biol.* 894, 253271.
- Palukaitis, P., 2014. What has been happening with viroids? *Virus Genes* 49, 175184.
- Pethybridge, S.J., Hay, F.S., Barbara, D.J., Eastwell, K.C., Wilson, C.R., 2008. Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology, and management. *Plant Dis.* 92, 324338.
- Pierpoint WS (1997) The natural history of salicylic acid: plant product and mammalian medicine. *Interdisciplinary Science Reviews* 22: 45-52.
- Pieterse CMJ, Ton J, van Loon LC (2001) Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden? *AgBiotech Net.*3
- Qi, Y., Ding, B., 2003. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* 15, 25662577.
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 372-379
- Rodrigo I, Vera P, Frank R, Conejero V (1991) Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P” as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Mol. Biol.* 16: 932-934
- Rodrigo I, Vera P, Tomero P, Hernández-Yago J, Conejero V (1993) cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. Characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.* 1023: 939-945.
- Romero-Puertas, M., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F., Gomez, M., Del Rio, L. and Sandalio, L. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂·- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, 27(9), pp.1122-1134.
- Ryals, J. (1996). Systemic Acquired Resistance. *THE PLANT CELL ONLINE*, 8(10), pp.1809-1819.
- Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 227.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., Owens, R.A., 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1010410108.
- Semancik, J.S., Szychowski, J.A., Rakowski, A.G., Symons, R.H., 1993. Isolates of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *J. Gen. Virol.* 74, 24272436.

- Semancik, J.S., Weathers, L.G., 1972. Exocortis virus: an infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology* 46, 456-466.
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-367.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., 2009. Tomato chlorotic dwarf viroid in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 1111-1116.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Ao, X., Singh, M., 2009. Citrus exocortis viroid transmission through commercially-distributed seeds of *Impatiens* and *Verbena* plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 691-694.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Baranwal, V.K., Baranwal, V.K., Gupta, K.N., 2006. Detection of citrus exocortis viroid, Iresine viroid, and tomato chlorotic dwarf viroid in new ornamental host plants in India. *Plant Dis.* 90, 1457.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M., Nie, X., 2003. Viroids of Solanaceous species. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (Eds.), *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC, pp. 125-126.
- Skoric, D., Conerly, M., Szychowski, J.A., Semancik, J.S., 2001. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature sensitive reaction. *Virology* 280, 1151-123.
- Staal, J. and Dixelius, C. (2007). Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends in Plant Science*, 12(8), pp.334-342.
- Torres, M. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *PLANT PHYSIOLOGY*, 141(2), pp.373-378.
- Trewavas, A. and Malhó, R. (1998). Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network! *Current Opinion in Plant Biology*, 1(5), pp.428-433.
- Van Brunshot, S.L., Persley, D.M., Roberts, A., Thomas, J.E., 2014. First report of pospivir-oids infecting ornamental plants in Australia: potato spindle tuber viroid in *Solanum laxum* (synonym *S. jasminoides*) and citrus exocortis viroid in *Petunia* spp. *New Dis. Rep.* 29, 3.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 245-264
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162
- Verberne MC, Verpoorte R, Bol JF, Mercado-Blanco J y Linthorst HJM (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*. 18: 779-783.
- Verhoeven, J., Jansen, C.C.C., Willems, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A., *et al.*, 2004. Natural infections of tomato by citrus exocortis viroid, columnea latent viroid, potato spindle tuber viroid and tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 823-831.
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., *et al.*, 2004. Citrus viroids: symptom expression and effect on vegetative growth and yield on clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Dis.* 88, 1189-1197.
- Visvader, J.E., Gould, A.R., Bruening, G.E., Symons, R.H., 1982. Citrus exocortis viroid: nucleotide sequence and secondary structure of an Australian isolate. *FEBS Lett.* 137, 288-292.
- Visvader, J.E., Symons, R.H., 1985. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* 13, 2907-2920.
- Walia, Y., Dhir, S., Ram, R., Zaidi, A.A., Hallan, V., 2014. Identification of the herbaceous host range of apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants. *Plant Pathol.* 63, 684-690.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals J (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094.
- White PJ, Broadley M (2003). Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487-511.
- Willdermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature* 414: 562-565.
- Xiang C, Miao Z, Lam E (1997) DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 34:403-415.

- Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I, 1993. Pathway of Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant physiology* 103, 315–321.
- Yang Y, Shah J, Klessig DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.
- Yang, X., Hadidi, A., Garnsey, S.M., 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82, 279285.
- Zhang K, Halitschke R, Yin C, Liu C-J, Gan S-S, 2013. Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 14807–148.
- Zhang, Z., Qi, S., Tang, N., Zhang, X., Chen, S., Zhu, P., *et al.*, 2014. Discovery of replicating circular RNAs by RNA-Seq and computational algorithms. *PLoS Pathog.* 10, e1004553.
- Zhou NY, Al-Dulayymi J, Baird MS and Williams PA (2002) Salicylate 5-Hydroxylase from *Ralstonia* sp. Strain U2: a Monooxygenase with Close Relationships to and Shared Electron Transport Proteins with Naphthalene Dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, Mar. 2002, p. 1547-1555.
- Zhang Y, Zhao L, Zhao J, Li Y, Wang J, Guo R, Gan SS, Liu CJ, Zhang K, 2017. S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase that Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis. *Plant Physiology*, pp.00695.2017.