

Índice.

I. Introducción	1
I.1. La interacción planta-patógeno	3
I.1.1. Señalización dependiente de los genes R	3
I.1.2. Respuestas defensivas locales	6
I.1.3. Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)	8
I.2. Ruta de señalización defensiva mediada por ácido salicílico	14
I.2.1. Biosíntesis del ácido salicílico	14
I.2.2. Mutantes implicados en la ruta de señalización del ácido salicílico	18
<i>I.2.2.1. Mutaciones en genes que afectan a la susceptibilidad frente a patógenos biotrofos</i>	18
<i>I.2.2.2. Mutaciones en genes que confieren mayor resistencia frente a patógenos biotrofos</i>	20
I.3. <i>p69C</i>; un gen marcador de la respuesta defensiva en <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
II. Objetivos	27

Índice

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

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

Índice

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

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

IV.4. Identificación de los genes *AtSBT3.5* y *AtSBT3.3* de *Arabidopsis thaliana* con homología a subtilasas e implicación en la resistencia frente a patógenos biotrofos104

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

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

IV.4.3. Caracterización de la respuesta patogénica en el mutante *sbt3.3* obtenido por inserción de T-DNA110

IV.4.4. Estudio del efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta frente a patógenos biotrofos112

IV.4.5. Estudio del efecto de la mutación *sbt3.3* en la respuesta a patógenos necrotrofos114

V. Discusión General 117

VI. Conclusiones 123

VII. Bibliografía 125