



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Función del gen 3-cetoacil-CoA tiorlasa 2 (KAT2) en defensa y desarrollo. Participación de los peroxisomas en las respuestas a herida en Arabidopsis thaliana”


M^a Cruz Castillo López de Toro

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR

José León Ramos

Valencia, 2008



Universidad Politécnica de Valencia
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS
Avenida de los Naranjos, s/n
Tel. 34 (9) 6 387 77 30 - Fax 34 (9) 6 387 78 59
46022 Valencia España



Dr. José León Ramos, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada: “Función del gen *3-cetoacil-CoA tiolasa 2* (*KAT2*) en defensa y desarrollo. Participación de los peroxisomas en las respuestas a herida en *Arabidopsis thaliana*” ha sido realizada por M^a Cruz Castillo López de Toro bajo mi dirección, y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a quince de julio de 2008.

Fdo: José León Ramos

Parte de los resultados mostrados en la presente tesis doctoral han sido publicados en los artículos científicos:

- Castillo, M.C., Martínez, C., Buchala, A., Métraux, J.P. y León, J. (2004) Gene-specific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**(1): 85-94.
- Castillo, M.C. y León, J. (2008) Expression of the β -oxidation gene *3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2)* is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **59**(8): 2171-2179.
- Castillo, M.C., Sandalio, L.M., del Río, L.A. y León, J. (2008) Peroxisome proliferation, wound-activated responses and expression of peroxisome-associated genes are cross-regulated but uncoupled in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **31**(4): 492-505.

A mis padres

A Andrés

RESUMEN

La β -oxidación es un proceso metabólico esencial en las células eucarióticas. Tradicionalmente, esta ruta catabólica ha sido considerada en plantas como la vía principal de degradación de ácidos grasos en las células. Sin embargo, en los últimos años, la β -oxidación de plantas está siendo objeto de un gran interés científico por su implicación en funciones relacionadas con el desarrollo y la defensa. En este contexto, aunque en estudios bioquímicos previos se había propuesto la participación de reacciones de β -oxidación en la biosíntesis de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), moléculas señalizadoras clave en las respuestas de defensa de plantas frente a patógenos y herida, no se había descrito la implicación de ningún enzima de β -oxidación hasta la realización de este trabajo. De todos los pasos enzimáticos implicados en esta ruta, la familia de las 3-cetoacil-CoA tiolasas (KAT) son las enzimas y genes menos estudiados. Este trabajo se ha centrado en la caracterización molecular y funcional de los distintos genes que codifican proteínas KAT de *Arabidopsis*, principalmente del gen *KAT2* que codifica la proteína con la función KAT mayoritaria en β -oxidación en *Arabidopsis*. Para determinar las posibles funciones del gen *KAT2* en procesos relacionados con el desarrollo y con la defensa de las plantas, se generaron plantas transgénicas con pérdida o ganancia de función del gen y otras donde la secuencia promotora de *KAT2* se fusionó a genes delatores, las cuales permitieron caracterizar en mayor profundidad el patrón de expresión de este gen en *Arabidopsis*. Los análisis de expresión realizados demostraron que la herida activa transcripcionalmente genes de β -oxidación con un patrón de inducción específico. Concretamente, el gen *KAT2* aumentó su expresión a través de una vía de señalización independiente de la señalización mediada por JA y posiblemente dependiente de ácido abscísico. Además, plantas transgénicas con una expresión reducida del gen *KAT2* mostraron en respuesta a la herida una disminución severa en la acumulación de JA, indicando que *KAT2* interviene en la biosíntesis de JA en respuesta a herida y posiblemente en otras respuestas de defensa dependientes de esta hormona. Este resultado constituye la primera evidencia de la implicación de un enzima de β -oxidación en la biosíntesis de JA en plantas. Por el contrario, frente a patógenos biotrofos como *Pseudomonas syringae* o a luz ultravioleta C, cuya defensa depende mayoritariamente de la síntesis y señalización de SA en la planta, el análisis de genes marcadores permitió comprobar que *KAT2* no interviene en la síntesis de esta hormona. Por tanto, la ruta de biosíntesis de SA dependiente de reacciones de β -oxidación, descrita previamente en solanáceas, no está activa en respuesta a estrés en

Arabidopsis. Además de las respuestas a estrés, se analizó la función del gen *KAT2* en procesos del desarrollo como la germinación, el establecimiento postgerminativo y en procesos de senescencia. Estos análisis demostraron que *KAT2* es necesario para el desarrollo de la plántula y que constituye un factor regulador esencial para la correcta activación del programa de senescencia foliar, ya que plantas transgénicas con una reducción de la expresión del gen mostraron problemas graves de desarrollo postgerminativo en ausencia de sacarosa y un retraso en la senescencia de hojas tanto en condiciones naturales como inducidas por oscuridad. Además, se observó una alta expresión del gen a lo largo del desarrollo y maduración de los órganos florales, que podría estar relacionada con su función en la biosíntesis de JA o de otras hormonas como auxinas, cuya síntesis también puede darse a través de reacciones de β -oxidación. Por último, ya que la β -oxidación se localiza en peroxisomas, y estos orgánulos se han relacionado en multitud de ocasiones con respuestas a estrés en plantas, se analizó el papel de los peroxisomas en respuesta a la herida, analizando el número y el tamaño de estos orgánulos y los posibles componentes de las vías de señalización implicadas en estos procesos. La herida no produjo ningún cambio en el número o tamaño de estos orgánulos, a diferencia de la droga hipolipidémica clofibrato (CFB), proliferador de peroxisomas altamente caracterizado en animales. El JA actúa como un regulador negativo de la proliferación de estos orgánulos ya que produjo una disminución del número de peroxisomas y un aumento del tamaño de éstos. Por otra parte, el análisis de las vías de señalización activadas en respuesta a CFB, desconocidas hasta el momento en plantas, determinó que aunque son distintas, comparten elementos comunes con las vías activadas en respuesta a herida como COI1, aunque se trata de procesos desacoplados que difieren en la capacidad de promover proliferación de peroxisomas. Además, la activación transcripcional de los genes de β -oxidación o de herida en respuesta al tratamiento con JA, CFB o en herida, no está vinculada con la integridad de los peroxisomas, como indican los resultados obtenidos en plantas transgénicas deficientes en la función del gen *PEX14*, que presentan peroxisomas con alteraciones morfológicas graves y con defectos en el transporte de proteínas peroxisomales. Por último, análisis transcriptómicos determinaron que el CFB se percibe principalmente como un compuesto xenobiótico en plantas, activando mayoritariamente la expresión de genes que codifican componentes típicos de las respuestas de detoxificación.

RESUM

La β -oxidació es un procés metabòlic essencial en les cèl·lules eucariòtiques. Tradicionalment, aquesta ruta catabòlica ha estat considerada en plantes com la via principal de degradació d'àcids grassos en les cèl·lules. Tanmateix, als darrers anys, la β -oxidació de plantes està sent objecte d'un gran interès científic per la seua implicació en funcions relacionades amb el desenvolupament i la defensa. En aquest context, encara que en estudis bioquímics previs s'havia proposat la participació de reaccions de β -oxidació en la biosíntesis d'àcid salicílic (SA) i àcid jasmònic (JA), molècules senyalitzadores clau en les respostes defensives de les plantes front als patògens i ferida, no s'havia descrit la implicació de cap enzim de β -oxidació fins a la realització d'aquest treball. De tots els passos enzimàtics implicats en aquesta ruta, la família de les 3-cetoacil-CoA tiolasas (KAT) son els enzims i gens menys estudiats. Aquest treball s'ha centrat en la caracterització molecular i funcional dels diferents gens que codifiquen proteïnes KAT en *Arabidopsis*, principalment del gen *KAT2* que codifica la proteïna amb la funció KAT majoritària en β -oxidació en *Arabidopsis*. Per a determinar les possibles funcions del gen *KAT2* en processos relacionats amb el desenvolupament i amb la defensa de les plantes, es van generar plantes transgèniques amb perdua o guany de funció del gen i altres on la seqüència promotora de *KAT2* es va fusionar a gens reportadors, els quals permeteren caracteritzar amb major profunditat el patró d'expressió d'aquest gen en *Arabidopsis*. Els anàlisis d'expressió demostraren que la ferida activa transcripcionalment gens de β -oxidació amb un patró d'inducció específic. Concretament, el gen *KAT2* va augmentar la seua expressió a través d'una via de senyalització independent de la senyalització intervinguda per JA i possiblement dependent d'àcid abscísic. A més, plantes transgèniques amb una expressió reduïda del gen *KAT2* van mostrar en resposta a la ferida una disminució severa en l'acumulació de JA, indicant que *KAT2* intervé en la biosíntesis de JA en resposta a ferida i possiblement en altres respostes de defensa dependents d'aquesta hormona. Aquest resultat constitueix la primera evidència de la implicació d'un enzim de β -oxidació en la biosíntesis de JA en plantes. Per contra, front a patògens biotrofos com *Pseudomonas syringae* o amb llum ultraviolat C, que la seua defensa depèn majoritàriament de la síntesis i senyalització de SA en la planta, l'anàlisi de gens marcadors va permetre comprobar que *KAT2* no intervé en la síntesis d'aquesta hormona. Per tant, la ruta de biosíntesis de SA dependent de reaccions de β -oxidació, descrita previament en *Solanaceae*, no està activa en resposta a estrés en *Arabidopsis*. A més de les respostes a estrés, es va analitzar la funció del gen

KAT2 en processos del desenvolupament com la germinació, l'establiment postgerminatiu i en processos de senescència. Aquests anàlisis demostraren que *KAT2* es necessari per al desenvolupament de la plàntula i que constitueix un factor regulador essencial per a la correcta activació del programa de senescència foliar, ja que plantes transgèniques amb una reducció de l'expressió del gen van mostrar problemes greus de desenvolupament postgerminatiu en absència de sacarosa i un retard en la senescència de fulles tant en condicions naturals com induïdes per foscor. A més, es va observar un alta expressió del gen al llarg del desenvolupament i maduració dels òrgans florals, que podria estar relacionada amb la seua funció en la biosíntesis de JA o d'altres hormones com auxines, que la seua síntesis també pot donar-se mitjançant reaccions de β -oxidació. Per últim, ja que la β -oxidació es localitza en peroxisomes i aquests òrgànuls s'han relacionat en nombroses ocasions amb respostes a estrés en plantes, es va analitzar el paper dels peroxisomes en resposta a la ferida, analitzant el nombre y grandària d'aquests y els possibles components de les vies de senyalització implicades en aquests processos. La ferida no va produir cap canvi en el nombre o la grandària d'aquests òrgànuls, a diferència de la droga hipolipidèmica clofibrat (CFB), proliferador de peroxisomes altament caracteritzat en animals. El JA actua com un regulador negatiu de la proliferació d'aquests òrgànuls, ja que va produir una disminució del nombre de peroxisomes i va augmentar la grandària d'aquests. Per altra part, l'anàlisi de les vies de senyalització activades en resposta a CFB, desconegudes fins ara en plantes, va determinar que encara que són diferents, comparteixen elements comuns amb les vies activades en resposta a ferida com *COII*, encara que es tracta de processos desacoblats que difereixen en la capacitat de promoure proliferació de peroxisomes. A més, l'activació transcripcional dels gens de β -oxidació o de ferida en resposta al tractament amb JA, CFB o en ferida, no està vinculada amb la integritat dels peroxisomes, com indiquen els resultats obtinguts en plantes transgèniques deficientes en la funció del gen *PEX14*, que presenten peroxisomes amb alteracions morfològiques greus i amb defectes en el transport de proteïnes peroxisomals. Per últim, els anàlisis transcriptòmics van determinar que el CFB es percep principalment com un compost xenobiòtic en plantes, activant l'expressió de gens que codifiquen components típics de les respostes de detoxificació.

SUMMARY

The β -oxidation is an essential metabolic process for eukaryotic cells. Traditionally, this catabolic pathway has been considered in plants as the main route for the degradation of fatty acids in cells. However, the β -oxidation in plants has lured a great scientific interest because its involvement in to the regulation of development and defence. Although previous biochemical studies had suggested the involvement of β -oxidation reactions in the biosynthesis of salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), which are key signalling molecules in the defense responses of plants to pathogens and wounding, the involvement of any enzyme of β -oxidation has not been described to this work. The family of 3-ketoacyl-CoA thiolases (KAT) are the least studied enzymes and genes of all steps involved in this pathway. This work has focused on the functional and molecular characterization of the different genes that encode KAT proteins, and specifically on *KAT2* gene that encodes the main protein with KAT function of β -oxidation in Arabidopsis. To assess the possible functions of *KAT2* gene in processes related to development and defense in plants, we generated transgenic plants with loss or gain of function as well as others where the *KAT2* promoter sequence was fused to reporter genes. These tools allowed us to deeply characterize the expression pattern of this gene in Arabidopsis. The expression analysis showed a specific pattern of wound-activated expression of β -oxidation genes. Specifically, the *KAT2* expression increased through a JA-independent signalling pathway and possibly dependent on abscisic acid. In addition, transgenic plants with reduced expression of *KAT2* gene showed a severe decrease in the accumulation of JA in response to wounding, indicating that *KAT2* is involved in the wound-activated biosynthesis of JA and possibly other JA-dependent responses. This result is the first evidence of the involvement of a β -oxidation enzyme in the JA biosynthesis in plants. In contrast, the response to biotrophic pathogen such as *Pseudomonas syringae* or ultraviolet C light, which depend largely on the synthesis and signaling of SA, suggested that *KAT2* is not involved in the synthesis of this hormone. Consequently, the β -oxidation-dependent biosynthesis of SA, which had been previously described in Solanaceae, is not active in response to stress in Arabidopsis. Furthermore, we analyzed the function of *KAT2* gene in developmental processes such as germination, postgerminative establishment and senescence. These analyses showed that *KAT2* is necessary for seedling development and it is an essential regulator for the timely activation of leaf senescence program. The transgenic plants with reduced *KAT2* expression showed serious problems of postgerminative growth in the

absence of sucrose and a delayed natural and dark-induced senescence in leaves. In addition, *KAT2* expression was high throughout development and maturation of floral organs, which could be related to its role in the biosynthesis of JA and other hormones such as auxins, which synthesis also proceeds through β -oxidation reactions. On the other hand, since β -oxidation is located in peroxisomes, and these organelles have been linked repeatedly with responses to stress in plants, we examined the role of peroxisomes in response to wounding, analyzing both the number and the size of these organelles and the possible components of the signalling pathways involved in these processes. Wounding did not change either the number or the size of these organelles, contrasting with the peroxisome proliferator activity of the well characterized hypolipidemic drug clofibrate (CFB). JA acts as a negative regulator of the proliferation of these organelles since it decreased the number of peroxisomes and increased their size. Moreover, the analysis of signalling pathways activated in response to CFB, unknown in plants to date, showed that share common elements with wound-activated pathways such as COI1. Nevertheless, both processes are uncoupled and differ in the capacity to promote proliferation of peroxisomes. In addition, the transcriptional activation of β -oxidation and wound-related genes in response to treatment with JA, CFB or wounding is not linked to the integrity of peroxisomes, as demonstrated by the results of transgenic plants with loss of function of *PEX14* gene, which contained altered peroxisomes and serious defects in the transport of peroxisomal proteins. Finally, the genome-wide analysis of the CFB-responsive transcriptome suggested that CFB is perceived primarily as a xenobiotic compound in plants, mostly by activating the expression of genes coding for components of the typical detoxification responses.

ABREVIATURAS

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

aa: aminoácido

AacC: Aminoglicósido-(3)-N-acetiltransferasa

ABA: Ácido abscísico (del inglés, *abscisic acid*)

ABC: del inglés, *ATP-binding-cassette*

ACAD: Acil-CoA dehidrogenasa (del inglés, *acyl-CoA dehydrogenase*)

ACAT: Acetoacetil-CoA tiolasa (del inglés, *acetoacetyl-CoA thiolase*)

ACS: Acil-CoA sintetasa (del inglés, *acyl-CoA synthetase*)

ACX: Acil-CoA oxidasa (del inglés, *acyl-CoA oxidase*)

AGI: del inglés, *Arabidopsis Genome Initiative*

AIM: del inglés, *ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM*

AO: Óxido de aleno (del inglés, *allene oxide*)

AOC: Óxido de aleno ciclasa (del inglés, *allene oxide cyclase*)

AOS: Óxido de aleno sintasa (del inglés, *allene oxide synthase*)

AP2: del inglés, *APETALA 2*

ARF: Factor de respuesta a auxina (del inglés, *auxin response factor*)

ATP: Adenosin trifostafó

Avr: Avirulencia

AXR: del inglés, *AUXIN-RESISTANT*

BA: Ácido benzoico (del inglés, *benzoic acid*)

BA2H: Ácido benzoico 2-hidroxilasa (del inglés, *benzoic acid 2-hydroxylase*)

BAR: del inglés, *The Bio-Array Resource*

bHLH: del inglés, *basic helix-loop-helix*

bp: pares de bases

C: Carbono

°C: Grados centígrados

CA: Ácido cinámico (del inglés, *cinnamic acid*)

Ca²⁺: Calcio

cDNA: DNA complementario o copia

CDS: Secuencia codificante (del inglés, *coding sequence*)

CFB: Clofibrato

cis-jasm: *cis*-jasmonato

4-CL: 4-coumarato CoA ligasa (del inglés, *4-coumarato CoA ligase*)

CoA: Coenzima A

CoASH: Coenzima A -SH

COI: del inglés, *CORONATINE INSENSITIVE*

Col: Columbia

col.: colaboradores

COP: del inglés, *CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC*

CTS: del inglés, *COMATOSE*

D: dependiente de JA

d: días

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DAD: del inglés, *DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE*

2,4-DB: Ácido 2,4 diclorofenoxibutírico

DC: Día corto

DDE: del inglés, *DELAYED DEHISCENCE*

DE: Desviación estándar

DEPC: dietil pirocarbonato

DGL: del inglés, *DONGLE*

DL: Día largo

DNA: Ácido desoxirribonucleico (del inglés, *deoxyribonucleic acid*)

dnOPDA: dinor-OPDA

dNTP: dinucleótido trifosfato

DOS: del inglés, *DELAY OF THE ONSET OF SENESCENCE*

d.p.g: días postgerminación

DRP: dinaminas, (del inglés *Dynamin-Related Proteins*)

DTH: del inglés, *DETACHMENT*

E. coli: *Escherichia coli*

EDS: del inglés, *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EE: Error estándar

EIN: del inglés, *ETHYLENE INSENSITIVE*

ERF: del inglés, *ETHYLENE RESPONSE FACTOR*

EST: del inglés, *expressed sequence tag*

Et: Etileno

FAD: Desaturasa de ácidos grasos (del inglés, *fatty acid desaturase*)

FADH₂: Flavín adenin dinucleótido (forma reducida)

FT: Factor de transcripción

GFP: Proteína fluorescente verde (del inglés, *green fluorescent protein*)

12-O-Glc-JA: Glucósido derivado de 12-hidroxijasmonato

gr: gramo

GUS: β-glucoronidasa

h: horas

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HPL: Hidroperóxido liasa (del inglés, *hydroperoxide liase*)

13-(S)-HPOT: Ácido 13-(S)-hidroperóxido linoléico

HR: Respuesta hipersensible (del inglés, *hypersensitive response*)

12-HSO₄-JA: Derivado sulfonado del 12-hidroxijasmonato

HSP: Proteína de choque térmico (del inglés, *heat shock protein*)

I: Independiente de JA

IAA: Ácido indolacético (del inglés, *indole-3-acetic acid*)

IBA: Ácido indol-3-butírico (del inglés, *indole-3-butyric acid*)

IC: Interacción compatible

ICS: Isocorismato sintasa (del inglés, *isochorismate synthase*)

II: Interacción incompatible

Ile: Isoleucina

IPTG: Isopropiltio-β-D-galactósido

iRNA: RNA de interferencia (del inglés, *interference RNA*)

JA: Ácido jasmónico (del inglés, *jasmonic acid*)

JA-ACC: JA conjugado con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (del inglés, *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*)

JA-O-Glu: Derivado glucosilado del JA

JAI: del inglés, *JASMONATE INSENSITIVE*

JA-Ile: JA conjugado con Ile

JAR: del inglés, *JASMONATE RESISTANT*

JAs: Jasmonatos (del inglés, *jasmonates*)

JAZ: del inglés, *JASMONATE ZIM-DOMAIN*

JIN: del inglés, *METHYL JASMONATE INSENSITIVE*

JMT: Jasmonato metil transferasa (del inglés *jasmonate methyl-transferase*)

JR: del inglés, *jasmonic responsive*

KAT: 3-cetoacil-CoA tiolasa (del inglés, *3-ketoacyl-CoA thiolase*)

KAT2as: *KAT2 antisentido*

kDa: kiloDaltons

L: Respuesta local

α LA: ácido linolénico (del inglés, *α -linolenic acid*)

LACS: Acil-CoA sintetasa (del inglés, *long-chain acyl-CoA synthetase*)

LB: Luria-Bertani

LOX: lipooxigenasa (del inglés, *lipoxygenase*)

LRR: del inglés, *leucine-rich repeat*

LUC: luciferasa

mA: miliamperios

MADS: del inglés, *MCMI*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS* y *SRF*

MAP: del inglés, *Mitogen-activated protein*

MeJA: Metil jasmonato (del inglés, *methyl jasmonate*)

MeSA: Metil salicilato (del inglés, *methyl salicylate*)

MFP: Proteína multifuncional (del inglés, *MULTIFUNCTIONAL PROTEIN*)

Mg²⁺: Magnesio

mg: miligramo

min.: minutos

mJ: milijulio

ml: mililitro

mM: milimolar

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

MPK: MAP quinasa (del inglés, *MAP kinase*)

mRNA: RNA mensajero (del inglés, *messenger RNA*)

MS: Murashige y Skoog

MuLV: virus de la leucemia murina (del inglés, *Murine Leukemia Virus*)

N₂: Nitrógeno

NAA: Ácido naftalenacético (del inglés *naphthaleneacetic acid*)

NaAc: Acetato sódico

NAC: del inglés, (*NAM*, *ATAF1,2*, *CUC2*)

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

NahG: Salicilato hidroxilasa

NBS: del inglés, NUCLEOTIDE-BINDING SITE

NIM: del inglés, NON INDUCIBLE IMMUNITY

NIT: nitrilasa

NPR: del inglés, NONEXPRESSER OF PR GENES

NO: Óxido nítrico (del inglés, nitric oxide)

NPT: Neomicina fosfotransferasa (del inglés, neomycin phosphotransferase)

nt: nucleótido

O₂: Oxígeno

OGAs: Oligogalacturónidos

12-OH-JA: 12-hidroxijasmonato

OPC:6: ácido 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-hexanoico

OPC:8: ácido 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico

OPCL: OPC-8:0 CoA ligasa (del inglés, OPC-8:0 CoA ligase)

OPDA: Ácido 12-oxo-fitodienoico (del inglés, 12-oxo-phytodienoic acid)

OPR: OPDA reductasa (del inglés, OPDA reductase)

ORA: del inglés, Octadecanoid Responsive Arabidopsis

ORE: del inglés, Oresada

ORF: Pauta abierta de lectura (del inglés, Open ReadIng Frame)

P. cucumerina: *Plectosphaerella cucumerina*

P. syringae: *Pseudomonas syringae*

PAD: del inglés, PHYTOALEXIN DEFICIENT

PAL: fenilalanina amonio liasa (del inglés, phenylalanine amonia lyase)

PBS: Susceptible a AvrPphB (del inglés, AvrPphB susceptibility)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)

PED: del inglés, PEROXISOME DEFICIENT

PEG: Polietilen glicol

PEX: Peroxinas

PI: Inhibidores de proteinasas (del inglés proteinase inhibitor)

pI: Punto isoeléctrico

PKT: 3-cetoacil-CoA tiolasa (del inglés, peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase)

PL: Fosfolipasa (del inglés, phospholipase)

PLI: Piruvato liasa

PP: Proliferadores de peroxisomas (del inglés, *peroxisome proliferador*)
PPAR: del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor*
PR: del inglés, *pathogenesis related*
Pst.: *Pseudomonas syringae* pv. tomato
PTS: del inglés, *peroxisomal targeting signal*
Pv: patovar
p/v: peso/volumen
PXA: del inglés, *PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER*
R: Genes de Resistencia
RAB: Sensible a ABA (del inglés, *responsive to ABA*)
rep.: réplicas
RNA: Ácido ribonucleico (del inglés, *ribonucleic acid*)
rRNA: RNA ribosómico (del inglés, *ribosomic RNA*)
ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *Reactive Oxygen Species*)
r.p.m.: revoluciones por minuto
RPM: del inglés, *Resistance to P. syringae pv maculicola*
RPS: del inglés, *Resistance to P. syringae pv syringae*
RT: Retrotranscripción (del inglés, *reverse transcription*)
Rubisco: Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
S: Respuesta sistémica
SA: Ácido salicílico (del inglés, *salicylic acid*)
SA-aa: SA conjugado a un aminoácido.
SABP: del inglés, *SALICYLIC ACID BINDING PROTEIN*
SAG: Genes marcadores de senescencia (del inglés, *senescence-associated gene*)
SAI: del inglés, *SALICYLIC ACID INSENSITIVE*
SAR: Resistencia Sistémica Adquirida (del inglés, *Systemic Acquired Resistance*)
SAs: Salicilatos (del inglés, *salicylates*)
SCF: del inglés, *SKP-culin-F-box*
SDS: Sodio dodecil sulfato
sHSP: Proteína de choque térmico pequeña (del inglés, *small heat shock protein*)
SID: del inglés, *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT*
SKP: del inglés, *S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN*
ST2a: 12-hidroxijasmonato sulfotransferasa
TAG: Triacilglicéridos

t.d.h.: tiempo después de la herida
t.d.o.: tiempo después de la oscuridad
t.d.t.: tiempo después del tratamiento
TMV: virus del mosaico del tabaco (del inglés, *tobacco mosaic virus*)
TRA: Ácido traumático
U: Unidades
UBQ: ubiquitina
u.f.c.: Unidades formadoras de colonias
UTR: Región del mRNA no traducida (del inglés, *untranslated region*)
UV: Ultravioleta
V: voltios
v: volumen
WR: del inglés, *wound responsive*
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido
X-gluc: Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónico
YFP: Proteína fluorescente amarilla (del inglés, *yellow fluorescent protein*)
ZIM: del inglés (*zinc-finger inflorescence meristem*)

INDICE

Introducción

1. Reguladores de defensa y desarrollo en plantas.....	1
1.1. Jasmonatos.....	2
1.1.1. Biosíntesis y metabolismo de JAs.....	2
1.1.2. Señalización de JAs.....	7
1.1.3. Funciones de los JAs relacionadas con el desarrollo.....	9
1.1.3.1. Desarrollo floral.....	9
1.1.3.2. Senescencia.....	10
1.2. Salicilatos.....	12
1.2.1. Biosíntesis y metabolismo de SA.....	12
1.2.2. Señalización de SAs.....	15
1.2.3. Funciones de SAs relacionadas con el desarrollo.....	16
1.2.3.1. Senescencia.....	16
1.2.3.2. Floración.....	17
2. Respuestas de defensa en plantas.....	17
2.1. Respuestas a herida.....	18
2.1.1. Respuestas a herida en Solanáceas.....	19
2.1.2. Respuestas a herida en Arabidopsis.....	20
2.2. Respuestas a patógenos.....	22
2.2.1. Patógenos necrotrofos.....	23
2.2.2. Patógenos biotrofos.....	24
2.3. Respuestas a la luz ultravioleta.....	26
2.4. Interacciones reguladoras entre respuestas mediadas por JA y otras hormonas.....	27
2.4.1. Vías de señalización activadas por JA y Et.....	27
2.4.2. Vías de señalización activadas por JA/Et y SA.....	28
2.4.3. Vías de señalización activadas por JA y otras hormonas.....	30
3. β -oxidación en plantas.....	31
3.1. Definición y localización intracelular.....	31
3.2. Componentes de la β -oxidación.....	31
3.3. 3-cetoacil-CoA tiolasas (KAT) catalizan el último paso de la β -oxidación.....	35
3.3.1. Genes <i>KAT</i>	35

3.3.2. Enzimas KAT	35
3.4. Funciones de la β -oxidación.....	36
3.4.1. Desarrollo embrionario, germinación y desarrollo postgerminativo de las semillas	37
3.4.2. Síntesis de fitohormonas y otras moléculas reguladoras.....	39
3.4.3. Desarrollo floral y vegetativo	40
3.4.4. Senescencia.....	40
3.4.5. Regulación del número, tamaño y morfología de los peroxisomas.....	41
4. Peroxisomas de plantas.....	41
4.1. Definición.....	41
4.2. Peroxinas	42
4.3. Proliferación.....	43
4.4. Funciones relacionadas con estrés y defensa.....	45
5. Antecedentes.....	46

Objetivos

Objetivos.....	47
----------------	----

Resultados I

1. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de genes <i>KAT</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de las proteínas que codifican	49
2. Patrón de expresión espacial de genes <i>KAT</i>	50
2.1. Expresión de los genes <i>KAT</i> en distintos órganos	50
2.2. Patrón de expresión del gen <i>KAT2</i> en órganos reproductores	53
3. Análisis molecular y funcional del gen <i>KAT2</i> a lo largo del desarrollo postgerminativo.....	56
3.1. Patrón de expresión del gen <i>KAT2</i> durante el desarrollo postgerminativo	56
3.2. Participación de <i>KAT2</i> en el desarrollo postgerminativo.....	58
4. Análisis molecular y funcional del gen <i>KAT2</i> en respuesta a la herida y otros procesos relacionados	60
4.1. Expresión de los genes <i>KAT</i> en respuesta a herida y moléculas funcionalmente relacionadas.....	60

4.1.1. Respuesta al daño mecánico	60
4.1.2. Respuesta a la aplicación exógena de JA y SA.....	64
4.1.3. Respuesta a la deshidratación y a la aplicación exógena de ABA	67
4.2. Participación de KAT2 en la biosíntesis de JA en respuesta a la herida	72
4.2.1. Participación en herida	72
4.2.1.1. Respuesta a la herida activada por la vía dependiente de JA en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	72
4.2.1.2. Niveles de JAs endógenos en condiciones basales e inducidas por la herida en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	75
4.2.1.3. Respuesta a la herida activada por la vía independiente de JA en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	76
4.2.1.4. Respuesta a la herida activada por la vía dependiente de JA en plantas transgénicas con niveles aumentados de <i>KAT2</i>	77
4.2.1.5. Análisis transcriptómico de la respuesta a herida en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	78
4.2.2. Participación en otros procesos relacionados con JA	83
4.2.2.1. Respuesta a patógenos necrotrofos en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	83
4.2.2.2. Control del crecimiento en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	85
4.2.3. Participación en procesos de deshidratación.....	87
5. Análisis molecular y funcional del gen <i>KAT2</i> en respuesta a factores de estrés que van acompañados de la síntesis de SA	88
5.1. Expresión del gen <i>KAT2</i> en respuesta a <i>Pseudomonas syringae</i> y posibles alteraciones en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	89
5.2. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> en plantas transgénicas con niveles reducidos y aumentados de <i>KAT2</i>	93
5.3. Expresión del gen <i>KAT2</i> en respuesta a luz UV-C y posibles alteraciones en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	94
6. Análisis molecular y funcional del gen <i>KAT2</i> en senescencia	96
6.1. Expresión del gen <i>KAT2</i> en senescencia	97
6.1.1. Expresión de los genes <i>KAT</i> en hoja senescentes	97

6.1.2. Expresión del gen <i>KAT2</i> en hojas sometidas a senescencia forzada en oscuridad	98
6.1.3. Expresión del gen <i>KAT2</i> <i>in vivo</i> en plantas sometidas a senescencia forzada en oscuridad	101
6.2. Participación de <i>KAT2</i> en el proceso de senescencia	102
6.2.1. Senescencia forzada en plantas transgénicas con niveles aumentados y reducidos de <i>KAT2</i>	102
6.2.2. Patrones de expresión relacionados con senescencia en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	106
6.2.3. Senescencia natural en plantas transgénicas con niveles reducidos de <i>KAT2</i>	107

Resultados II

1. Interacción entre las vías de señalización activadas por la herida y por clofibrato.....	109
1.1. Expresión del gen <i>KAT2</i> en respuesta a CFB	110
1.2. Expresión de genes de herida en respuesta a CFB	112
1.3. Relación entre las vías de señalización activadas por CFB y por la herida dependiente de JA.....	114
2. Análisis del número y tamaño de peroxisomas en respuesta a CFB, herida y JA.....	117
2.1. Número de peroxisomas en respuesta a CFB, herida y JA.....	118
1.1.1. Marcaje fluorescente de los peroxisomas en plantas <i>MFP2::YFP-MFP2</i>	118
1.1.2. Tinción citoquímica de los peroxisomas con 3,3'-diaminobenzidina (DAB).....	124
2.2. Tamaño de los peroxisomas en respuesta a CFB, herida y JA	124
3. Expresión de genes <i>PEX</i> en respuesta a CFB, a la herida y a JA.....	126
4. Análisis de las respuestas desencadenadas por CFB, herida y JA en el mutante de inserción de T-DNA <i>pex14</i>	127
4.1. Caracterización fenotípica del mutante <i>pex14</i>	128
4.2. Caracterización molecular del mutante <i>pex14</i> en respuesta a CFB, herida y JA.....	128
5. Análisis transcriptómico de la respuesta a CFB en plántulas de <i>Arabidopsis</i>	131
5.1. Genes expresados diferencialmente en respuesta al CFB.....	132
5.2. Validación del análisis transcriptómico.....	135
5.3. Categorías biológicas diferencialmente representadas en respuesta a CFB	137

Discusión

1. Función del gen <i>KAT2</i> en defensa y desarrollo.....	147
1.1. La expresión de los genes <i>KAT</i> es regulada espacial y temporalmente a lo largo del ciclo biológico de <i>Arabidopsis</i>	148
1.1.1. La expresión del gen <i>KAT2</i> en plántulas correlaciona con la función esencial de <i>KAT2</i> durante el desarrollo postgerminativo de las semillas.....	148
1.1.2. El gen <i>KAT2</i> se expresa a lo largo de todo el ciclo biológico de <i>Arabidopsis</i>	149
1.1.3. La expresión del gen <i>KAT2</i> en órganos florales presenta un patrón dinámico a lo largo del desarrollo y maduración de la flor y el fruto.....	150
1.1.4. El gen <i>KAT2</i> presenta altos niveles de expresión durante el desarrollo de las semillas.....	154
1.2. Los genes <i>KAT</i> forman parte de las respuestas a herida en <i>Arabidopsis</i> y constituyen un punto esencial para la activación de las respuestas dependientes de JA.....	155
1.2.1. Los genes <i>KAT</i> activan su expresión en respuesta a la herida por vías de señalización que difieren en la participación de JA.....	155
1.2.2. <i>KAT2</i> interviene en la síntesis de JA en respuesta a la herida.....	159
1.2.3. <i>KAT2</i> participa en otros procesos funcionalmente relacionados con la síntesis de JA.....	163
1.3. El gen <i>KAT2</i> activa su expresión en respuesta a patógenos biotrofos y luz UV-C, pero no interviene en la síntesis de SA en respuesta a estrés en <i>Arabidopsis</i>	166
1.4. La expresión de <i>KAT2</i> es necesaria para la activación de la senescencia natural o inducida por oscuridad en <i>Arabidopsis</i>	168
2. La proliferación de peroxisomas, las respuestas activadas por herida y la expresión de genes <i>PEX</i> están co-regulados pero desacoplados en <i>Arabidopsis</i>	174
3. <i>Arabidopsis</i> presenta múltiples respuestas frente al proliferador de peroxisomas CFB.....	180
3.1. El CFB produce una respuesta de detoxificación general en <i>Arabidopsis</i>	180
3.2. El CFB y diferentes factores de estrés coregulan un amplio grupo de factores de transcripción en <i>Arabidopsis</i>	184

Conclusiones

Conclusiones.....187

Materiales y Métodos

1. Material biológico y condiciones de cultivo189

 1.1. Plantas: *Arabidopsis thaliana*.....189

 1.2. Bacterias.....190

 1.2.1. *Escherichia coli*190

 1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*190

 1.2.3. *Pseudomonas syringae*191

 1.3. Hongos: *Plectosphaerella cucumerina*.....191

2. Tratamientos aplicados a las plantas.....191

 2.1. Herida.....193

 2.2. Aplicación exógena de fitohormonas (JA, SA y ABA) y de CFB.....193

 2.3. Deshidratación.....193

 2.4. Inoculación con el hongo fitopatógeno *Plectosphaerella cucumerina*.....193

 2.5. Inoculación con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000.....193

 2.5.1. Inoculación por infiltración193

 2.5.2. Inoculación por inmersión194

 2.5.3. Curvas de crecimiento de bacterias194

 2.6. Irradiación con luz UV-C.....195

 2.7. Senescencia195

3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos196

 3.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....196

 3.1.1. Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis*196

 3.1.2. Extracción de RNA de *Arabidopsis*.....196

 3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos197

 3.3. Manipulación de ácidos nucleicos.....197

 3.3.1. Retrotranscripción (RT) del RNA.....197

 3.3.2. Amplificación del DNA mediante PCR.....198

 3.3.3. Determinación de los niveles de transcrito199

 3.3.3.1. Análisis Northern blot y Southern blot199

 3.3.3.1.1. Electroforesis de RNA y DNA para transferencia a membrana.....199

3.3.3.1.2. Transferencia y fijación de RNA y DNA a membrana	200
3.3.3.1.3. Marcaje de sondas radiactivas.....	201
3.3.3.1.4. Prehibridación e hibridación	201
3.3.3.2. PCR semicuantitativa.....	202
3.3.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real	203
3.3.4. Manipulación de fragmentos de DNA necesarios para sondas o para generación de construcciones.....	204
3.3.4.1. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa o de productos de PCR.....	204
3.3.4.2. Digestiones de fragmentos de DNA o de vectores plasmídicos.....	205
3.3.4.3. Generación de extremos romos, fosforilación de fragmentos de DNA y desfosforilación de vectores plasmídicos.....	205
3.3.5. Reacciones de ligación entre fragmentos y vectores plasmídicos	206
3.3.6. Manipulación de microorganismos para transformación de los productos de ligación y de vectores plasmídicos	207
3.3.6.1. Obtención de células competentes para transformación por choque térmico.....	207
3.3.6.2. Transformación de células competentes por choque térmico	208
3.3.7. Purificación de plásmidos bacterianos.....	209
3.3.7.1. Procedentes de <i>E. coli</i> DH5 α	209
3.3.7.2. Procedentes de <i>A. tumefaciens</i>	209
3.4. Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	210
3.4.1. Transformación genética de plantas de <i>A. thaliana</i>	210
3.4.2. Selección y análisis genético de los transformantes	211
4. Plantas transgénicas generadas para el análisis de la función del gen <i>KAT2</i>	212
4.1. Plantas con niveles reducidos y aumentados de transcrito <i>KAT2</i>	212
4.1.1. Generación y transformación de las construcciones.....	212
4.1.2. Análisis genéticos de las líneas transgénicas generadas	213
4.2. Plantas con la región promotora del gen <i>KAT2</i> fusionada a genes delatores.....	214
4.2.1. Generación y transformación de las construcciones.....	214
4.2.2. Análisis genéticos de las líneas transgénicas generadas	216
4.2.3. Determinación de la actividad de los genes delatores.....	216
4.2.3.1. Detección de la actividad β -glucuronidasa mediante tinción histoquímica	216

4.2.3.2. Detección de la actividad luciferasa mediante bioluminiscencia.....	217
5. Obtención de la planta transgénica mutante <i>coi1-InahG</i>	217
6. Obtención del mutante de inserción de T-DNA <i>pex14</i>	218
7. Análisis transcriptómicos mediante micromatrices de oligonucleótidos.....	219
7.1. Amplificación de RNA y marcaje.....	219
7.2. Hibridación de las micromatrices.....	219
7.3. Análisis de los datos.....	220
8. Análisis de proteínas.....	221
8.1. Extracción de proteínas.....	221
8.2. Western blot.....	221
8.2.1. Electroforesis de proteínas.....	221
8.2.2. Transferencia de proteínas a membrana.....	221
8.2.3. Hibridación con anticuerpos.....	222
8.2.4. Detección.....	222
9. Tiempo de floración y plastocrono.....	222
10. Cuantificación de los niveles de JA mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	223
11. Cuantificación de clorofilas a+b mediante espectrofotometría.....	223
12. Técnicas realizadas para el estudio de los peroxisomas en <i>Arabidopsis</i>	224
12.1. Microscopía Confocal en plantas transgénicas <i>MFP2::YFP-MFP2</i>	224
12.1.1. Descripción y origen de las plantas utilizadas.....	224
12.1.2. Análisis cualitativo del número de peroxisomas.....	224
12.2. Marcaje de peroxisomas con 3' 3-diaminobenzidina (DAB).....	225
12.2.1. Citoquímica con DAB.....	225
12.2.2. Fijación de tejidos y realización de cortes para microscopía.....	225
12.2.3. Recuento de peroxisomas.....	226
12.2.3.1. Determinación del número de peroxisomas.....	226
12.2.3.2. Determinación del tamaño de los peroxisomas y mitocondrias.....	226
13. Aplicaciones de Internet.....	226

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Introducción

Figura 1. Biosíntesis, metabolismo y señalización del JA en Arabidopsis	6
Figura 2. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas	13
Figura 3. Vías de señalización activadas en respuesta a herida en Solanáceas y en Arabidopsis	20
Figura 4. Ruta de β -oxidación peroxisomal de plantas	33
Figura 5. Esquema de los fenotipos descritos en los mutantes de β -oxidación en Arabidopsis	38

Resultados I

Figura 6. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de genes <i>KAT</i> de <i>A. thaliana</i> y de las proteínas que codifican	50
Figura 7. Nivel de expresión de los genes <i>KAT</i> en distintos órganos de <i>A. thaliana</i>	53
Figura 8. Tinción histoquímica con X-gluc en flores y silicuas de plantas <i>KAT2::GUS</i>	55
Figura 9. Patrón de expresión del gen <i>KAT2</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i>	58
Figura 10. Análisis del desarrollo postgerminativo de las líneas <i>KAT2as</i>	59
Figura 11. Nivel de expresión de genes <i>KAT</i> en respuesta a la herida en <i>A. thaliana</i>	62
Figura 12. Nivel de expresión de genes <i>KAT</i> en respuesta a la herida en plantas Col, deficientes en SA (<i>nahG</i>), insensibles a JA (<i>coil-1</i>) y en el doble mutante <i>coil-1nahG</i>	64
Figura 13. Nivel de expresión de los genes <i>KAT</i> en respuesta a la aplicación exógena de JA en plántulas Col y en el mutante insensible a JA <i>coil-1</i>	65
Figura 14. Nivel de expresión de los genes <i>KAT</i> en respuesta a la aplicación exógena de SA, JA y a la aplicación conjunta de ambas moléculas en plántulas de <i>A. thaliana</i>	67
Figura 15. Nivel de expresión de los genes <i>KAT</i> en respuesta a la deshidratación y a la aplicación exógena de ABA en plántulas de <i>A. thaliana</i>	69
Figura 16. Nivel de expresión de los genes <i>KAT</i> en respuesta a la aplicación exógena de ABA en plántulas <i>coil-1</i> , insensibles a JA	71

Figura 17. Nivel de expresión del gen <i>JR2</i> , marcador de las respuestas a herida dependientes de JA, en Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> heridas y en respuesta a la aplicación exógena de JA.....	73
Figura 18. Niveles de JAs endógenos en condiciones basales e inducidas por la herida en plantas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i>	75
Figura 19. Nivel de expresión de los genes inducibles por herida <i>WR3</i> y <i>ACXI</i> en plantas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> heridas.....	76
Figura 20. Nivel de expresión del gen <i>JR2</i> , marcador de las respuestas a herida dependientes de JA, en plantas Col y líneas transgénicas <i>35S::KAT2</i> heridas.....	78
Figura 21. Nivel de expresión de los genes <i>KAT2</i> y <i>JR2</i> en las réplicas del análisis de micromatrices en plántulas Col y en la línea transgénica <i>KAT2as</i> 16C herida.....	79
Tabla I. Relación de genes cuya expresión aumenta o disminuye en plantas <i>KAT2as</i>	82
Figura 22. Nivel de expresión de los genes <i>KAT2</i> y <i>PDF1.2a</i> , marcador de las respuestas a patógenos necrotrofos dependiente de la vía Et/JA, en plantas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> y <i>35S::KAT2</i> infectadas con <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	84
Figura 23. Medida del tiempo de floración en plantas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> cultivadas en condiciones de DC.....	86
Figura 24. Análisis de la deshidratación en plantas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> y <i>35S::KAT2</i>	88
Figura 25. Nivel de expresión de los genes <i>KAT2</i> y <i>PRI</i> , marcador de las respuestas a patógenos biotrofos dependientes de SA, en plantas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> inoculadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato DC3000 y DC3000 <i>avrRpmI</i> ó tratadas exógenamente con SA. Nivel de expresión de <i>KAT2</i> en respuesta a H ₂ O ₂	91
Tabla II. Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato DC3000 y DC3000 <i>avrRpmI</i> en plántulas Col y líneas transgénicas <i>KAT2as</i> y <i>35S::KAT2</i>	94
Figura 26. Nivel de expresión del gen <i>KAT2</i> y de genes marcadores de las vías de señalización activadas por JA y SA en respuesta a la irradiación con luz UV-C en líneas transgénicas <i>KAT2as</i> y en plantas deficientes en las respuestas activadas por SA (<i>nahG</i>) y JA (<i>coil-1</i>).....	95
Figura 27. Nivel de expresión de genes <i>KAT</i> en hojas senescentes de <i>A. thaliana</i>	98
Figura 28. Patrón de expresión del gen <i>KAT2</i> en hojas sometidas a senescencia forzada por oscuridad en plantas transgénicas <i>KAT2::GUS</i>	100

Figura 29. Nivel de luminiscencia emitido *in vivo* por plantas transgénicas *KAT2::LUC* sometidas a oscuridad102

Figura 30. Senescencia forzada por oscuridad en hojas de plantas transgénicas *KAT2as*, *35S::KAT2* y en el mutante *coil-1*105

Figura 31. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *SAG12*, marcador de senescencia, en hojas cortadas sometidas a senescencia forzada por oscuridad en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as*106

Figura 32. Senescencia natural en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as*108

Resultados II

Figura 33. Nivel de expresión del gen *KAT2* en respuesta a la aplicación exógena de CFB en *A. thaliana*111

Figura 34. Nivel de expresión de genes relacionados con herida y patógenos en respuesta a la aplicación exógena de CFB113

Figura 35. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *JR2* en respuesta a CFB en plántulas Col, deficientes en SA (*nahG*), insensibles a JA (*coil-1*), en el doble mutante *coil-1nahG* y en las líneas transgénicas *KAT2as*115

Figura 36. Nivel de expresión de genes relacionados con herida en respuesta a CFB en plántulas Col-0 y en los mutantes insensibles a JA *coil-1* y *jai-1*116

Figura 37. Análisis del número de peroxisomas mediante microscopia confocal de la proteína YFP-MFP2 en hojas de plantas transgénicas *MFP2::YFP-MFP2* heridas o tratadas con CFB o JA120

Figura 38. Análisis del número de peroxisomas mediante tinción citoquímica con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y visualización con microscopía óptica en hojas de plantas Col-0 heridas ó tratadas con CFB ó JA123

Figura 39. Análisis del tamaño de los peroxisomas mediante tinción citoquímica con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y visualización con microscopia electrónica de transmisión en hojas de plantas Col-0 heridas ó tratadas con CFB ó JA125

Figura 40. Nivel de expresión de los genes *PEX1* y *PEX14*, implicados en la biogénesis y función de peroxisomas, en respuesta a CFB, herida y JA127

Figura 41. Caracterización fenotípica del mutante de inserción de T-DNA *pex14*129

Figura 42. Nivel de expresión de los genes inducibles por herida *KAT2* y *JR2* en respuesta a CFB, JA y herida en el mutante de inserción de T-DNA *pex14*130

Tabla III. Relación de genes cuya expresión aumenta en respuesta a CFB133

Tabla IV . Relación de genes cuya expresión disminuye en respuesta a CFB.....	134
Figura 43 . Nivel de expresión de los genes <i>KAT2</i> , <i>nitrilasa 2 (NIT2)</i> y <i>PEX1</i> en las réplicas del análisis de micromatrices en respuesta a CFB	136
Tabla V . Ontologías génicas diferenciales en respuesta a CFB obtenidas por FatiGO+.....	138
Tabla VI . Relación de genes incluidos en las categorías biológicas sobrerrepresentadas en los genes inducidos por CFB obtenidas por FatiGO+.....	139
Tabla VII . Relación de genes incluidos en las categorías biológicas sobrerrepresentadas en los genes reprimidos por CFB obtenidas por FatiGO+.....	141
Figura 44 . Perfiles de expresión de los factores de transcripción diferencialmente expresados por CFB en respuesta a diferentes factores de estrés y hormonas.....	144

Discusión

Figura 45 . Esquema representativo del patrón de inducción de <i>KAT2</i> en defensa y desarrollo	173
Figura 46 . Esquema representativo de las conexiones entre las vías de señalización activadas por CFB y herida en <i>A. thaliana</i>	178

Materiales y Métodos

Tabla VIII . Oligonucleótidos específicos utilizados para los análisis de la expresión génica	199
Tabla IX . Oligonucleótidos específicos utilizados para PCR cuantitativa	204
Figura 47 . Esquema de la generación de plantas transgénicas con la región codificante completa del gen <i>KAT2</i> expresada en orientación antisentido (<i>KAT2as</i>) y sentido (<i>35S::KAT2</i>).....	213
Figura 48 . Esquema de la generación de plantas transgénicas con la región promotora del gen <i>KAT2</i> fusionada a los genes delatores β - <i>glucuronidasa (GUS)</i> y <i>luciferasa (LUC)</i>	215
Figura 49 . Localización de la inserción del T-DNA en el gen <i>PEX14</i> en la línea SALK_007441.....	218

Introducción

1. Reguladores de defensa y desarrollo en plantas.

La supervivencia de las plantas en la naturaleza depende en gran medida de su adaptación al entorno. Por ello, las plantas han desarrollado la capacidad de activar mecanismos inducibles orientados a mejorar la tolerancia o a incrementar la resistencia frente a un amplio rango de factores de estrés. Sin embargo, los mecanismos de defensa de las plantas son substancialmente diferentes a los de animales, ya que éstos disponen de un sistema inmunitario estructurado funcionalmente en tipos celulares especializados y móviles. En plantas, donde la pared rígida de las células vegetales impide su movilización, todas las células son competentes para activar mecanismos de defensa. La interacción factor de estrés-planta implica la activación transitoria de cascadas de señalización molecular en los tejidos afectados que conllevan la generación, percepción y translocación de moléculas señalizadoras, principalmente hormonas, produciendo a su vez la activación de otras vías de señalización tanto a nivel local como en zonas distales de la planta. En este sentido, tanto el desarrollo como las respuestas a estrés están reguladas por complejas y coordinadas redes de señalización activadas tanto por señales endógenas como exógenas y que establecen entre ellas interacciones sinérgicas o antagonistas. El balance resultante entre las distintas vías activadas, dependiendo del factor de estrés, del tejido o momento del desarrollo, determina que cambios transcripcionales, proteómicos y metabólicos se producen constituyendo así una respuesta específica a un estímulo inicial concreto (revisado por Fujita et al., 2006; Beckers y Spoel, 2006; Robert-Seilaniantz et al., 2007; Balbi y Devoto, 2008). Las plagas de insectos y las enfermedades producidas por patógenos son factores de estrés que afectan en gran medida al rendimiento de los cultivos (Peterson y Higley, 2001). Este hecho ha determinado que las respuestas de las plantas a la infección por patógenos o a la herida causada por insectos o herbívoros hayan sido estudiadas en detalle, así como la función reguladora de jasmonatos (JAs) y salicilatos (SAs) en la defensa y desarrollo de las plantas. Estos dos grupos hormonales coregulan junto con etileno (Et), ácido abscísico (ABA) y especies reactivas de oxígeno (ROS) las respuestas de defensa de las plantas. Aunque tradicionalmente JAs y SAs han sido considerados como paradigmas de reguladores antagonistas en la activación de defensa, cada vez hay más datos que sustentan las interacciones sinérgicas existentes entre ellos (revisado por Reymond y Farmer, 1998; Glazebrook et al., 2003; Rojo et al., 2003; Devoto y Turner, 2005; Glazebrook, 2005; Lorenzo y Solano, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Fujita et al., 2006; Halim et al., 2006; Wasternack, 2006; 2007; Loake y Grant, 2007; Balvi y Devoto, 2008). Las interacciones

entre varias rutas de señalización provienen de compartir tanto componentes de señalización como la localización subcelular. Aunque existe un amplio conocimiento de los componentes implicados en las distintas rutas de señalización relacionados con defensa, se conocen en menor medida aquellas dianas o nodos involucrados en la regulación cruzada entre diferentes rutas. A continuación se detallan las vías de síntesis y señalización de JAs y SAs en plantas así como las funciones y puntos de regulación cruzada más trascendentes entre ambas hormonas.

1.1. Jasmonatos.

Los JAs conforman un grupo numeroso de ácidos grasos poliinsaturados que son precursores o derivados del ácido 3-oxo-2-(*cis*-2-pentenil)-ciclopentano-1-acético o ácido jasmónico (JA). Estos compuestos presentan homología estructural-funcional con esteroides y prostaglandinas de animales y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Bergey et al., 1996; Creelman y Mullet, 1997b; Blée, 2002). Los JAs pertenecen al grupo de las oxilipinas, que poseen funciones reguladoras tanto en desarrollo como en defensa (revisado por Howe y Schillmiller, 2002; Wasternack y Hause, 2002; Farmer et al., 2003; Browse, 2005; Devoto y Turner, 2005; Wasternack, 2006; 2007; Balbi y Devoto, 2008). El primer JAs identificado fue el metil jasmonato (MeJA) en flores de jazmín (Demole et al., 1962), y además de las plantas, varias especies de hongos y bacterias son también productores de JAs (Cross y Webster, 1970; Aldridge et al., 1971; Miersch et al., 1999; Abdala et al., 1999). El contenido endógeno de JAs varía dependiendo del tejido y tipo celular, estadio de desarrollo de la planta y de los diferentes estímulos externos, y la síntesis de JA está asociada principalmente a flores y tejido vascular, sugiriendo que en estos tejidos los JAs presentan funciones adicionales en la regulación de determinados procesos, entre ellas, posiblemente su función como molécula móvil señalizadora a lo largo de la planta (Creelman y Mullet, 1997a; Maucher et al., 2000; Wasternack y Hause, 2002; Hause et al., 2000; 2003a; 2003b; Stenzel et al., 2003a).

1.1.1. Biosíntesis y metabolismo de JAs.

Los JAs se sintetizan a partir de la ruta de los octadecanoides, descrita por primera vez en los años 80 (Vick y Zimmerman 1983; 1984). Esta ruta metabólica implica varios compartimentos subcelulares y consta de un elevado número de pasos que han sido

identificados mediante aproximaciones bioquímicas y genéticas (figura 1) (revisado por Creelman y Mullet, 1997a; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002; Schaller et al., 2005; Delker et al., 2006; Liechti y Farmer, 2006; Wasternack, 2007). La biosíntesis de JA comienza con la liberación del ácido α -linolénico (α LA) (18:3) desde las membranas del cloroplasto por la acción de fosfolipasas (PL) cloroplásticas. En tomate y tabaco, la PL A₂ aumenta su actividad en respuesta a herida o a infección vírica respectivamente (Narváez-Vásquez et al., 1999; Dhondt et al., 2000). En *Arabidopsis*, se ha descrito la participación de la PL A₁ DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE 1 (DAD1), cuya deficiencia reduce los niveles de JA (Ishiguro et al., 2001) y, recientemente, de la enzima DONGLE (DGL), homólogo de DAD1, presentando ambas funciones redundantes en la producción de JA pero con patrones temporales distintos (Hyun et al., 2008). La PL D, que también está implicada en la síntesis (Wang et al., 2000), podría modular la expresión de DAD1 y DGL en respuesta a la herida (Hyun et al., 2008). Paralelamente, en algunas especies como *Arabidopsis*, la síntesis de JA puede ocurrir también a través de la ruta de los hexadecanoides, comenzando con ácidos grasos hexadecatrienoicos (16C) conducentes a la formación de ácido dinor-12-oxo-fitodienoico (dnOPDA), homólogo estructural al ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) pero de 16 C y que aumenta su nivel en respuesta a herida (Weber et al., 1997; Weber, 2002; Schaller et al., 2005). Recientemente, se ha descrito la implicación de la acil hidrolasa PLAI en la liberación de los ácidos de 16 C desde los galactolípidos cloroplásticos en la síntesis de JA basal (Yang et al., 2007). A continuación, las 13-lipooxigenasas (13-LOX) cloroplásticas producen la oxidación del α LA generando el ácido 13-(*S*)-hidroperóxido linolénico (13-(*S*)-HPOT). Aunque en plantas existen muchas familias de LOX que dan lugar a una gran variedad de oxilipinas (revisado por Liavonchanka y Feussner, 2006), en *Arabidopsis*, LOX2 es la única enzima descrita cuya deficiencia produce una menor acumulación de JA en respuesta a la herida (Bell y Mullet, 1993; Melan et al., 1993; Bell et al., 1995). Por otra parte, la ruta de los octadecanoides también es una fuente de derivados de oxoácidos de 12 C como el ácido traumático (TRA) y compuestos volátiles de 6 C con funciones señalizadoras en defensa, sintetizados a partir del 13-(*S*)-HPOT a través de la acción de hidroperóxido liasas (HPL) (revisado por Howe y Schillmiller, 2002; Matsui, 2006). En la ruta de síntesis de JA, el 13-(*S*)-HPOT es deshidratado hasta ácido 12,13-epoxioctadecatrienoico u óxido de aleno (AO) mediante la enzima óxido de aleno sintasa (AOS) que es una citocromo P450 de la familia CYP74A caracterizada en muchas especies vegetales (Song y Brash, 1991; Song et al., 1993; Laudert et al., 1996; Howe et al., 2000; Sivasankar et al., 2000; Froehlich et al., 2001; Stumpe y

Feussner, 2006). A continuación, se produce la ciclación hasta OPDA por acción de la enzima óxido de aleno ciclasa (AOC) (Hamberg y Fahlstadius, 1990; Ziegler et al., 2000). El gen *AOS* es de copia única en *Arabidopsis* y representa un paso limitante en la biosíntesis de JA. La deficiencia en este gen disminuye la acumulación de JA en respuesta a la herida (Von Maleck et al., 2002; Park et al., 2002) y su expresión aumenta en respuesta a JA y herida en muchas especies de plantas (Laudert y Weiler, 1998; Kubigstellig et al., 1999; Sivasankar et al., 2000; Maucher et al., 2000; Ziegler et al., 2001; Mei et al., 2006; Siqueira-Júnior et al., 2008). En tomate, el gen *AOC* es de copia única y la sobreexpresión del gen produce una mayor acumulación de JA (Stenzel et al., 2003a; Hause et al., 2003a; Mierchs et al., 2004). Sin embargo, en *Arabidopsis* existen cuatro genes *AOC* que se inducen en respuesta a la herida, principalmente *AOC2* (Stenzel et al., 2003b). Aunque la naturaleza química de OPDA permite cuatro estereoenantiómeros, la acción conjunta de *AOS* y *AOC* genera exclusivamente (9*S*,13*S*)-*cis*-(+)-OPDA, que es el precursor del (3*R*,7*S*)-JA, el cual es el único activo biológicamente (Laudert et al., 1997). En *Arabidopsis*, un gran porcentaje del *cis*-(+)-OPDA y de dnOPDA es esterificado a galactolípidos de la membrana del cloroplasto, principalmente en herida (Stelmach et al., 2001; Andersson et al., 2006; Buseman et al., 2006). A continuación, el *cis*-(+)-OPDA, en forma libre o esterificada, es liberado desde el cloroplasto por un mecanismo desconocido y es transferido al peroxisoma a través del transportador de tipo ABC (*ATP-binding-cassette*) dependiente de ATP, COMATOSE (CTS1)/PEROXISOME DEFICIENT 3 (PED3) /PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER 1 (PXA1) (Zolman et al., 2001b; Footitt et al., 2002; Hayashi et al., 2002). El mutante *cts1* presenta una reducción parcial de JA en respuesta a la herida, sugiriendo un transporte adicional del *cis*-(+)-OPDA o su ester con coenzima A (CoA) por transporte pasivo (Theodoulou et al., 2005). Dentro del peroxisoma, se produce la reducción del *cis*-(+)-OPDA al correspondiente ácido 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC:8) por la enzima OPDA reductasa (OPR). Se han caracterizado enzimas OPR en varias especies vegetales (Schaller y Weiler, 1997; Schaller et al., 1998; Biesgen y Weiler, 1999; Costa et al., 2000; Ishiga et al., 2002; Agrawal et al., 2003; Sobajima et al., 2003; Matsui et al., 2004; Zhang et al., 2005; Tani et al., 2008) y en *Arabidopsis* y tomate, únicamente la isoforma OPR3 se localiza dentro de peroxisomas y presenta la correcta estereoespecificidad para producir la reacción (Müssig et al., 2000; Schaller et al., 2000; Strassner et al., 2002), correlacionando la deficiencia en el gen *OPR3* con una menor cantidad de JA (Sanders et al., 2000; Stintzi y Browse, 2000). En los pasos finales de la biosíntesis, las aproximaciones bioquímicas realizadas habían determinado la

esencialidad de tres rondas sucesivas de β -oxidación para acortar la cadena del OPC:8 (Vick y Zimmerman, 1983; 1984; Miersch y Wasternack, 2000; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002). Sin embargo, hasta el año 2004 no se había descrito ninguna enzima de β -oxidación implicada en la biosíntesis de JA en ninguna especie vegetal. Nuestro trabajo y el de otros laboratorios han permitido determinar algunas de las enzimas relacionadas con este proceso (revisado por Browse, 2005; Schaller et al., 2005; Delker et al., 2006; Baker et al., 2006; Goepfert y Poirier, 2007; Balbi y Devoto; 2008). Previamente a la β -oxidación, la esterificación del OPC:8 con CoA podría ser llevada a cabo al menos por tres acil-CoA sintetasas (ACS) pertenecientes al grupo de las 4-coumarato:CoA ligasas (4-CL), ya que presentan gran afinidad *in vitro* por el OPDA, por el OPC:8 y por el 3-oxo-2(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-hexanoico (OPC:6) (Schneider et al., 2005; Koo et al., 2006; Kienow et al., 2008). Entre ellas, únicamente se ha descrito una menor acumulación de JA en respuesta a la herida causada por la deficiencia en la actividad OPC-8:0 CoA Ligasa 1 (OPCL1) codificada por los genes At1g20500 y At1g20510 (Koo et al., 2006, Kienow et al., 2008). Referente a los pasos que constituyen el núcleo de β -oxidación, de las distintas acil-CoA oxidasas (ACX) caracterizadas, se ha descrito la participación de ACX1 en la síntesis de JA ya que plantas deficientes en el gen *ACX1* muestran una menor acumulación de JA en respuesta a la herida tanto en *Arabidopsis* (Castillo et al., 2004) como en tomate (Li et al., 2005). Además, recientemente se ha descrito la participación de ACX5, homólogo a ACX1, en la síntesis de JA ya que el doble mutante *acx1 acx5* presenta una reducción mayor en los niveles de JA en respuesta a la herida que el mutante *acx1* (Schillmiller et al., 2007). De las proteínas multifuncionales (MFP) implicadas en el segundo paso de β -oxidación, la deficiencia en el gen *ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM 1 (AIM1)* produce una menor acumulación de JA en respuesta a la herida (Delker et al., 2007). Por último, se ha determinado la participación de la enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa 2 (KAT2), implicada en la última reacción de β -oxidación, en la biosíntesis de JA en *Arabidopsis* (este trabajo [Castillo et al., 2004]; Afitlhile et al., 2005). Por último, se desconoce si existe una tioesterasa que catalice la separación entre el CoA y JA.

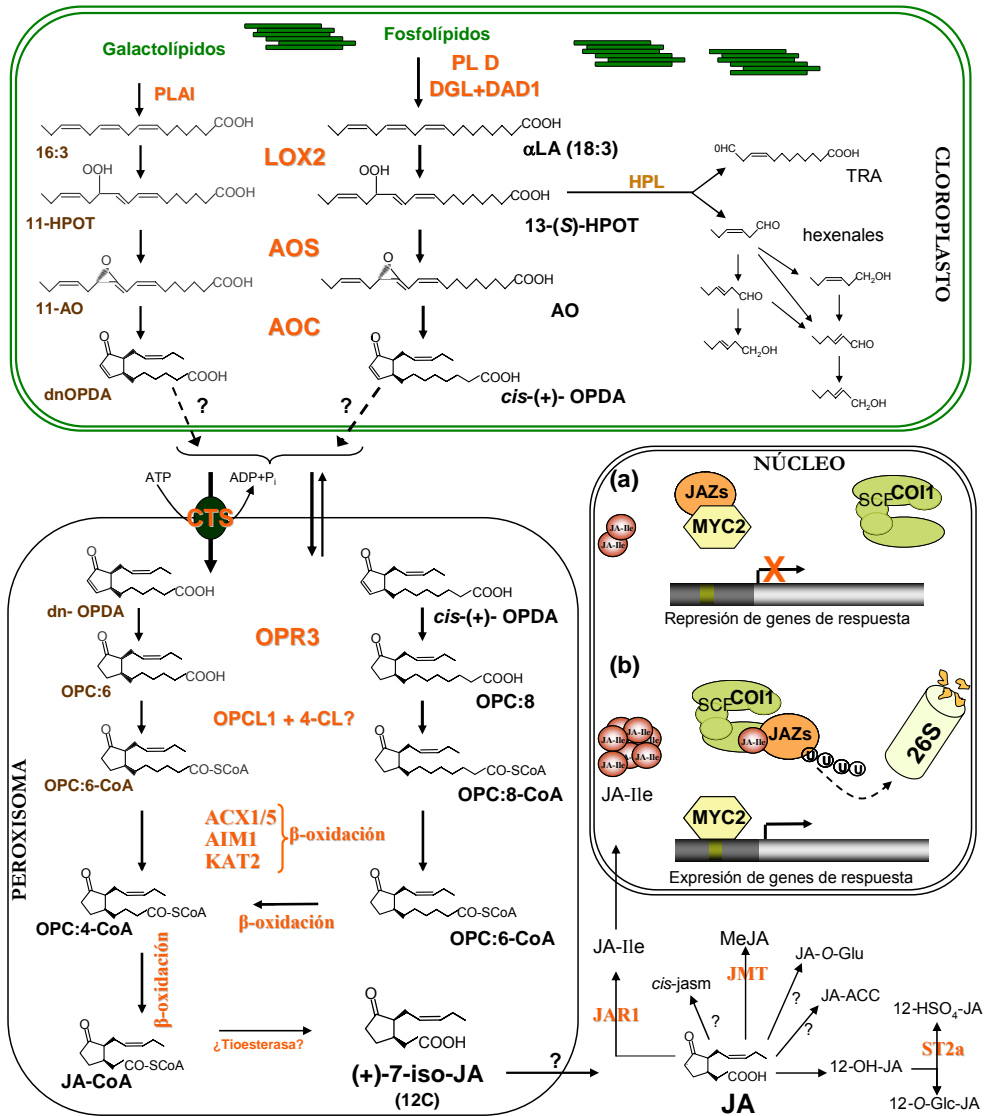


Figura 1. Biosíntesis, metabolismo y señalización del JA en Arabidopsis.

El JA y sus derivados se sintetizan a partir de la ruta de los octadecanoides que tiene lugar en cloroplastos y peroxisomas. En el citoplasma, el JA puede ser modificado a diferentes compuestos con actividad biológica. Dentro del núcleo, la señalización de JA implica la interacción entre el complejo SCF^{CO11} y las proteínas JAZ dependiente de Ja-Ile. Nomenclatura descrita en "Abreviaturas". Adaptado de Baker et al., 2006; Miersch et al., 2008; Staswick, 2008.

Una vez sintetizado, el JA es liberado al citoplasma donde puede ser modificado por glicosilación, metilación y aminoacilación. Muchos de los compuestos generados presentan actividad biológica (revisado por Sembdner y Pathier, 1993; Schaller et al., 2005; Wasternack et al., 2007) y se conocen algunas de las enzimas implicadas en estas modificaciones (Seo et al., 2001; Gidda et al., 2003) (figura 1). Entre ellos, el MeJA, molécula de alta volatilidad, presenta la actividad biológica del ácido libre (revisado por Weber, 2002; Cheong y Choi, 2003) y puede difundir a partes distales de la planta a través del floema y xilema o por transporte aéreo (Seo et al., 2001; Thorpe et al., 2007). El *cis*-jasmonato (*cis*-jasm) es un producto volátil implicado en defensa (Birkett et al., 2000; Pickett et al., 2007; Bruce et al., 2008; Moraes et al., 2008). El ácido tuberónico o 12-hidroxijasmonato (12-OH-JA) se ha relacionado recientemente con la supresión de las respuestas dependientes de JA (Miersch et al., 2008). Por último, la conjugación del JA con aminoácidos, principalmente isoleucina (Ile), por la enzima JA-amido sintetasa JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1) (Staswick et al., 2002; Staswick y Tiryaki, 2004) es activa y da lugar a derivados con actividad similar al JA o MeJA, y se relaciona también con la defensa de las plantas (Kramell et al., 1997; Staswick et al., 1998; 2002; Berrocal-Lobo y Molina, 2004; Kang et al., 2006; Wang et al., 2008). El mutante *jar1/methyl-jasmonate insensitive 4* (*jin4*) presenta insensibilidad a JA, indicando que la adenilación del JA es necesario para activar la señalización dependiente de JA, aunque recientemente se ha descrito que, al menos en respuesta a herida, debe haber otras enzimas implicadas (Suza y Staswick, 2008).

1.1.2. Señalización de JAs.

La caracterización de mutantes ha permitido identificar componentes importantes en la ruta de señalización de JA (revisado por Lorenzo y Solano, 2005; Schilmiller y Howe, 2005; Delker et al., 2006; Gfeller et al., 2006; Liechti y Farmer, 2006; Wasternack, 2007). Entre ellos, CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) es el regulador central en la señalización mediada por JA, aunque también se ha descrito la activación de genes dependientes de JA por una vía independiente de COI1 (Devoto et al., 2005). El mutante *coi1* es totalmente insensible a JA y a la fitotoxina coronatina (homóloga estructuralmente al JA) y por tanto, presenta alteraciones en todos los procesos regulados por JA (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998; Li et al., 2004b; Devoto et al., 2005). COI1 es una proteína de tipo

F-box (Xie et al., 1998) y forma parte del complejo ubiquitina E₃ ligasa de tipo SKP-culina-F-box (SCF) implicado en la degradación de proteínas a través de la ruta ubiquitina-proteosoma 26 S (Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002). Se conocen varios factores de transcripción (FT) que regulan la expresión de genes dependientes de JA por debajo de COI1 (revisado por Wasternack, 2007). En este sentido, recientemente se ha descubierto que en la señalización de JA entre COI1 y los genes de respuesta, interviene una familia de represores transcripcionales llamados JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ). Con niveles bajos de JA, las proteínas JAZ reprimen la expresión de los genes de respuesta temprana a JA por interacción directa con los FT. Niveles altos de JA promueven la unión de las proteínas JAZ con el complejo SCF^{COI1}, siendo ubiquitinadas para degradación por el complejo proteosoma 26 S y permitiendo por tanto, la derepresión de los genes de respuesta a JAs (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; revisado por Farmer, 2007; Staswick, 2008) (figura 1). Únicamente JA-isoleucina (JA-Ile) y no otros derivados como JA, MeJA, u OPDA promueve la interacción física entre SCF^{COI1} y JAZ1 (Thines et al., 2007). Las proteínas JAZ parecen estar implicadas en la defensa contra insectos y activan su expresión en respuesta a JA y herida (Thines et al., 2007; Yan et al., 2007; Chung et al., 2008), aunque quedan por determinar sus funciones biológicas y las interacciones que establecen. En ese sentido, el único FT descrito hasta ahora que interacciona con la familia JAZ, concretamente con JAZ3 y JAZ1, es MYC2 (Chini et al., 2007). MYC2 es un FT de tipo bHLH (*basic helix-loop-helix*) ampliamente caracterizado en la señalización por JA (Berger et al., 1996; Lorenzo et al., 2004). El mutante *jasmonate insensitive1(jai1)/jin1* deficiente en MYC2, presenta un fenotipo de insensibilidad a JA más débil que COI1 ya que MYC2 no interviene en todas las respuestas dependientes de JA (Lorenzo et al., 2004). MYC2 también regula las respuestas a sequía dependientes de ABA (Abe et al., 2003) y recientemente se ha descrito que MYC2 modula las respuestas a JA regulando otros FT intermediarios (Dombrecht et al., 2007), entre los que se encuentran los FT de la familia NAC (Bu et al., 2008). Además de MYC2, otros FT como ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1), FTs con dominios AP2 y varios FT de la familia WRKY y de la familia OCTADECANOID RESPONSIVE ARABIDOPSIS (ORA), intervienen en la señalización mediada por JA actuando positivamente o negativamente dependiendo del factor de estrés o fase del desarrollo (Gfeller y Farmer, 2004). La regulación de los distintos FT de cada vía de señalización activada, determinará las respuestas generadas en cada caso.

1.1.3. Funciones de los JAs relacionadas con el desarrollo.

Los JAs intervienen en múltiples procesos fisiológicos de las plantas tales como el establecimiento de micorrizas arbusculares durante la asociación con hongos, en el enrollamiento de los zarcillos, la maduración de los frutos, la mecanotransducción, la formación de tricomas, la tuberización de la patata, el desarrollo floral, la senescencia y la inhibición del crecimiento (revisado por Parthier 1991; Koda, 1992; 1997; Sembdner y Parthier, 1993; Creelman y Mullet 1995; 1997b; Wasternack y Hause, 2002; Browse, 2005; Delker et al., 2006; Wasternack, 2007; Balbi y Devoto, 2008). Además, se ha descrito recientemente a los JAs como reguladores de la morfogénesis de hojas y raíces en soja (Xue y Zhang, 2007) y como potenciales agentes anticancerígenos (revisado por Flescher, 2005; 2007). Entre estas funciones destacamos su papel en el desarrollo floral y en los procesos de senescencia.

1.1.3.1. Desarrollo floral.

En órganos reproductivos, principalmente estambres, se encuentran niveles elevados de JA, OPDA y otros conjugados de JA cuya función principal es sincronizar los últimos estadios del desarrollo floral, interviniendo en el desarrollo y dehiscencia de las anteras, la elongación del filamento, la maduración del polen y la anthesis (Turner et al., 2002; Delker et al., 2006; Wasternack, 2007, Balbi y Devoto, 2008). Mutantes de *Arabidopsis* afectados tanto en la síntesis como en la percepción de JA presentan esterilidad masculina debido a defectos en la maduración de la antera y del polen, siendo este fenotipo rescatado por la aplicación exógena de JA o algún precursor biosintético. Entre éstos se encuentran, el triple mutante *fad3-2fad7-2fad8*, deficiente en tres desaturasas de ácidos grasos (FAD) que dan lugar a niveles indetectables de ácidos trienoicos, precursores de oxilipinas (McConn y Browse, 1996), el mutante *dad1* deficiente en la PL A₁ DAD1 (Ishiguro et al., 2001), los mutantes *aos* y *delayed-dehiscence 2-2 (dde2-2)* afectados en el gen AOS (von Malek et al., 2002; Park et al., 2002) y los mutantes *opr3* y *dde1*, deficientes ambos en el gen *OPR3* (Sanders et al., 2000; Stintzi y Browse, 2000). En este último caso, el fenotipo es rescatado únicamente con la aplicación exógena de JA pero no con la aplicación de OPDA indicando que, a diferencia de otros procesos donde el OPDA ejerce una función reguladora, en el desarrollo floral el JA parece ser la molécula esencial y no puede ser suplida por otros precursores. Por otra parte, el mutante *coi1-1* presenta

androesterilidad que no es restablecida por la aplicación exógena de JA (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Sin embargo, los mutantes *jar1/jin4* y *jin1/jai1* no son androestériles porque en estos mutantes no están afectadas todas las respuestas a JA. Curiosamente en tomate, la pérdida de función del gen homólogo a COI1, produce esterilidad por un defecto en el control maternal de la maduración de la semilla, indicando que la ruta de señalización JA/COI1 regula los procesos de desarrollo floral de manera distinta en tomate y *Arabidopsis* (Li et al., 2004b). Aunque no se ha establecido con exactitud la señalización de JA en los órganos florales, estudios en el mutante estéril *arf6/arf8*, deficiente en dos factores de respuesta a auxinas (ARF), han determinado que las auxinas regulan la dehiscencia de la antera induciendo la producción de JA (Nagpal et al., 2005). Además, se han descrito a dos FT, MYB21 y MYB24 cuya expresión génica aumenta en respuesta a JA y que median en las respuestas de JA durante los procesos de maduración del estambre (Mandaokar et al., 2006). Por último, recientemente se ha descrito que AGAMOUS, FT tipo MADS cuya función se relaciona con el control del desarrollo de los órganos florales, controla la maduración tardía del estambre regulando directamente la expresión del gen *DADI*, activando así la biosíntesis de JA en esta etapa final del desarrollo floral (Ito et al., 2007).

1.1.3.2. Senescencia.

El comienzo de la senescencia representa el final de la vida funcional de los órganos y la entrada en una fase catabólica que termina con la muerte celular y la degradación del órgano. Este proceso complejo implica cambios fisiológicos, bioquímicos y de expresión génica que están regulados por una red que integra tanto factores endógenos como exógenos coordinados finamente a través de rutas de señalización comunes que actualmente no se conocen en profundidad (revisado por Guo y Gan, 2005; Lim y Nam, 2005; Hopkins et al., 2007; Lim et al., 2007). En los últimos años, están siendo identificados y caracterizados los eventos moleculares que participan o regulan la senescencia de hojas y las vías de señalización desencadenadas por hormonas (Buchanan-Wollaston et al., 2003, 2005; Lin y Wu, 2004, van der Graaff et al., 2006). JA, ABA, ácido salicílico (SA), brasinoesteroides y Et regulan la expresión de genes necesarios para el desarrollo de la senescencia, mientras que citoquininas y giberelinas tiene un papel en su supresión (revisado por Lim y Nam, 2005; Lim et al., 2007). La función del JA como promotor de la senescencia se conoce desde los años 80 en distintas especies vegetales

(Ueda y Kato, 1980; Parthier, 1990; Chou y Kao, 1992; Porat y Halevy, 1993). En *Arabidopsis*, el tratamiento con JA induce la expresión de muchos genes marcadores de senescencia (SAG) (Park et al., 1998; Schenk et al., 2000; He et al., 2001) e induce síntomas de senescencia prematura que no ocurren en el mutante *coi1-1* (He et al., 2002). Además, en hojas senescentes se produce un aumento en la síntesis y acumulación de JA y en la expresión de genes que codifican enzimas de su biosíntesis (He et al., 2002; Buchanan-Wollaston et al., 2005). El fenotipo de retraso de la senescencia del mutante *coi1-1* indica que para el desencadenamiento de la senescencia es necesaria la percepción y señalización de JA (He et al., 2002). Sin embargo, la complejidad de la regulación de la ruta queda patente en un estudio reciente que determina que la herida o la aplicación de JA produce represión de varios genes SAG (Devoto et al., 2005). De manera general, la función del JA en senescencia se relaciona con la regulación negativa de la fotosíntesis y con la activación de genes de defensa (Weaver et al., 1998; Quirino et al., 1999; Tsuchiya et al., 1999; Wasternack, 2006). Se han descrito dos reguladores de la ruta de JA en senescencia, la F-box ORE9, regulador clave que relaciona senescencia con degradación de proteínas vía ubiquitina proteosoma (Woo et al., 2001), y el FT de arroz DELAY OF THE ONSET OF SENESCENCE (DOS) que actúa como un regulador negativo de la senescencia, ya que plantas iRNA DOS muestran una hiperactividad de la ruta de JA y senescencia adelantada (Kong et al., 2006). Por último, la senescencia también puede inducirse por cambios en factores ambientales como la temperatura, nutrientes o luz. La incubación de hojas cortadas en oscuridad provoca una rápida senescencia inducida que correlaciona con un aumento de la expresión de genes SAG y con síntomas de clorosis (Weaver y Amasino, 2001). En este sentido, aunque la senescencia natural dependiente de la edad y la inducida por oscuridad tanto en hojas cortadas como unidas a la planta, comparten algunos síntomas y componentes moleculares, los tres tipos de senescencia muestra diferencias significativas en los perfiles de expresión génica y en las rutas de señalización activadas. En este sentido, existen contradicciones en la participación de la ruta desencadenada por JA/Et. Un estudio relaciona al JA únicamente con la senescencia natural (van der Graaff et al., 2006) y otro con la senescencia tanto natural como inducida por oscuridad (Buchanan-Wollaston et al., 2005).

1.2. Salicilatos.

Los SAs son un grupo de derivados del ácido 2-hidroxibenzoico o SA. Estos compuestos se aislaron por primera vez en el siglo XIX a partir de extractos de sauce, y muchos de ellos se usan ampliamente en la industria farmacéutica debido a su efecto analgésico y antipirético (Pierpoint, 1997; Mackowiak, 2000). En las plantas, los SAs están implicados en multitud de procesos relacionados principalmente con la defensa frente a patógenos biotrofos y otros factores de estrés, aunque también se han descrito funciones en desarrollo (revisado por Dempsey et al., 1999; Shah, 2003; Glazebrook, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Halim et al., 2006; Loake y Grant, 2007).

1.2.1. Biosíntesis y metabolismo de SA.

El SA es un producto de la ruta general del ácido chiquímico que genera además una amplia gama de moléculas que incluye fenilpropanoides y aminoácidos aromáticos. En plantas, el SA puede ser sintetizado a través de dos rutas descritas hasta hace poco tiempo en organismos distintos. La vía de síntesis descrita en *Arabidopsis* es similar a la descrita en bacterias e implica únicamente a cloroplastos. En esta ruta, el corismato, por acción de la enzima cloroplástica isocorismato sintasa 1 (ICS1), se isomeriza hasta isocorismato (Wildermuth et al., 2001; Strawn et al., 2007) y posteriormente, se escinde en piruvato y SA por la actividad de una piruvato liasa (PLI) (Serino et al., 1995) (figura 2). En *Arabidopsis*, ICS2 también participa en la síntesis de SA aunque de manera residual comparado con ICS1 (Garcion et al., 2008). De hecho, los mutantes *salicylic acid induction deficient 2 (sid2)/enhanced disease susceptibility 16 (eds16)* afectados ambos en el gen *ICS1* no acumulan prácticamente SA tras la inoculación con patógenos o en respuesta a ozono, y presentan hipersusceptibilidad a patógenos biotrofos (Glazebrook et al., 1996; Nawrath y Métraux, 1999; Dewdney et al., 2000; Owaga et al., 2007). Estos datos sugieren que la ruta predominante de síntesis de SA en *Arabidopsis* es la del isocorismato. Sin embargo, la detección de SA en el doble mutante *ics1 ics2* que presenta una deficiencia total en la actividad ICS de *Arabidopsis*, sugiere que otra ruta alternativa de biosíntesis de SA es activa en *Arabidopsis* y contribuiría aproximadamente en un 20 % en el estado basal y en menor proporción en estados inducidos (Garcion et al., 2008). Aunque en *Arabidopsis* no se ha descrito otra ruta independiente de ICS, varios estudios han relacionado

indirectamente la síntesis de SA con la vía de fenilpropanoides de Solanáceas descrita a continuación (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996; Ferrari et al., 2003).

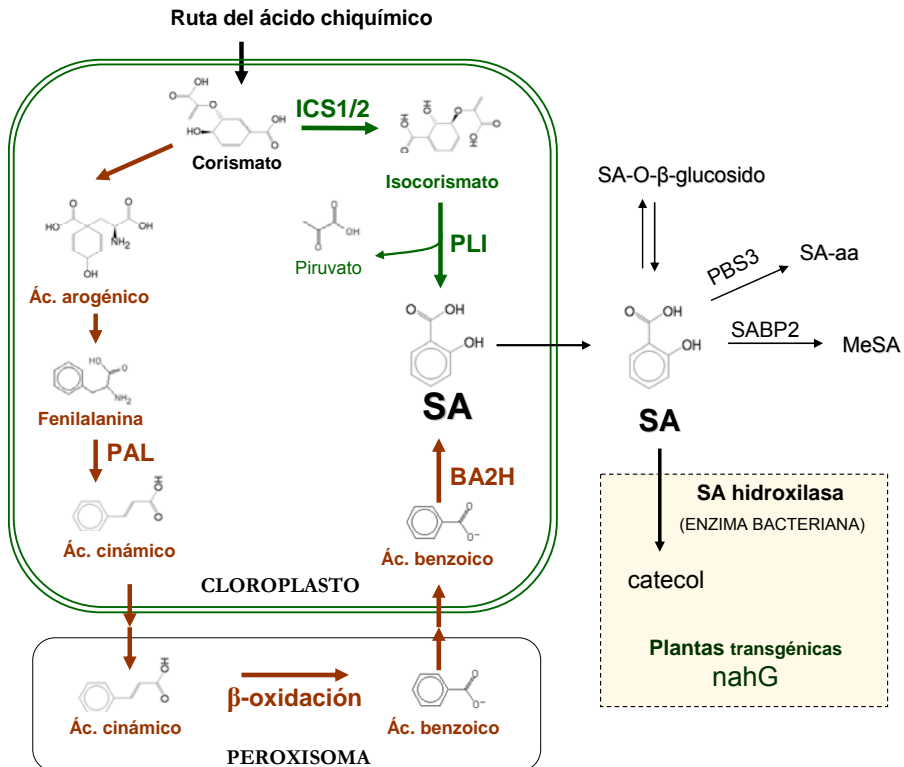


Figura 2. Biosíntesis y metabolismo del SA en plantas.

En plantas existen dos vías de síntesis de ácido salicílico (SA) procedentes de la ruta del ácido chiquímico. La ruta del isocorismato es esencialmente cloroplástica y la ruta de la fenilalanina implica a cloroplastos y peroxisomas. El SA en el citosol puede ser metabolizado a varios compuestos. Las plantas transgénicas *nahG* que incorporan la enzima bacteriana SA hidroxilasa, metabolizan el SA producido a catecol. Nomenclatura descrita en “Abreviaturas”.

En solanáceas, los estudios realizados en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV), relacionaban la síntesis de SA únicamente con la vía de la fenilalanina que necesita de cloroplastos y peroxisomas (Yalpani et al., 1993). En esta ruta,

la fenilalanina obtenida desde el corismato se convierte en ácido *trans*-cinámico tras una desaminación llevada a cabo por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996; Verbene et al., 1999) cuya deficiencia inhibe la resistencia al TMV (Pallás et al., 1996). En los peroxisomas, el ácido *trans*-cinámico tras una ronda de β -oxidación acorta su cadena propanoide en 2 C (Raskin, 1992; Ribnicky et al., 1998; Jarvis et al., 2000; Hertweck et al., 2001), y finalmente, el ácido benzoico producido por β -oxidación, se hidroxila en posición 2 del anillo aromático para dar SA por acción de la enzima ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H) (Yalpani et al., 1993; León et al., 1993; 1995) (figura 2). Además de estos resultados, otros estudios relacionaban la síntesis de SA con la ruta de fenilpropanoides en Solanáceas. Varias especies mostraban una acumulación de SA a partir de fenilalanina marcada radiactivamente (Garcion y Métraux, 2006) y en arroz se había descrito la participación de la BA2H en la biosíntesis de SA (Sawada et al., 2006). Sin embargo, en un estudio reciente se ha descrito que plantas transgénicas de tabaco deficientes en *ICS1* no acumulan SA en respuesta a estrés, lo que sugiere que la producción de SA en tabaco depende exclusivamente de isocorismato y que únicamente en respuesta a estrés podría intervenir residualmente la vía de la fenilalanina (Catinot et al., 2008). De igual manera, en tomate también se ha relacionado la síntesis de SA con la vía del ICS ya que plantas con deficiencia en la función ICS acumulan niveles bajos de SA en respuesta a *Pseudomonas* y muestran hipersusceptibilidad a este patógeno (Uppalapati et al., 2007).

El transporte del SA desde el interior del cloroplasto al citoplasma es un paso desconocido todavía. Se ha descrito una proteína de localización cloroplástica con homología a los transportadores MATE que es codificada por el gen *EDS5/SID1* que actúa por encima de *ICS1* en la biosíntesis de SA. Este gen activa su expresión fuertemente en respuesta a patógenos biotrofos, luz ultravioleta-C (UV-C) y SA, y el mutante *eds5/sid1* es defectivo en la acumulación de SA tras la inoculación con patógenos biotrofos y presenta hipersusceptibilidad a patógenos (Dewley et al., 2000; Nawrath et al., 2002). El SA libre se conjuga predominantemente como SA-*O*- β -glucósido en la vacuola pudiendo ser liberado de nuevo después de una infección con patógenos por la acción de glucosil hidrolasas. Además, otros metabolitos del SA son activos biológicamente y proporcionan respuestas de defensa específicas. El metil salicilato (MeSA) formado a partir de SA por la SA BINDING PROTEIN 2 (SABP2), se ha descrito recientemente como la señal móvil necesaria para activar la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) en tabaco (Park et al., 2007). La conjugación con aminoácidos realizada por la aminoácido sintetasa PBS3 tiene un papel

esencial para desencadenar algunas de las respuestas de defensa (Nobuta et al., 2007). Además de los mutantes de biosíntesis, múltiples estudios se basan en el empleo de plantas transgénicas nahG, que expresan constitutivamente el gen codificante de una SA hidroxilasa de *Pseudomonas putida* que degrada el SA a catecol (figura 2). Las plantas nahG que no acumulan SA, muestran hipersusceptibilidad a un amplio espectro de patógenos (hongos, oomicetos, bacterias y virus) y no activan genes *PATHOGENESIS RELATED (PR)* (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; 1995; Lawton et al., 1995).

1.2.2. Señalización de SAs.

En *Arabidopsis* se han identificado varios mutantes afectados en la ruta de transducción de SAR que es dependiente de SA, permitiendo identificar alguno de los componentes implicados en la ruta. EDS1 y PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) constituyen un centro regulatorio esencial para la resistencia basal contra patógenos biotrofos (Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999; Feys et al., 2001). Ambas proteínas presentan homología con acil transferasas, interaccionan entre si y actúan conjuntamente potenciando la acumulación de SA, activando la señalización de SA y también median el antagonismo entre JA y Et en las vías activadas en defensa (revisado por Wiermer et al., 2005). El gen *NONEXPRESSER OF PR GENES 1 (NPR1)/NON INDUCIBLE IMMUNITY 1 (NIMI)/SALICYLIC ACID INSENSITIVE 1 (SAI1)* codifica al regulador central en la ruta de transducción de SA (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995; Glazebrook et al., 1996; Shah et al., 1997). No obstante, la señalización de SA está mediada tanto por mecanismos dependientes de NPR1 como independientes (Bowling et al., 1997; Shah, 2003). El SA afecta a la actividad de NPR1 en dos niveles, primero, activa su expresión y segundo, produce cambios redox conducentes a la reducción de oligómeros de NPR1 en el citosol dando lugar a monómeros que se pueden transportar al núcleo (Kinkema et al., 2000; Mou et al., 2003; Rochon et al., 2006). Dentro del núcleo, NPR1 interacciona con factores de transcripción de la familia bZIP tipo TGA, esenciales para activar SAR (Zhang et al., 2003), los cuales dirigen la activación transcripcional de genes de defensa (Després et al., 2000; Subramaniam et al., 2001; Fan y Dong, 2002; Johnson et al., 2003; Durrant y Dong, 2004). Algunos TGAs se unen directamente a elementos *cis* presentes en los promotores de genes de respuesta a SA como *PRI* (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000). Por otro lado, a diferencia de JA, no se conoce si la regulación de SA está mediada por la degradación de reguladores negativos vía proteosoma, pero la sumoilación parece ser fundamental en la

regulación de SA ya que se ha descrito la participación de la proteína E3 ligasa SUMO SIZ1 en la regulación de la inmunidad innata y en la floración mediada por SA (Lee et al., 2007; Jin et al., 2008). Por debajo de NPR1, varios FT, entre ellos algunos componentes de la familia WRKY, participan como activadores o como represores de las respuestas defensivas dependientes de SA (Wang et al., 2006; Zheng et al., 2007; van Verk et al., 2008), siendo muy complejas las combinaciones existentes entre los FT de todas las vías de señalización activadas (revisado por Eulgem, 2006; Eulgem y Somssich, 2007).

1.2.3. Funciones de SAs relacionadas con el desarrollo.

Los SAs intervienen en varios procesos del desarrollo de las plantas que han sido estudiados en menor proporción que las respuestas a estrés. El SA está implicado en el desencadenamiento de la termogénesis que consiste en un aumento de la temperatura en los apéndices de las flores de plantas del género *Arum*, promoviendo la emisión de compuestos volátiles que pueden funcionar como atrayentes de insectos (Raskin, 1992). Además, el SA se ha relacionado con la regulación de la senescencia y del tiempo de floración como se detalla a continuación.

1.2.3.1. Senescencia.

Como se ha comentado en el apartado 1.1.3.2., la vía de señalización de SA está implicada en la regulación de la senescencia natural de hojas de manera que el SA actúa promoviendo los procesos asociados a senescencia. Las hojas senescentes acumulan grandes cantidades de SA, y la expresión de varios genes SAG es dependiente de esta hormona (Quirino et al., 1999; Morris et al., 2000). Además, plantas deficientes en la señalización de SA (*pad4* y *npr1*) o plantas *nahG* muestran un fenotipo de retraso de senescencia correlacionando con una reducción en la expresión de algunos genes SAGs (Morris et al., 2000, Buchanan-Wollaston et al., 2005). Los datos transcriptómicos han relacionado la ruta de señalización de SA únicamente con el desencadenamiento de la senescencia natural (Buchanan-Wollaston et al., 2005; van der Graaff et al., 2006). En este sentido, se ha relacionado al SA en senescencia con los procesos de muerte celular que se desencadenan en el tejido senescente (Lim y Nam, 2007).

1.2.3.2. Floración.

El SA se ha relacionado con los eventos moleculares que desencadenan la transición a la floración. En los años 70 ya se propuso al SA como una molécula con actividad inductora de la floración (Cleland y Ajami, 1974; Watanabe et al., 1981). Posteriormente, estudios en plantas deficientes en SA han permitido determinar la función reguladora de SA en este proceso. En ausencia de estrés, plantas deficientes en la biosíntesis de SA (*sid2/eds16* y *eds5/sid1*) o plantas *nahG*, presentan floración tardía, cuyo fenotipo silvestre se recupera por la aplicación exógena de SA en las plantas *sid2/eds16* y *eds5/sid1* (Martínez et al., 2004). La señalización de SA en la regulación del tiempo de floración implica tanto a la vía dependiente del fotoperiodo como a la vía autónoma (Martínez et al., 2004). Sin embargo, queda por determinar si existen cambios en los niveles endógenos de SA que determinen el cambio a estado reproductivo y los componentes moleculares que explican la función reguladora del SA en la floración.

2. Respuestas de defensa en plantas.

Desde los años 90 se conocen las funciones reguladoras de los JAs en las respuestas a herida mecánica o causada por insectos o herbívoros y frente a patógenos necrotrofos (revisado por Rojo et al., 2003; Stratmann, 2003b; Halitschke y Baldwin, 2004; Howe, 2004; Browse, 2005; Glazebrook, 2005; Halim et al., 2006; Wasternak, 2007; Browse y Howe, 2008). El JA también regula las respuestas a ozono eliminando el estrés oxidativo ocasionado (Overmyer et al., 2000; Rao et al., 2000; Sasaki-Sekimoto et al., 2005). Además del JA, la resistencia a insectos y a *Alternaria brassicicola* en el mutante *opr3*, incapaz de sintetizar JA, demostró que el OPDA es una molécula biológicamente activa en las respuestas de defensa en *Arabidopsis* (Stintzi et al., 2001). El OPDA activa la expresión de múltiples genes independientemente de COI1, indicando que el JA y el OPDA regulan distintos grupos de genes (Stintzi et al., 2001, Taki et al., 2005). Además, recientemente se ha descrito que el OPDA también puede modular la expresión génica vía COI1 de manera distinta a JA (Ribot et al., 2008), indicando estos resultados que existe tanto un solapamiento como componentes diferentes en la activación mediada por ambas moléculas en respuesta a patógenos o herida. El OPDA también tiene funciones específicas en procesos del desarrollo (Blechert et al., 1999; Ohashi et al., 2005), y recientemente se ha

descrito la participación del OPDA esterificado a galactolípidos de la membrana en las respuestas a herida y en la respuesta hipersensible (HR) (Kourtchenko et al., 2007). En este sentido, cada vez hay más evidencias que sugieren que los distintos tipos de oxilipinas intervienen en respuestas de defensa o procesos del desarrollo por vías de señalización específicas en cada caso (Vellosillo et al., 2007; Mueller et al., 2008). Por otro lado, el SA es el componente esencial en la activación de las respuestas de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos biotrofos, función que ha sido investigada en profundidad en diferentes patosistemas (revisado por Shah, 2003; Glazebrook, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Halim et al., 2006). Además, el SA también interviene en las respuestas a determinados factores de estrés como la irradiación de las plantas con luz UV-C y la exposición a ozono (Yalpani et al., 1994; Rao y Davis, 1999; Rao et al., 2002).

2.1. Respuestas a herida.

La ruta de señalización de JA tiene una función esencial en la activación de las respuestas de defensa frente a herida mecánica o causada por insectos o herbívoros (Howe, 2004; Schillmiller y Howe, 2005; Wasternack et al., 2006). La elicitación por componentes del insecto o la herida originan una cascada de señalización molecular que produce la generación y percepción de señales primarias en los tejidos dañados, la activación de canales iónicos en la membrana plasmática y la fosforilación reversible de proteínas. Como consecuencia, se originan respuestas de tipo fisiológico, cambios en el metabolismo secundario y se genera una segunda ola de señales dirigidas a activar y propagar las respuestas de defensa. Entre los compuestos de defensa se encuentran compuestos volátiles, de reparación del tejido dañado y proteínas con efectos negativos sobre los insectos como los inhibidores de proteinasas descritos en solanáceas (revisado por Walling, 2000; León et al., 2001; Halitschke y Baldwin, 2004; Howe, 2004; Kessler et al., 2004). Aunque el reconocimiento de elicitores específicos del insecto por la planta da lugar a una respuesta compleja y específica en cada interacción planta-insecto (Kessler y Baldwin, 2002), se ha descrito que la herida mecánica libera compuestos volátiles con un patrón similar al ataque de herbívoros (Reymond et al., 2000; Mithöfer et al., 2005; Major y Constabel, 2006; Ralph et al., 2006). Existen variaciones específicas en las respuestas a herida en diferentes especies de plantas. Concretamente, las más estudiadas han sido algunas especies de la familia de las Solanáceas y en segundo término, *Arabidopsis thaliana*.

2.1.1. Respuestas a herida en Solanáceas

Las respuestas a herida en *Solanum lycopersicum*, planta modelo para el estudio en solanáceas, implica la participación de la sistemina, péptido de 18 aminoácidos que activa la expresión de los genes *PI* que codifican inhibidores de proteinasas (PI) (Pearce et al., 1991; Bergey et al., 1996; Ryan y Pearce, 1998), y la biosíntesis de JA a través de la ruta de los octadecanoides, necesaria para la activación de los genes *PI* (Farmer y Ryan, 1992). Además de la sistemina, otros péptidos ricos en hidroxiprolina descritos en muchas especies de solanáceas intervienen en la activación de genes *PI* en respuesta a herida (Pearce et al., 2001, Pearce y Ryan, 2003; Ryan y Pearce, 2003; Narváez-Vásquez et al., 2005; 2007), sugiriendo una gran complejidad en los primeros pasos de la señalización. La herida activa a nivel local el procesamiento de la sistemina desde su precursor (prosistemina) que se localiza en células del parénquima floemático (Narváez-Vásquez y Ryan, 2004) y, posteriormente, se une al receptor SR160 localizado en la membrana plasmática (Scheer y Ryan, 2002). La percepción de la sistemina en la membrana activa la ruta de los octadecanoides por una señalización desconocida pero que implica la despolarización de la membrana (Moyen y Johannes, 1996), activación de MAP quinasas (Stratmann y Ryan, 1997) y aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico (Moyen et al., 1998; Chico et al., 2002; Mayrose et al., 2004). El α LA es liberado de las membranas cloroplásticas (Conconi et al., 1996a) junto con un aumento de la expresión de los genes de biosíntesis dando lugar a la producción de JA en la zona dañada, principalmente asociada a tejido vascular (Ryan y Moura, 2002; Wasternack y Hause, 2002; Stenzel et al., 2003a; Howe, 2004; Schillmiller y Howe, 2005). La deficiencia en alguno de los genes *LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR3* y *ACXI* produce una menor respuesta a herida y una disminución de la resistencia a herbívoros (Royo et al., 1999; Laudert et al., 2000; Stenzel et al., 2003a; Halitschke y Baldwin, 2004; Li et al., 2005). Además de la sistemina, otros compuestos y el propio JA, por un mecanismo de retroalimentación positiva, aumentan la síntesis de JA y la expresión de genes dependientes de esta hormona en respuesta a herida. Entre estos compuestos, los oligogalacturónidos (OGAs) derivados de las paredes celulares (Bishop et al., 1981; Doares et al., 1995b), el Et (O'Donnell et al., 1996), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Orozco-Cárdenas et al., 1999; 2001) y el Ca^{2+} (Dombrowski y Bergey, 2007) actúan conjuntamente activando la expresión de genes *PI*, y por el contrario, el SA y el óxido nítrico (NO) reprimen la expresión de estos genes en respuesta a herida (Doares et al., 1995a; Orozco-Cárdenas y Ryan, 2002). Los genes de respuesta a herida en tomate se clasifican, según la

sensibilidad a JA, en genes totalmente dependientes de JA (genes *D*), independientes de JA (genes *I*) y de activación intermedia entre las dos anteriores (genes *I/D*), siendo la vía independiente la menos caracterizada (Howe, 2004). Los genes dependientes de JA (genes *D*) se activan por una vía mediada por COI1 (Li et al., 2004b) y por un FT de tipo MYC (Boter et al., 2004). En tejidos alejados de la herida se produce también la activación de genes de defensa. Experimentos de injertos realizados en mutantes afectados en la síntesis o señalización de JA en tomate, han demostrado que la señalización sistémica requiere la percepción de JA pero no su biosíntesis, mientras que la generación de la señal sistémica requiere de la síntesis de JA en la zona dañada, sugiriendo que el JA o algún JAS relacionado actúan como señal transmisible a larga distancia (Li et al., 2002a; Stratmann, 2003b; Howe, 2004; Schilmiller y Howe, 2005). A diferencia de *Arabidopsis*, el OPDA no tendría una función esencial en la activación de resistencia en solanáceas (Schilmiller y Howe, 2005). La sistemina, que no actúa como una señal móvil, sería necesaria para la síntesis o translocación de la señal sistémica desde los haces vasculares de las zonas dañadas (Li et al., 2002a; Lee y Howe, 2003; Stratmann, 2003b; Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack et al., 2006). Sin embargo, la identificación de genes inducibles por herida a nivel sistémico independientemente de la señalización de JA implica que otras vías de señalización deben estar actuando a larga distancia (Howe, 2004). En este contexto, además de las otras hormonas mencionadas anteriormente, se ha descrito que la acumulación de ABA y la percepción de esta hormona es necesaria para la activación de la expresión de los genes *PI* en respuesta a herida, siendo la acumulación de ABA previa a la de JA (Hildman et al., 1992; Peña-Cortés et al., 1989; 1991; 1995; Carrera y Prat, 1998; León et al., 2001). Sin embargo, se ha sugerido que el ABA no debe ser una señal primaria en la activación de defensa, pero posiblemente esté implicada en el mantenimiento de las condiciones fisiológicas óptimas en las respuestas a herida (Birkenmeier y Ryan, 1998).

2.1.2. Respuestas a herida en *Arabidopsis*

En *Arabidopsis*, donde no está presente la sistemina, recientemente se ha descrito la existencia de un péptido similar que interviene en la señalización por herida y forma parte de la respuesta inmune innata (Huffaker et al., 2006; Ryan et al., 2007). Los primeros pasos de la herida en *Arabidopsis* tras la percepción de las señales primarias, implican la liberación de OGAs desde las paredes celulares activando una ruta de señalización que no

está mediada por JA y que es responsable de la activación génica preferentemente en las zonas próximas a la herida.

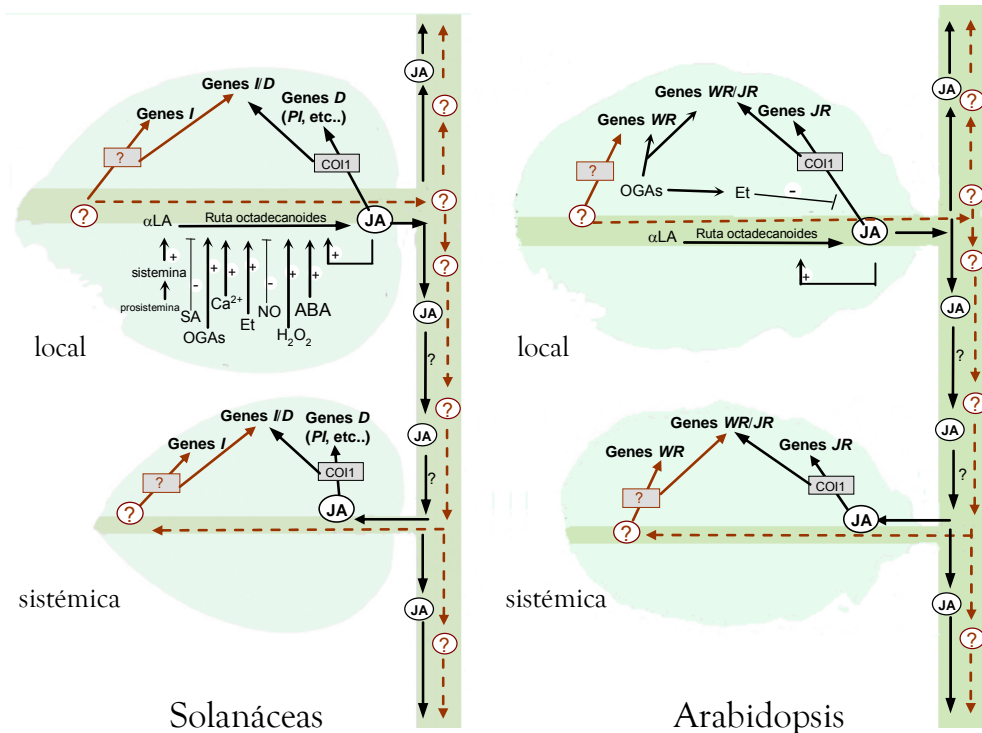


Figura 3. Vías de señalización activadas en respuesta a herida en Solanáceas y en Arabidopsis.

El JA es la molécula señal más importante en las respuestas a herida en solanáceas y en Arabidopsis, aunque existen diferencias entre los dos tipos de respuesta. En solanáceas, los OGAs, Ca²⁺, Et, H₂O₂ y ABA actúan promoviendo la síntesis de JA y la activación de los genes dependientes de COI1/JA (genes D) entre los que se encuentran los genes PI. Sin embargo, en Arabidopsis el Et ejerce un efecto negativo sobre la vía de señalización de JA a nivel local que produce la represión local de los genes dependientes de COI1/JA (genes JR). En Arabidopsis, los OGAs promueven la activación de genes WR en las zonas dañadas independientemente de la señalización de JA. Además, en Arabidopsis y en solanáceas, las respuestas a herida implican la activación de genes independientes de la señalización de JA a nivel local y sistémico (genes I en solanáceas y genes WR en Arabidopsis), sugiriendo que otras señales intervienen en las respuestas a herida y podrían translocarse a partes distales de la planta. Existe otro grupo de genes que se regula parcialmente tanto por la vía dependiente como por la vía independiente de JA (genes I/D en solanáceas y genes WR/JR en Arabidopsis). Nomenclatura descrita en “Abreviaturas”. Adaptado de Wasternack et al., 2006.

La otra vía de señalización implica la liberación de α LA de las membranas y la activación de la expresión de los genes de biosíntesis de JA (León et al., 2001). Esta vía de señalización mediada por JA es temporalmente reprimida a nivel local por los OGAs pero es totalmente activa en las zonas distales a la herida (Titarenko et al., 1997). En este sentido, contrariamente a lo observado en solanáceas donde el JA y Et actúan conjuntamente, en Arabidopsis, la represión de la vía dependiente de JA ejercida por los OGAs es mediada por la producción y percepción de Et en el tejido dañado (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1999), regulando de este modo el patrón de expresión temporal y espacial de los distintos genes de respuesta a herida (Rojo et al., 1999; León et al., 2001). A pesar de estas diferencias, ambas vías de señalización están reguladas en direcciones opuestas por elementos comunes como fosforilación reversible de proteínas (Rojo et al., 1998) y por Ca^{2+} /calmodulina que actuaría por debajo de los procesos de fosforilación en ambas vías de señalización y más concretamente por debajo de JA y COI1 en la vía dependiente de JA (León et al., 1998). En la vía de señalización dependiente de JA/COI1, MYC2 actúa en la señalización de herida por debajo de COI1 y regula las distintas respuestas desencadenadas por JA (Lorenzo et al., 2004). De manera genérica, los genes activados por los OGAs independientes de la señalización por JA se han denominado *Wound Responsive (WR)* y los genes que responden a herida de manera dependiente de la síntesis y percepción de JA se han denominado *JA Responsive (JR)* (Titarenko et al., 1997). Al igual que en tomate, también se han descrito genes que activan su expresión sistémica independientemente de JA, sugiriendo otras vías de señalización implicadas u otras moléculas móviles distintas de JA (Howe, 2004). En Arabidopsis, el ABA activa la expresión de MYC2 de manera dependiente de COI1, sugiriendo que ABA precede a JA en la activación de las respuestas de defensa (Lorenzo et al., 2004). Sin embargo, en Arabidopsis y otras especies se ha descrito que la activación de varios genes por JA es independiente de ABA, desacoplando en estos casos las vías de señalización de ambas hormonas en respuesta a herida (Lee et al., 1996; Dammann et al., 1997; León et al., 2001).

2.2. Respuestas a patógenos.

Las plantas tienen una serie de barreras constitutivas que incluyen una pared celular rígida, enzimas antimicrobianas y metabolitos secundarios que dificultan el acceso del patógeno y se denomina genéricamente resistencia específica de especie o resistencia “*non host*” (Thordal-Christensen, 2003). Cuando el patógeno logra superar esta barrera, aún

puede ser reconocido a nivel de la membrana plasmática celular dado que durante el ataque, el patógeno libera gran cantidad de elicitores que son reconocidos y activan en la planta la respuesta de defensa inducida (Thordal-Christensen, 2003; Mysore y Ryu, 2004). Los patógenos que superan la resistencia específica colonizan la planta siguiendo diferentes estrategias, dividiéndose de forma genérica entre patógenos biotrofos y necrotrofos, aunque algunos patógenos se comportan de manera diferente según las condiciones o su ciclo vital.

2.2.1. Patógenos necrotrofos

Los patógenos necrotrofos crecen sobre tejido vegetal que matan mediante la secreción de toxinas y enzimas e incluyen géneros como *Botrytis*, *Alternaria* y *Plectosphaerella* (Glazebrook, 2005). En los tejidos afectados por patógenos necrotrofos se produce una acumulación de ROS y muerte celular que promueve la propagación de la infección (Govrin y Levine, 2000). La cutícula interviene en la regulación de la defensa contra estos patógenos, ya que mutantes con alteraciones en la cutícula muestran inmunidad total a *Botrytis cinerea* (Bessire et al., 2007; Chassot et al., 2007). Además, los OGAs liberados de las paredes celulares inducen también múltiples respuestas de defensa en respuesta a necrotrofos independientemente de la señalización de JA, Et o SA (Ferrari et al., 2007). No obstante, el JA y el Et cooperan para la activación de la expresión de genes de defensa en las respuestas contra este tipo de patógenos (Xu et al., 1994; Penninckx et al., 1998). Los mutantes afectados en la síntesis o señalización de cualquiera de estas dos hormonas son incapaces de inducir respuestas de defensa y son más susceptibles al ataque de patógenos (Knoester et al., 1998; Vijayan et al., 1998; Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998; 1999). En la vía de señalización mediada por JA y Et en respuesta a patógenos necrotrofos tienen una función central los FT ERF1 y ORA59, que requieren para expresarse ambas hormonas. Los dos FT actúan por debajo de COI1 y ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2) y regulan la expresión de un amplio número de genes que responden tanto a Et como a JA, integrando ambas señales para la activación de genes de defensa (Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008). Las plantas transgénicas que sobreexpresan *ERF1* tienen aumentada la resistencia ante varios hongos necrotrofos (Berrocal-Lobo et al., 2002; Lorenzo et al., 2003; Berrocal-Lobo y Molina, 2004), al igual que las plantas sobreexpresoras de *ORA59* (Pré et al., 2008). Aunque se había descrito una función antagonista entre el ABA y la ruta de JA/Et (Anderson et al., 2004), recientemente se ha otorgado al ABA un papel clave como regulador positivo en las respuestas de defensa

contra algunos patógenos necrotrofos (Adie et al., 2007b). El ABA es necesario para que se produzca la síntesis de JA, sugiriendo que la acumulación de ABA precede a JA en la activación de las respuestas de defensa (Adie et al., 2007b).

2.2.2. Patógenos biotrofos

Los patógenos biotrofos, entre los que se encuentran las especies del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas* así como hongos oomicetos, desarrollan estructuras especializadas de alimentación (haustorios) que utilizan para extraer nutrientes de células vivas del huésped (Glazebrook, 2005). Durante la evolución, cepas de diferentes organismos fitopatógenos han ido adquiriendo factores de virulencia que les han permitido suprimir o evadir los mecanismos de defensa vegetal, y una vez iniciada la infección, multiplicarse, progresar sistémicamente invadiendo otros tejidos y desencadenar finalmente enfermedad en la planta hospedadora. La interacción entre estos patógenos virulentos y las correspondientes plantas susceptibles se denomina interacción compatible (IC). Sin embargo, en otros casos, algunos cultivares de las especies vegetales susceptibles, han coevolucionado con los factores patógenicos desarrollando genes de resistencia (R), que codifican proteínas que le sirven a la planta para reconocer específicamente a los factores de avirulencia de cepas patogénicas y protegerse de las infecciones producidas por los patógenos evitando la enfermedad. La mayoría de genes R codifica proteínas NBS-LRR y en *Arabidopsis*, los genes R más estudiados son los genes RPM1 y RPS2 que codifican proteínas que reconocen a las proteínas de avirulencia patogénicas *avrRpm1* y *avrRpt2*. En estos casos, los patógenos avirulentos que expresan genes de avirulencia (*avr*) dan lugar a interacciones de tipo incompatible (II) definida por la interacción gen a gen (*avr* con *R*) (Flor, 1971; revisado por Innes, 1998; Cohn et al., 2001; Nimchuk et al., 2003; Jones y Dangl, 2006; Bent et al., 2007). Diferentes cascadas de transducción de señales conectan el reconocimiento del patógeno con la respuesta defensiva a través de segundos mensajeros. Entre los principales segundos mensajeros producidos muy tempranamente ante infecciones se encuentran cambios en el nivel de Ca^{2+} citosólico, la producción de NO y ROS conjuntamente con la activación post-traduccional de cascadas MAPK y la variación de flujos iónicos (Scheel et al., 1998, Romero-Puertas y Delledonne, 2003; Romero-Puertas et al., 2004, Nürnberger et al., 2004; Zeier et al., 2004; Mur et al., 2006a; Torres et al., 2006). Estos procesos conducen finalmente a la HR y, como consecuencia, a una rápida muerte celular programada alrededor del punto de entrada del patógeno que limita el

establecimiento y la proliferación de éste (Dangl y Jones, 2001; Nimchuk et al., 2003; Abramovitch y Martin, 2004; Belkhadir et al., 2004; Nürnberger et al., 2004). La HR está programada genéticamente y sometida a numerosos mecanismos de control, tanto para activar su iniciación como para limitar su progresión (Mayda et al., 1999; Lorrain et al., 2003). Se ha propuesto que el H₂O₂, generado de la explosión oxidativa provocada por el patógeno, funcionaría como un regulador de la muerte celular que ocurre durante la HR (Lamb y Dixon, 1997; Alvarez et al., 1998; Bolwell, 1999; Mittler et al., 1999; Grant y Loake, 2000; Huffaker y Ryan, 2007). La activación de la respuesta defensiva HR activa a su vez una respuesta sistémica en la planta cuya función es aumentar la capacidad defensiva contra subsiguientes infecciones por patógenos virulentos y que se conoce como SAR (Glazebrook, 2001; Durrant y Dong, 2004; Beckers y Spoel, 2006). La respuesta SAR es efectiva contra un amplio espectro de patógenos, incluyendo bacterias, hongos y virus (Ryals et al., 1996; Sticher et al., 1997; Delaney, 2000; Durrant y Dong, 2004), y conlleva la activación de numerosos genes de defensa entre los que se encuentran los genes *PR* (Ward et al., 1991; Glazebrook, 1999; 2001; Maleck et al., 2000). A partir de estudios donde se correlacionaban niveles elevados de SA con la inducción de genes *PR* y mayor resistencia (Métraux et al., 1990; Malamy et al., 1990; Ward et al., 1991; Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996; Gorchach et al., 1996; Clarke et al., 2000; Jirage et al., 2001) y, por otra parte, deficiencia de SA con alteración de la resistencia basal y la SAR (Delaney et al., 1994; Dewdney et al., 2000; Wildermuth et al., 2001; Dong, 2001; Nawrath et al., 2002), se propuso que el SA era la molécula señal clave en la activación de la respuesta SAR. Posteriormente, se comprobó que aunque necesario para activar SAR, el SA no es la señal móvil que activa esta respuesta (Vernooij et al., 1994). Estudios posteriores sugirieron que moléculas de naturaleza lipídica podrían tener una función en la señalización de SAR a larga distancia y en general en la respuesta defensiva (Maldonado et al., 2002; Nandi et al., 2004; Shah, 2005). En *Arabidopsis*, se ha descrito a los JAs como componentes esenciales para el establecimiento de la respuesta SAR, ya que mutantes afectados en la biosíntesis o señalización de JA no pueden establecer la respuesta SAR frente a un patógeno avirulento (Truman et al., 2007). En tabaco, recientemente se ha descrito que el MeSA es la señal móvil necesaria para activar SAR (Park et al., 2007). NPR1/NIM1/SAI1 es el componente central en la señalización de SAR. El mutante *npr1/nim1/sai1*, que acumula niveles elevados de SA después de la infección, es altamente susceptible a patógenos (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995; Glazebrook et al., 1996) y la sobreexpresión del gen confiere a

la planta resistencia frente a un amplio espectro de patógenos biotrofos (Cao et al., 1997; 1998; Friedrich et al., 2001; Chern et al., 2001; 2005).

2.3. Respuestas a la luz ultravioleta.

Las respuestas de reparación y protección de las plantas frente a la luz UV incluye entre otros, la expresión de genes de la síntesis de flavonoides, genes codificantes de enzimas con capacidad antioxidante, fotoliasas y genes relacionados con la resistencia frente a patógenos, incluyendo quitinasas, β -glucanasas, lipoxigenasas y proteínas PR (revisado por Kunz et al., 2006). Las vías de señalización activadas por radiación UV-B y UV-C implican a componentes típicos de las respuestas de defensa como ROS, NO, Ca^{2+} , MAPK, JA, SA y Et (Surprus et al., 1998; Frohnmeyer et al., 1999; A.-H.-Mackerness et al., 1999; 2001; A.-H.-Mackerness, 2000; Broshé y Strid, 2003; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Watanabe et al., 2006). La luz UV-B y UV-C producen estrés oxidativo que puede dañar el DNA y ambas radiaciones inducen muchos genes de defensa, pero en el caso de la luz UV-B, la activación de resistencia a patógenos no es provocada por daños en el DNA (Kunz et al., 2006). La luz UV-C aumenta los niveles de SA y la resistencia de las plantas a patógenos y virus (Brederode et al., 1991; Yalpani et al., 1994; Nawrath y Métraux, 1999) y en este sentido, se ha descrito que las vías de transducción que se activan en respuesta a UV-C y patógenos y que producen la acumulación de SA y la inducción de genes *PR* tienen varios elementos comunes como EDS1 o PAD4 (Nawrath et al., 2002). Además de la acumulación de SA, la radiación con UV-B o UV-C produce un aumento de la expresión de genes de respuesta a herida a través de la activación de la ruta de octadecanoides y por tanto de JA (Conconi et al., 1996b; Schaller, 2001). En este sentido, la exposición con UV-B aumenta la resistencia a insectos herbívoros, indicando un solapamiento entre los genes expresados en respuesta a herida o herbívoros y la luz UV-B y posiblemente de las vías de señalización activadas en cada caso (Stratmann, 2003a).

2.4. Interacciones reguladoras entre respuestas mediadas por JA y otras hormonas.

Las rutas de señalización establecen nodos de convergencia mediante elementos integradores o reguladores comunes, por medio de los cuales se activan grupos de genes de acción selectiva (Lorenzo et al., 2003; Li et al., 2004a). Estas interacciones regulatorias implican que un determinado factor de estrés puede activar no sólo defensas específicas frente a dicho factor sino también producir cambios en la respuesta de la planta frente a otros, dependiendo del balance final que se produzca en las interacciones entre las diversas rutas. En este sentido, se han descrito interacciones tanto positivas como negativas en complejas redes de señalización activadas por JA, Et, SA, ABA y NO conducentes a respuestas de defensa coordinadas (revisado por Dong, 1998; Kunkel y Brooks, 2002; Rojo et al., 2003; Devoto y Turner, 2005; Glazebrook, 2005; Lorenzo y Solano, 2005; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Fujita et al., 2006; Grün et al., 2006; Adie et al., 2007a; Wasternack, 2007; Loake y Grant, 2007).

2.4.1. Vías de señalización activadas por JA y Et.

Como se ha descrito anteriormente, el JA y el Et pueden actuar conjuntamente o de un modo antagónico en la regulación de las respuestas desencadenadas por diferentes factores de estrés (Rojo et al., 2003). En respuesta a la herida, se produce una inhibición a nivel local de la vía dependiente de JA por parte del Et (Rojo et al., 1999). Igualmente, en respuesta a estrés causado por ozono se ha descrito un efecto antagonista entre las vías de señalización mediadas por Et y JA (Overmyer et al., 2000). Por otro lado, en las respuestas frente a patógenos necrotrofos y herida, ERF1 y MYC2 actúan como integrantes de la interacción entre ambas hormonas, regulando de forma diferencial y opuesta la activación de genes pertenecientes a las dos ramas de señalización mediada por JA. De esta forma, MYC2 activa la expresión de genes de respuesta a herida pero previene la inducción de genes de respuesta a patógenos necrotrofos y, por el contrario, ERF1 regula en modo opuesto a estos dos grupos de genes (Lorenzo et al., 2003; 2004; Lorenzo y Solano et al., 2005). De hecho, el mutante *jin1/jai1* tiene aumentada la resistencia a algunos patógenos necrotrofos (Lorenzo et al., 2004; Nickstadt et al., 2004). Recientemente se ha otorgado a MYC2 nuevas funciones reguladoras en la señalización de JA. Entre ellas, MYC2 regula

positivamente la resistencia a insectos herbívoros, la tolerancia a estrés oxidativo y la síntesis de auxinas (Dombrecht et al., 2007).

2.4.2. Vías de señalización activadas por JA/Et y SA.

Tradicionalmente se han descrito funciones reguladoras antagonistas entre las vías de señalización de SA y JA/Et (revisado por Dong, 1998; Reymond y Farmer, 1998; Kunkel y Brooks, 2002; Rojo et al., 2003; Glazebrook et al., 2003; Devoto y Turner, 2005; Glazebrook, 2005; Lorenzo y Solano, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Halim et al., 2006; Wasternack, 2007; Loake y Grant, 2007; Balvi y Devoto, 2008). Entre los componentes implicados en esta relación antagonista, el gen *MPK4* que codifica la MAP quinasa 4, fue el primero identificado como un regulador de la interacción negativa entre las rutas de activación de defensa mediadas por JA y SA. El mutante *mpk4* expresa constitutivamente la respuesta SAR, presenta una mayor resistencia a patógenos biotrofos virulentos y no puede activar la defensa mediada por JA y Et y por tanto, presenta una mayor susceptibilidad a patógenos necrotrofos (Petersen et al., 2000; Brodersen et al., 2006). Por otro lado, ERF1, cuya sobreexpresión promueve la activación de defensas dependientes de JA/Et, reduce la tolerancia a *Pseudomonas syringae* (Berrocal-Lobo et al., 2002). Otros componentes que establecen un nodo de convergencia para determinar el balance entre las señales mediadas por JA y SA durante las respuestas de la planta a patógenos bacterianos son NPR1, WRKY70 (Spoel et al., 2003; Dong, 2004; Li et al., 2004a; Pieterse y van Loon, 2004), y recientemente se ha relacionado a las DELLAs en el control del balance entre las vías de señalización dependientes de JA y SA en las respuestas inmunes (Navarro et al., 2008). NPR1 tiene una función esencial en la interacción negativa entre ambas hormonas, ya que la represión de los genes dependientes de JA ejercida por SA está bloqueada en el mutante *npr1* (Spoel et al., 2003; 2007) y también durante la respuesta SAR (Pieterse et al., 2001). La supresión de *WRKY70* activa la expresión de genes dependientes de JA y disminuye la resistencia a patógenos virulentos indicando que WRKY70 actúa como un activador de los genes inducidos por SA y un represor de los genes dependientes de JA (Li et al., 2004a; 2006; Ulker et al., 2007). Además, otros FT tipo WRKY intervienen en la interacción entre SA y JA (revisado por Koornneef y Pieterse, 2008). Entre ellos, se ha propuesto a WRKY53 como el nodo de las respuestas activadas por JA y SA en procesos de senescencia ya que la expresión de WRKY53 es regulada de manera opuesta por JA y SA y este FT interacciona con la proteína EPITHIOSPECIFYING SENESCENCE

REGULATOR (ESR/ESP) reguladora de senescencia (Miao y Zentgraf, 2007). En este sentido, a WRKY70 se le ha atribuido una función adicional como regulador negativo de la senescencia natural (Ulker et al., 2007). Otro punto de interacción entre las respuestas mediadas por SA y JA/Et la establece el propio patógeno. La coronatina, homólogo estructural de Ja-Ile, producida por *P. syringae*, activa o modula la señalización de JA para suprimir finalmente las defensas mediadas por SA (Laurie-Berry et al., 2006), lo que explica que mutantes afectados en la señalización de JA muestren una mayor resistencia a *P. syringae* (Ellis y Turner, 2002; Laurie-Berry et al., 2006). Trabajos recientes han analizado la regulación cruzada entre ambas hormonas en la defensa contra múltiples patógenos con estilos de vida distintos. La infección con un patógeno biotrofo da lugar a plantas más susceptibles a patógenos necrotrofos únicamente en caso de cepas virulentas y sólo en sitios adyacentes al punto inicial de infección. En cambio, cepas avirulentas que activan la HR y SAR no disminuyen la resistencia a patógenos necrotrofos. Estos resultados sugieren que la regulación cruzada entre JA y SA en las respuestas de defensa está controlada previamente por el reconocimiento de la planta del tipo específico de patógeno y de la situación espacial de la interacción, maximizando así las respuestas específicas a cada situación y evitando interacciones desfavorables (Spoel et al., 2007). Por otro lado, el SA y el JA pueden mostrar efectos regulatorios cooperativos en las respuestas de defensa relacionadas con patógenos, ya que los estilos de vida de todos los patógenos no son estrictamente biotrofos o necrotrofos. Por tanto, parece que se establecen distintas redes de señalización que implican interacciones entre SA, JA y Et para generar la defensa adecuada dependiendo del tipo de patógeno. En la defensa contra algunos patógenos biotrofos del género *Erysiphe*, *Oidium lycopersicum* y *P. syringae* también están implicados JA y Et (Ellis y Turner, 2001; Ellis et al., 2002a). De igual manera, el SA está implicado en la defensa contra algunos hongos necrotrofos como *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* o *Sclerotinia sclerotiorum* (Berrocal-Lobo et al., 2002; Audenaert et al., 2002; Díaz et al., 2002; Ferrari et al., 2003; Guo y Stotz, 2007). También se han descrito interacciones positivas entre la herida y el ataque por patógenos. La herida facilita a menudo la entrada de patógenos en la planta, y por tanto es previsible la existencia de mecanismos de regulación que permitan coordinar las respuestas de defensa de la planta frente a herida y patógenos (León et al., 2001). En este sentido, se ha comprobado que genes de defensa frente a patógenos están regulados en múltiples ocasiones por herida (Reymond et al., 2000; Durrant et al., 2000) y cada vez existen más datos que indican que la herida o el ataque de herbívoros contribuye a un aumento en la resistencia contra

patógenos de diferentes estilos de vida (De Vos et al., 2006; Shiojiri et al., 2006; Francia et al., 2007; Chassot et al., 2008). Otro tipo de interacción positiva entre JA/Et y SA es la participación de los JAs en el desencadenamiento de la SAR en respuesta a un patógeno avirulento (Truman et al., 2007).

2.4.3. Vías de señalización activadas por JA y otras hormonas.

Se han descrito interacciones principalmente negativas entre las respuestas a ABA y las respuestas mediadas por JA/Et. La interacción entre JA y ABA regula algunos procesos como la germinación de las semillas y la defensa de la planta frente a herida y patógenos. Durante la germinación, el JA antagoniza la inhibición de la germinación que se produce a través del ABA (Staswick et al., 1992; Ellis y Turner, 2002). También se han observado interacciones antagónicas entre JA y ABA en las respuestas de defensa frente a patógenos (Anderson et al., 2004). Sin embargo, en otras ocasiones se han establecido interacciones positivas entre ABA o factores de estrés abiótico y la vía de JA. El ABA es necesario para activar las respuestas mediadas por JA/Et frente a algunos patógenos necrotrofos (Adie et al., 2007b), y también para activar la expresión de los genes *PI* en respuesta a herida (Carrera y Prat, 1998). Por último, se ha descrito que el estrés salino o hídrico activa la expresión de genes de herida y que la herida aumenta la tolerancia a estrés salino (Reymond et al., 2000; Dombrowski, 2003; Capiati et al., 2006). Por otro lado, se han descrito interacciones entre las auxinas y las respuestas de defensa. Las auxinas regulan un gran número de procesos de desarrollo en la planta (Woodward y Bartel, 2005a), siendo sus funciones en las respuestas de defensa menos conocidas. Las auxinas se han relacionado con la respuesta inmune (Navarro et al., 2006) y, en este sentido estudios recientes han determinado que el efecto de SA en defensa se ejerce al menos en parte mediante represión de la vías de auxinas (Wang et al., 2007; Zhang et al., 2007). La herida también regula negativamente los genes de respuesta a auxinas (Cheong et al., 2002). El mutante de respuesta a auxinas *axr1*, defectivo también en las respuestas a JAs establece un punto de conexión entre la señalización activada por JA y auxinas (Xu et al., 2002; Tiryaki y Staswick, 2002). Además, COI1 interacciona *in vivo* directamente con el signalosoma COP9 que tiene un función clave en muchos procesos del desarrollo como fotomorfogénesis y en la respuesta a auxinas (Feng et al., 2003).

Además de compartir algunos componentes, otro punto de interacción regulatoria entre diferentes vías de señalización podría darse a nivel de la producción de dichas señales. En este sentido, un punto en común en las rutas biosintéticas que dan lugar a JA y SA en plantas, son reacciones de β -oxidación que podría constituir otro nodo de regulación entre ambas vías de señalización, tanto en las respuestas activadas por estrés como en los procesos del desarrollo donde intervienen ambas hormonas. A continuación se describen los componentes y funciones más relevantes de este proceso en plantas.

3. β -oxidación en plantas.

3.1. Definición y localización intracelular.

La β -oxidación es la ruta principal de degradación de ácidos grasos en las células, siendo este proceso esencial para los seres vivos. Esta ruta catabólica, descubierta a principios del siglo XX por Franz Knoop, ha sido objeto de investigación en los últimos años por su implicación en múltiples procesos del desarrollo y de la defensa en animales, hongos y plantas (revisado por Baker et al., 2006; Poirier et al., 2006; Rottensteiner y Theodoulou, 2006; Goepfert y Poirier, 2007; Graham, 2008). La β -oxidación consiste en la rotura del extremo tiol de los derivados de los ácidos grasos por oxidación del carbono β , lo que da lugar al ácido graso con dos unidades de carbono menos, acetil-CoA, NADH y H_2O_2 (Gerbling y Gerhardt, 1989). En plantas, la β -oxidación ocurre específicamente en peroxisomas (Gerhardt, 1983; Kindl, 1987) y continua hasta que el ácido graso es completamente degradado. En animales, la β -oxidación peroxisomal funciona únicamente como un sistema de acortamiento de cadena y los ácidos grasos son degradados por β -oxidación mitocondrial (Mannaerts y Debeer, 1982; Gerhardt 1986). En plantas, se ha descrito un tipo de β -oxidación mitocondrial que intervendría en el catabolismo de aminoácidos para incorporar acetil-CoA en el ciclo de Krebs (Dieuaidé et al., 1993; Bode et al., 1999; Masterson y Wood, 2001).

3.2. Componentes de la β -oxidación.

El núcleo de la β -oxidación peroxisomal implica cuatro reacciones enzimáticas secuenciales (Cooper y Beevers, 1969; Kindl, 1987; Gerhardt, 1992) realizadas por tres

enzimas codificadas por familias multigénicas en muchos de los organismos. Además, existen otras enzimas localizadas tanto en el interior de los peroxisomas como en su membrana, que participan indirectamente en la degradación de los ácidos grasos (figura 4.A). Previamente a la β -oxidación, los sustratos son transportados al interior del peroxisoma por un transportador peroxisomal tipo ABC dependiente de ATP, que en *Arabidopsis* está codificado por el gen de copia única *COMATOSE (CTS1)/PEROXISOME DEFICIENT 3 (PED3)/PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER 1 (PXAI)* (Zolman et al., 2001b; Footitt et al., 2002; Hayashi et al., 2002). Los sustratos son activados por esterificación con CoA hasta la formación del correspondiente acil-CoA derivado que es susceptible del ataque oxidativo en el carbono β . La activación es llevada a cabo por acción de las ACS pertenecientes a la familia 4-CL requiriendo una molécula de ATP, Mg^{2+} y de CoASH por cada ácido graso. En *Arabidopsis*, se ha descrito la participación de las ACS LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 6 y 7 (LACS 6 y LACS7) (Fulda et al., 2002), dos enzimas con actividad OPC-8:0 CoA Ligasa 1 (OPCL1) (Koo et al., 2006; Kienow et al., 2008) y otras dos ACS (Schneider et al., 2005), presentando entre ellas diferente afinidad en las cadenas de los sustratos. Dentro del núcleo de la β -oxidación, la primera reacción enzimática está catalizada en plantas por acil-CoA oxidasas (ACX) que oxidan los acil-CoA derivados a sus correspondientes *2-trans*-enoil-CoA derivados. Esta actividad conlleva la formación paralela de flavina reducida ($FADH_2$), la cual es reoxidada utilizando como aceptor de electrones O_2 produciendo H_2O_2 (figura 4.A.) En animales, el primer paso de la β -oxidación está catalizado por acil-CoA deshidrogenasas (ACADs) de localización mitocondrial. En el siguiente paso, la degradación de los ácidos grasos saturados de cadena simple requiere las actividades *trans*-2-enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa que catalizan la hidratación de los *2-trans*-enoil-CoA derivados a 3-hidroxiacil-CoA derivados y la subsiguiente oxidación a 3-cetoacil-CoA derivados. Estas reacciones son catalizadas por una proteína multifuncional (MFP) con dichas actividades enzimáticas. En el caso de ácidos grasos insaturados, se requieren previamente las actividades Δ^3, Δ^2 -enoil-CoA isomerasa, $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoil-CoA isomerasa y 2,4-dienoil-CoA reductasa, para dar lugar al compuesto *2-trans*-enoil-CoA derivado (Kunau et al., 1995; Hiltunen y Qin, 2000). Estas actividades auxiliares, fundamentales en plantas donde la mayoría de los ácidos grasos son poliinsaturados en átomos de carbono pares y/o impares, pueden ser realizadas por la propia MFP (Guhnemann-Schafer et al., 1994; Preisig-Muller et al., 1994) o por otras enzimas con dichas actividades individuales (Goepfert et al., 2005; 2006). En el paso final de la β -oxidación, la enzima 3-cetoacil-CoA

tiolasa (KAT) cataliza la rotura del enlace tioéster del 3-cetoacil-CoA derivado, liberando acetil-CoA, producto final de la ruta y el correspondiente acil-CoA derivado con dos unidades de carbono menos, que es susceptible de una nueva ronda de β -oxidación. Alternativamente, pueden ser hidrolizados a ácidos grasos libres y CoA mediante la acción de tioesterasas que también pueden estar implicadas en el transporte de los metabolitos sintetizados en los peroxisomas (Tilton et al., 2000; 2004).

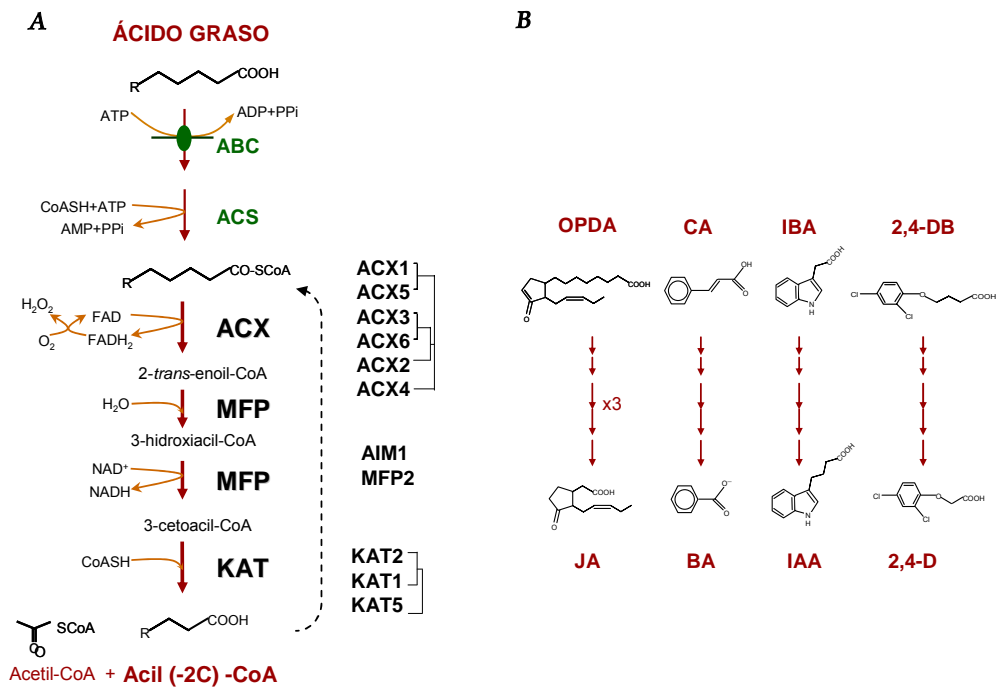


Figura 4. Ruta de β -oxidación peroxisomal de plantas.

A. La β -oxidación consta de cuatro reacciones secuenciales catalizadas por tres enzimas. Las distintas isoformas ACXs, MFPs y KATs están codificadas por varios genes en Arabidopsis. Se muestra la filogenia para cada familia. **B.** Distintos precursores de hormonas requieren reacciones de β -oxidación para transformarse en la hormona activa. Nomenclatura descrita en “Abreviaturas”. Adaptado de Baker et al., 2006.

La degradación completa de los ácidos grasos de cadena larga requiere enzimas capaces de aceptar sustratos de muy diferente longitud de cadena de carbonos. Entre los sustratos susceptibles de β -oxidación se encuentran precursores de las hormonas JA, SA, ácido indolacético (IAA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (figura 4.B). En plantas, los genes ACXs codifican distintas isoenzimas con diferente, pero parcialmente solapante, especificidad de la longitud de la cadena del sustrato, abarcando en conjunto el rango completo de las cadenas que existen *in vivo* (Eastmond et al., 2000a; Graham y Eastmond, 2002; Arent et al., 2008; Graham, 2008). Concretamente en *Arabidopsis*, la proteína ACX1 tiene preferencia por acil-CoAs de cadena media a larga (C12-CoA a C18-CoA) (Hooks et al., 1999; Pedersen y Henriksen, 2005; Pinfield-Wells et al., 2005), ACX2 por sustratos de cadena larga (C16-CoA a C20-CoA) (Hooks et al., 1999), ACX3 por sustratos de cadena media (C8-CoA a C14-CoA) (Eastmond et al., 2000b; Froman et al., 2000), y por último, ACX4 muestra especificidad por acil-CoA de cadena corta (C4-CoA a C8-CoA) que es una actividad específica de plantas que no ocurre en animales (Hayashi et al., 1999; Rylott et al., 2003). En el genoma de *Arabidopsis* se encuentran otros dos genes ACX correspondientes a homólogos de ACX1 y ACX3, que codifican las proteínas ACX5 y ACX6 respectivamente. Las funciones ACXs están altamente conservadas en distintas especies de plantas como indican las caracterizaciones de las distintas ACXs en pepino, maíz y calabaza (Kirsch et al., 1986; Hooks et al., 1996; De Bellis et al., 1999; 2000). Respecto a la segunda actividad implicada en β -oxidación, en el genoma de *Arabidopsis* se encuentran dos genes que codifican proteínas MFP con un amplio rango de sustratos y que se expresan diferencialmente en la planta, llamados *ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM 1 (AIM1)* (Richmond y Bleecker, 1999) y *MULTIFUNCTIONAL PROTEIN 2 (MFP2)* (Eastmond y Graham, 2000). Además, en el genoma de *Arabidopsis* se encuentran varios genes que codifican proteínas con funciones individuales de las MFP, tanto de enoil-CoA hidratasa (At1g60550 y At5g43280) como hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (At3g15290). En otras especies vegetales como pepino, también se han caracterizado distintas isoenzimas MFP expresadas diferencialmente en distintos tejidos de la planta y con distintas actividades en cada caso (Behrends et al., 1988; Preisig-Muller et al., 1994; Guhneemann-Schafer y Kindl, 1995a; 1995b). Por último, las proteínas MFP presentan varias regiones de unión a microtúbulos que le permiten el transporte a través de los mismos, e implica que estas proteínas se encuentren asociadas a microtúbulos además de su localización peroxisomal (Chuong et al., 2002; 2005).

3.3. 3-cetoacil-CoA tiolasas (KAT) catalizan el último paso de la β -oxidación.

3.3.1. Genes *KAT*.

Los genes y proteínas KAT son los componentes de β -oxidación menos estudiados en todas las especies vegetales. A pesar de esto, varios genes *KAT* han sido clonados en pepino (Preising-Muller y Kindl, 1993), mango (Bojorquez y Gómez-Lim, 1995), colza (Olesen y Brandt, 1995), cotiledones de calabaza (Kato et al., 1996), girasol (Oeljeklaus et al., 2002) y en *Arabidopsis* (Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001). El genoma de *Arabidopsis* contiene tres genes que codifican proteínas KAT. De ellos, se identificó primero al gen *PEROXISOME DEFECTIVE 1 (PED1)/3-KETOACYL-COA THIOLASE 2 (KAT2)* mediante el mapeo de la mutación puntual *ped1* que confería resistencia al ácido 2,4-diclorofenoxibutírico (2,4-DB), provocaba la detención del desarrollo de la plántula inmediatamente después de la germinación en medios sin sacarosa y que carecía de proteína tiolasa (Hayashi et al., 1998b). Análisis posteriores revelaron que un segundo mutante por inserción de T-DNA en este gen (mutante *kat2*), que no mostraba actividad KAT y que acumulaba ácidos grasos de cadena larga, mostraba el mismo fenotipo descrito que el mutante *ped1* (Germain et al., 2001). El genoma de *Arabidopsis* también contiene otros dos genes *KAT* (Germain et al., 2001). El gen *KAT5*, llamado previamente *PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 1 (PKT1) oPKT2*, da lugar a dos mRNA diferentes por procesamiento alternativo (Carrie et al., 2007) y el gen *KAT1*, presenta alta homología de secuencia con el gen *PED1/KAT2*. De los diferentes genes *KAT*, el mayor nivel de expresión del gen *KAT2*, los fenotipos observados en el mutante *ped1/kat2* y la coexpresión de este gen con otros del metabolismo de β -oxidación, a diferencia de *KAT5* (Carrie et al., 2007), sugieren que este gen codifica la proteína KAT más importante de β -oxidación en *Arabidopsis* (Footitt et al., 2007a).

3.3.2. Enzimas *KAT*

Las enzimas KAT están incluidas en la superfamilia de tiolasas, que está ampliamente distribuida en todos los organismos y que en eucariotas se localiza en peroxisomas, mitocondrias y citosol (Pereté et al., 2005). Aunque las tiolasas tienen un

origen evolutivo común, existen dos clases de enzimas con distintas funciones y especificidad de sustrato. Generalmente, las tiolasas del grupo I (EC.2.3.1.16), llamadas genéricamente KAT o acil-CoA:acetyl-CoA aciltransferasas, están implicadas en rutas catabólicas como la degradación de lípidos por β -oxidación y no presentan especificidad en la longitud de la cadena del sustrato, mientras que las tiolasas del grupo 2 (EC 2.3.1.9), llamadas acetyl-CoA:acetyl-CoA aciltransferasas o acetoacetyl-CoA tiolasas (ACAT), intervienen en la síntesis y degradación de acetoacetyl-CoA y otras rutas principalmente anabólicas con variedad de sustratos (Peretó et al., 2005; Carrie et al., 2007). En el genoma de *Arabidopsis* hay dos genes que codifican enzimas ACAT (Carrie et al., 2007). En eucariotas, las proteínas KAT, que presentan un alto grado de similitud entre ellas, se sintetizan como un precursor que contiene la secuencia de localización PTS2 (*peroxisomal targeting signal 2*) en el extremo N-terminal y que es eliminada posteriormente dentro del peroxisoma (Swinkels et al., 1991; Preisig-Muller y Kindl, 1993; Kato et al., 1996). En los últimos años, se ha confirmado la presencia de actividad enzimática KAT en varias especies (Olesen et al., 1997; Germain et al., 2001; Oeljeklaus et al., 2002) y ha sido obtenida la estructura cristalina de la enzima de *Arabidopsis* (Sundaramoorthy et al., 2006). Recientemente se ha comprobado la localización peroxisomal *in vivo* de todas las proteínas KAT de *Arabidopsis*, así como su ausencia en mitocondrias mediante fusiones a GFP (Carrie et al., 2007). Referente a la especificidad en la longitud de cadena del sustrato, aunque se han descrito tiolasas vegetales que sí presentan especificidad, se ha sugerido que en *Arabidopsis*, al menos KAT2, no presenta especificidad ya que esta proteína parece actuar tanto con sustratos cortos como con sustratos largos (Germain et al., 2001; Castillo et al., 2004; Afithile et al., 2005).

3.4. Funciones de la β -oxidación.

Mutaciones que bloquean la β -oxidación producen efectos pleiotrópicos graves indicando las funciones tan variadas e importantes en los que interviene esta ruta a lo largo del ciclo vital de las plantas, relacionadas tanto con el desarrollo como con la defensa (revisado por Baker et al., 2006; Poirier et al., 2006). Además de las funciones que se detallan a continuación, la β -oxidación peroxisomal interviene en la degradación de aminoácidos (Zolman et al., 2001a; Lange et al., 2004), en la síntesis de isoprenoides y

flavonoides, en la rotura de ácidos grasos citotóxicos y aporta, además, sustratos de tipo respiratorio bajo condiciones de escasez de carbohidratos (Graham y Eastmond, 2002).

3.4.1. Desarrollo embrionario, germinación y desarrollo postgerminativo de las semillas.

La β -oxidación cataliza la degradación de ácidos grasos de cadena larga desde los triacilglicéridos (TAG) de los tejidos de reserva de las semillas grasas durante la germinación y desarrollo postgerminativo temprano, siendo éste el proceso predominante en esta etapa (Baker et al., 2006; revisado por Graham, 2008). Dentro de los peroxisomas, las moléculas de acetyl-CoA producidas por β -oxidación (Cooper y Beevers, 1969) entran en el ciclo del glioxilato dando lugar a succinato (Beevers, 1961; Trelease, 1984), el cual a través de la gluconeogénesis en mitocondrias, produce finalmente sacarosa que proporciona a la plántula la energía suficiente hasta que pueda desarrollar completamente la capacidad fotosintética (Gerhardt, 1992). En esta etapa del desarrollo, donde predominan las enzimas del ciclo del glioxilato, los peroxisomas se denominan glioxisomas (Cooper y Beevers, 1969). En general, las plantas con semillas grasas aumentan de forma coordinada tanto la expresión de genes como la actividad de las enzimas de lipólisis, de β -oxidación, del ciclo de glioxilato y de la gluconeogénesis durante la germinación de las semillas y primeros estadios de la embriogénesis (Rylott et al., 2001; Graham y Eastmond, 2002). No obstante, se han descrito diferencias en la expresión de algunos genes de β -oxidación en estos procesos. Mientras que la mayoría de genes *ACXs* aumentan su expresión en germinación (Hayashi et al., 1998a; Hooks et al., 1999; Eastmond et al., 2000b; Rylott et al., 2001), el gen *MFP2* es el único de los genes *MFP* que aumenta su expresión durante la germinación de las semillas (Richmond y Bleecker, 1999; Eastmond y Graham, 2000). Por último, el gen *KAT2* codifica la isoenzima KAT que participa en mayor medida en esta etapa, disminuyendo sus niveles cuando la fotosíntesis es funcional (Kato et al., 1996; Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001). En este contexto, se han descrito alteraciones en la germinación de las semillas, en el desarrollo embrionario y en el establecimiento de la plántula en mutantes de β -oxidación o de transporte de sustratos al peroxisoma (figura 5) (Penfield et al., 2005). Concretamente, los mutantes *cts1/ped3/pxa1*, *lac6 lac7*, *acx1 acx2*, *ped1/kat2* y *mfp2* presentan un bloqueo en la movilización de lípidos de reserva y necesitan para el correcto desarrollo de la plántula un aporte externo de carbohidratos hasta el

establecimiento de la fotosíntesis (Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001; Hayashi et al., 2002; Fulda et al., 2004; Adham et al., 2005; Pinfield-Wells et al., 2005; Rylott et al., 2006). Además, los mutantes *cts1/ped3/pxa1*, *ped1/kat2* y *acx1 acx2* presentan deficiencias en la germinación independientemente de la adición exógena de sacarosa, revelando funciones adicionales de la β -oxidación en la germinación y la progresión de la dormancia independientes de la provisión de esqueletos carbonados (Russell et al., 2000; Footitt et al., 2002; Pinfield-Wells et al., 2005; Footitt et al., 2006). El fenotipo de letalidad en los primeros estadios del desarrollo en los dobles mutantes *acx3 acx4* (Rylott et al., 2003) y *mfp2 aim1* (Rylott et al., 2006) revela la esencialidad de la β -oxidación para el desarrollo embrionario. El mutante *ped1/kat2*, aunque no es letal, produce semillas y silicuas más pequeñas y un mayor número de óvulos abortados, sugiriendo un papel del gen *KAT2* en el desarrollo de la semilla (Germain et al., 2001; Footitt et al., 2007a).

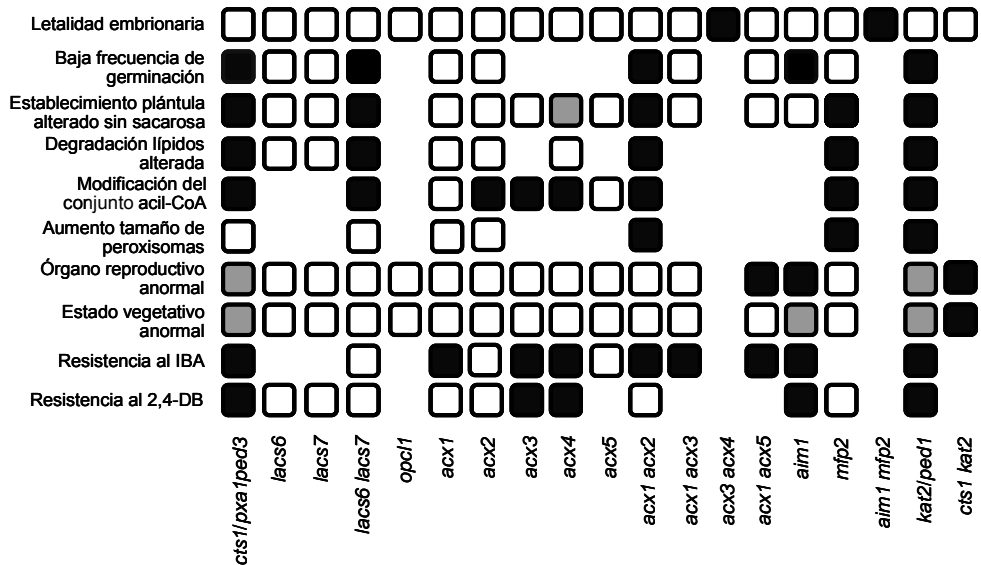


Figura 5. Esquema de los fenotipos descritos en los mutantes de β -oxidación en *Arabidopsis*.

Para cada carácter se indica si existen diferencias significativas (■), diferencias leves (◐) o no existen diferencias (□) entre cada mutante y el ecotipo silvestre. Los espacios vacíos indican que no hay descripción disponible. Nomenclatura descrita en “Abreviaturas”. Adaptado de Goepfert y Poirier, 2007.

3.4.2. Síntesis de fitohormonas y otras moléculas reguladoras.

La β -oxidación tiene un papel esencial en el metabolismo de hormonas y aminoácidos (revisado por Titorenko y Rachubinski, 2004; Baker et al., 2006), interviniendo en la biosíntesis de JA y potencialmente de SA como hemos detallado anteriormente (apartados 1.1.1. y 1.2.1). Referente a la síntesis de JA, se ha descrito que las enzimas de β -oxidación pueden estar diferencialmente implicadas en la biosíntesis de JA según el factor de estrés, como indica el doble mutante *acx1 acx5* que presenta una menor síntesis de JA en respuesta a insectos pero acumula normalmente JA en respuesta al hongo necrotrofo *Alternaria brassicicola*, sugiriendo que distintas vías enzimáticas actúan en cada caso (Schillmiller et al., 2007). Otras hormonas relacionadas con β -oxidación son las auxinas. Se han descrito mutantes de β -oxidación de *Arabidopsis* que muestran resistencia al efecto inhibitorio del IAA en la elongación de la raíz al aplicar exógenamente ácido indol-3-butírico (IBA) (figura 5). Entre estos mutantes se encuentran *cts1/pxa1/ped3*, *acx1*, *acx3*, *acx4*, *aim1*, *ped1/kat2* (Zolman et al., 2000; 2001b; Adham et al., 2005) y un mutante en una ACAD de localización peroxisomal descrito recientemente en *Arabidopsis* (Zolman et al., 2007). Este fenotipo indica que en la síntesis de la auxina activa más importante (IAA), a partir de su precursor natural IBA, intervienen reacciones de β -oxidación, (revisado por Normanly y Bartel, 1999; Bartel et al., 2001; Woodward y Bartel, 2005a). Además, mutantes en los genes *PEX5* y *PEX7*, implicados en el transporte de proteínas peroxisomales muestran resistencia a IBA (Zolman y Bartel, 2004; Woodward y Bartel, 2005b), debido posiblemente a defectos en el importe de las proteínas de β -oxidación. Por otra parte, el 2,4-DB es convertido a la auxina sintética con actividad herbicida 2,4-D por reacciones de β -oxidación (revisado por Woodward y Bartel, 2005a). Varios mutantes afectados en β -oxidación también muestran resistencia al efecto inhibitorio de elongación de la raíz del 2,4-D al aplicar exógenamente 2,4-DB. Entre ellos se encuentran los mutantes *cts1/pxa1/ped3* (Hayashi et al., 1998b; Zolman et al., 2001b), *acx3* (Eastmond et al., 2000b), *acx4* (Rylott et al., 2003), *aim1* (Richmond y Bleecker, 1999) y *ped1/kat2* (Hayashi et al., 1998b) (figura 5). El mutante *pex14/ped2*, afectado en el transporte de proteínas peroxisomales también muestra resistencia al 2,4-DB (Hayashi et al., 1998b, 2000a). Por último, la β -oxidación genera H_2O_2 , que es el producto mayoritario del metabolismo de ROS formado en respuesta a estrés y presenta alta potencialidad señalizadora en las respuestas de defensa frente a patógenos y herida (ver apartado 2.2.2).

3.4.3. Desarrollo floral y vegetativo.

La mayoría de los mutantes de β -oxidación no presentan alteraciones graves después del establecimiento de la plántula, aunque se han descrito alteraciones en el desarrollo floral en los mutantes *aim1*, *cts1/ped3/pxa1*, y en el doble mutante *cts1/ped3/pxa1 ped1/kat2* (figura 5). La pérdida de función del gen *AIM1*, cuya expresión es máxima en flores, provoca el desarrollo desorganizado de los meristemas inflorescentes dando lugar a meristemas florales anormales y una fertilidad muy reducida (Richmond y Bleecker, 1999). El mutante *cts1/ped3/pxa1* presenta filamentos de estambres más cortos y defectos en el crecimiento del tubo polínico que da lugar a una menor fertilidad (Footitt et al., 2007b). El doble mutante *cts1/ped3/pxa1 ped1/kat2* muestra una fuerte alteración en el crecimiento vegetativo y en el desarrollo floral (Hayashi et al., 2002). En estos casos, se desconoce el origen de las alteraciones, ya que son distintas a las mostradas por otros mutantes de la biosíntesis de JA afectados principalmente en el desarrollo de la antera y el polen (ver apartado 1.1.3.1). Por el contrario, el doble mutante *acx1 acx5* presenta defectos en el desarrollo del polen y una menor viabilidad de las semillas que es restituida por la aplicación exógena de JA, lo que relaciona este fenotipo con la menor producción de esta hormona (Schillmiller et al., 2007). Por último, para el mutante *ped1/kat2* se han descrito alteraciones leves tanto en el desarrollo vegetativo como en el reproductivo, entre ellas una menor longitud del filamento del estambre, que no implica un retraso en su desarrollo o una menor viabilidad (Footitt et al., 2007a).

3.4.4. Senescencia.

Durante los primeras fases de la senescencia, cuando las células aún son funcionales, los ácidos grasos procedentes de las membranas de los tilacoides son catabolizados por β -oxidación dando acetyl-CoA, que será utilizado para respiración o para gluconeogénesis obteniendo compuestos ricos en energía que serán transportados a otros tejidos de la planta. Este proceso va asociado con una disminución de la expresión de los genes de fotosíntesis y un aumento de los de respiración mitocondrial, oxidación de ácidos grasos y movilización de nutrientes (Hopkins et al., 2007). Varios estudios relacionan un aumento de la expresión de los genes de β -oxidación en senescencia (Froman et al., 2000; Eastmond et al., 2000b; Eastmond y Graham, 2000; Hayashi et al., 2001; Germain et al., 2001; He et al., 2002), que han sido confirmados mediante análisis transcriptómicos

realizados en hojas senescentes (Gepstein et al., 2003; Guo et al., 2004; Lin y Wu, 2004). Concretamente, parece que la inducción de la β -oxidación se asocia más con los procesos de senescencia inducida que con los de senescencia natural (Buchanan-Wollaston et al., 2005).

3.4.5. Regulación del número, tamaño y morfología de los peroxisomas.

La β -oxidación interviene en la regulación del tamaño y número de peroxisomas como se ha descrito en *Saccharomyces cerevisiae* y en humanos (Smith et al., 2000; van Roermund et al., 2000; Funato et al., 2006). Durante el desarrollo postgerminativo, el mutante *ped1/kat2* de *Arabidopsis* muestra un menor número de glioxisomas de mayor tamaño con acumulación de vesículas y cuerpos lipídicos alrededor e irregularidades en la membrana (Hayashi et al., 1998b; 2001; Germain et al., 2001). En los casos más extremos, el mutante *ped1/kat2* muestra también menor número de cloroplastos y mitocondrias (Germain et al., 2001). Sin embargo, las plantas adultas no presentan alteraciones (Hayashi et al., 2001). Por otro lado, los ácidos grasos de cadena larga intervienen en la regulación de la morfología de los peroxisomas en plantas, aunque se desconocen los mecanismos implicados (Baker et al., 2006). En *Arabidopsis*, los mutantes *ped1/kat2*, *mfp2* y el doble mutante *acx1 acx2* presentan peroxisomas de mayor tamaño debido posiblemente a la acumulación de ácidos grasos de cadena larga dentro de los peroxisomas (Hayashi et al., 1998b; 2001; Germain et al., 2001; Pinfield-Wells et al., 2005; Rylott et al., 2006), y por el contrario, el mutante *cts/pxa1/ped3* y el doble mutante *lacs6 lacs7* poseen peroxisomas de tamaño normal ya que la acumulación de los ácidos grasos es citoplasmática (Footitt et al., 2002; Fulda et al., 2004). Además de estos cambios morfológicos, los peroxisomas son orgánulos con una alta plasticidad que está relacionada tanto con procesos esenciales del desarrollo como con procesos relacionados con estrés y, recientemente, se ha relacionado con las respuestas de defensa de las plantas.

4. Peroxisomas de plantas.

4.1. Definición.

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares pequeños de entre 0,5 a 1,5 μm de diámetro rodeados por una membrana simple. Tienen principalmente un metabolismo

oxidativo y son ubicuos en todas las células eucariotas (Baker y Graham, 2002). Los peroxisomas cumplen funciones esenciales como el metabolismo de ROS y de nitrógeno, la fotorespiración, la β -oxidación, el ciclo del glioxilato y la síntesis y metabolismo de moléculas con función señalizadora en estrés (revisado por Hayashi y Nishimura, 2006; Kunze et al., 2006; Nyathi y Baker, 2006; Reumann y Weber, 2006; del Río et al., 2006; Goepfert y Poirier, 2007). Las funciones peroxisomales son mantenidas por la síntesis y posterior importe desde el citosol de nuevas proteínas que incluyen las señales de localización peroxisomal PTS1 o PTS2 localizadas en el extremo C y N terminal, respectivamente (Hayashi et al., 2000a). En el genoma de *Arabidopsis* hay 286 genes que codifican proteínas peroxisomales aunque no todas contienen el péptido señal (Reumann et al., 2004). Un grupo de proteínas con funciones importantes en los peroxisomas son las peroxinas (PEX) que se describen a continuación.

4.2. Peroxinas.

Las PEX son proteínas esenciales para la biogénesis, mantenimiento y funciones de los peroxisomas y muchas de ellas se localizan en la membrana. Mutaciones en los genes *PEX* producen alteraciones en la estructura, contenido y función de los peroxisomas afectando el metabolismo y desarrollo en todos los organismos (Purdue y Lazarow, 2001; Charlton y López-Huertas, 2002; Mano y Nishimura, 2005). Las proteínas PEX fueron inicialmente identificadas y caracterizadas en levadura y muchos de los correspondientes homólogos han sido identificados en plantas. De los 32 genes *PEX* identificados en *Saccharomyces cerevisiae*, el genoma de *Arabidopsis* contiene al menos 19 genes *PEX* anotados, de las cuales se han descrito funciones esenciales para muchos de ellos. Entre otras, las PEX2, PEX10, PEX12 y PEX16 están implicadas en el desarrollo embrionario (Lin et al., 1999; Hu et al., 2002; Sparkes et al., 2003; Schumann et al., 2003; Fan et al., 2005). PEX2 también interviene en la fotomorfogénesis (Hu et al., 2002) y PEX16 en la biogénesis de ácidos grasos (Lin et al., 1999). Recientemente se ha relacionado a PEX6 con la síntesis de JA (Delker et al., 2007), y se ha descrito una nueva función de una PEX relacionada con el reconocimiento entre los gametofitos y el desarrollo del tubo polínico (Boisson-Dernier et al., 2008). Algunas PEX tienen funciones relacionadas con el transporte de proteínas. PEX14 fue identificada por análisis del mutante *ped2* que fue aislado por resistencia a 2,4-DB, y es una proteína transmembrana implicada en el importe

de las proteínas sintetizadas en el citosol (Hayashi et al., 1998b; 2000a). El transporte se realiza a través de la unión de las proteínas con péptidos señal PTS1 y PTS2 al complejo receptor formado por PEX5 y PEX7 (Woodward y Bartel, 2005b), el cual se une a PEX14 que realiza el importe al interior del peroxisoma (Baker y Sparkes, 2005; Hayashi y Nishimura, 2006). En este proceso están implicadas otras proteínas como PEX12 y PEX13 (Mano et al., 2006). La ausencia de PEX14 produce en la planta efectos pleiotrópicos graves, como la falta de germinación en medios sin sacarosa, peroxisomas anormales y defectos en fotorespiración (Hayashi et al., 2000a). Otras PEX cumplen funciones esenciales en la división del orgánulo. En *Sacharomyces cerevisiae* existen al menos ocho PEX distintas implicadas en este proceso, pero en *Arabidopsis* solo se ha identificado a la familia de genes *PEX11* que actúa en los primeros estadios de la proliferación, elongación, división y agregación de los peroxisomas (Thoms y Erdmann, 2005; Lingard y Trelease, 2006; Fagarasanu et al., 2007). La sobreexpresión de los genes *PEX11* dirige las correspondientes proteínas directamente a las membranas peroxisomales donde individualmente promueven la duplicación (AtPEX11a, -e), agregación (AtPEX11b) o aumento de tamaño sin división (AtPEX11c, -d) (Lingard y Trelease, 2006; Orth et al., 2007). Además de las PEX11, las proteínas de la familia de las dinaminas (DRP) intervienen en los estadios más tardíos de la división peroxisomal (Koch et al., 2003; Lingard y Trelease, 2006) y, en *Arabidopsis* DRP3A es esencial para la división de los peroxisomas y mitocondrias (Mano et al., 2004).

4.3. Proliferación.

Los peroxisomas son orgánulos con una gran variedad de funciones metabólicas dinámicas e interconvertibles durante diferentes procesos celulares, estados del desarrollo y condiciones ambientales (Yan et al., 2005; Hayashi y Nishimura, 2006). Los cambios dinámicos implican no solo cambios en sus funciones sino en el número, tamaño, morfología y movimiento de los peroxisomas en células vivas (Palma et al., 1991, Mano et al., 2002, Oksanen et al., 2003). Aunque en plantas no existen evidencias directas, los análisis realizados sugieren que los peroxisomas pueden ser formados de novo en el retículo endoplasmático (Hoepfner et al., 2005; Mullen y Trelease, 2006; Schluter et al., 2006; Titorenko y Mullen, 2006), e implicaría la formación de la membrana peroxisomal, el importe de proteínas sintetizadas en el citoplasma y la multiplicación y mantenimiento de los peroxisomas, procesos mediados por las peroxinas (PEX) (Heiland y Erdmann, 2005). El número de peroxisomas por célula es el resultado del balance entre la biogénesis de

nuevos orgánulos, la división o proliferación de peroxisomas ya existentes, que implicaría la elongación del orgánulo, constricción de la membrana y la fisión (Schrader y Fahimi 2006a; Fagarasanu et al., 2007), y la degradación de viejos peroxisomas a través de una autofagia selectiva mediada por vacuolas llamada pexofagia (Farre y Subramani, 2004; Sakai et al., 2006). La abundancia de peroxisomas está regulada por factores endógenos y ambientales. En plantas se han descrito varios factores ambientales que estimulan la proliferación de peroxisomas. Entre ellos, el estrés oxidativo causado por H_2O_2 , herida, o patógenos avirulentos (López- Huertas et al., 2000), el ozono (Morré et al., 1990, Oksanen et al., 2003), la luz (Ferreira et al., 1989), los herbicidas (de Felipe et al., 1988), los metales pesados como cadmio (Romero-Puertas et al., 1999) y la senescencia natural e inducida por estrés (Droillard y Paulin 1990; del Río et al., 1998), producen un aumento del número de peroxisomas.

A pesar de la identificación y caracterización de algunos componentes requeridos para la biogénesis y función de los peroxisomas en plantas, la señal o señales implicadas en los cambios dinámicos de número y morfología, así como las correspondientes rutas de percepción y transducción, son prácticamente desconocidas en plantas (Hu, 2007). En levaduras y mamíferos, donde han sido investigadas en mayor medida, señales endógenas de naturaleza lipídica pueden desencadenar la proliferación al detectar cambios metabólicos o ambientales (Schrader y Fahimi, 2006a). La actividad de estos compuestos, llamados genéricamente proliferadores de peroxisomas (PP), puede ser realizada por moléculas artificiales como los fibratos, drogas hipolipidémicas que han sido caracterizados como PP artificiales en animales actuando como ligandos eficientes de los receptores nucleares α activados por PP (PPAR α), así como inductores de las enzimas de β -oxidación peroxisomal (Reddy y Chu, 1996, Corton et al., 2000, Torrá et al., 2001). Los PPARs son FT activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares y han sido muy estudiados en animales. Estos receptores perciben señales endógenas y exógenas actuando como sensores metabólicos endógenos y como un nodo de transcripción activando la expresión de la familia de genes *PEX11* y *DRP* desencadenantes de la proliferación de peroxisomas (Brown y Plutzky, 2007; Grimaldi, 2007). En el genoma de *Arabidopsis* y en otras especies vegetales no se ha encontrado ningún gen que codifique una proteína con similitud a las ya descritas PPARs de animales. Sin embargo, la expresión heteróloga del PPAR α de *Xenopus* en plantas de tabaco causa un incremento en el número de peroxisomas (Nila et al., 2006) y la droga hipolipidémica clofibrato (CFB), ligando

artificial de las PPAR α en animales, produce un aumento de la actividad ACX y proliferación de peroxisomas en plantas de guisante (Palma et al., 1991). Estos hechos sugieren que las plantas tienen moléculas que actúan como ligandos de las PPARs así como componentes de las rutas de señalización conducentes a la biogénesis y proliferación de peroxisomas similares a animales. A pesar de este gran desconocimiento, recientemente se ha descrito por primera vez componentes reguladores implicados en la proliferación de peroxisomas en *Arabidopsis*. Durante la fotomorfogénesis en plántulas, la proliferación de peroxisomas debida a la luz está regulada por la activación de la proteína peroxisomal PEX11b a través del fotorreceptor fitocromo A y un FT tipo bZIP homólogo a HY5 que interacciona directamente con el gen *PEX11b* (Desai y Hu, 2008).

4.4. Funciones relacionadas con estrés y defensa.

Además de las funciones metabólicas de los peroxisomas, en los últimos años se ha acumulado información que relaciona estos orgánulos con las respuestas de defensa de las plantas contra múltiples factores de estrés. Estudios previos han descrito varias proteínas peroxisomales implicadas en defensa contra patógenos. Entre ellas, una glioxilato aminotransferasa (Taler et al., 2004) y una glucosil hidrolasa que forma parte del sistema inducible de resistencia previa a la infección por patógenos (Lipka et al., 2005). Otro estudio relaciona el movimiento y la acumulación de los peroxisomas en las zonas de penetración de hongos biotrofos (Koh et al., 2005). Además, un análisis proteómico reciente ha desvelado la localización peroxisomal de varias β -glucosidasas y mirosinas relacionadas con la defensa contra herbívoros (Reumann et al., 2007). Se ha descrito también el aumento de la expresión de algunos genes *PEX* en respuesta a herida, patógenos o por estrés salino (López-Huertas et al., 2000; Charlton et al., 2005b). Como hemos visto anteriormente, muchas de las rutas implicadas en la síntesis de moléculas con potencial señalizador están compartimentalizadas, al menos en parte, en el interior de los peroxisomas. Además de la biosíntesis de JA, SA y auxinas, los peroxisomas realizan funciones metabólicas como la fotorespiración, la β -oxidación y reacciones de flavin oxidasas que generan H₂O₂ y otras ROS (del Río et al., 2006; Schrader y Fahimi, 2006b). Los peroxisomas contienen catalasas y otras enzimas antioxidantes indispensables para la detoxificación de ROS, pero en situaciones de estrés se generan altas cantidades de ROS produciendo estrés oxidativo (Corpas et al., 2001; del Río et al., 2002; 2006). Entre las

ROS generadas, el H₂O₂ es la molécula con mayor importancia biológica ya que actúa como molécula señal en muchas respuestas de defensa de las plantas. En peroxisomas, se ha detectado también la producción de NO (Corpas et al., 2001) que es un regulador del crecimiento en plantas y una molécula señal intra e intercelular en las rutas de transducción de defensa contra patógenos que producen muerte celular (revisado por del Río et al., 2002; Grün et al., 2006; Mur et al., 2006a; Nyathi y Baker, 2006; Torres et al., 2006).

5. Antecedentes.

Hasta la realización de este trabajo, se conocía la inducción de muchos de los genes implicados en la biosíntesis de JA en respuesta a diferentes factores de estrés incluyendo insectos y patógenos (Schaller, 2001; Turner et al., 2002). Además, a través de estudios bioquímicos, se había propuesto la participación de la β -oxidación en la biosíntesis de JA (Miersch y Wasternack, 2000; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002). Sin embargo, no se conocía la identidad y regulación de ningún gen de β -oxidación implicado en la biosíntesis de moléculas reguladoras o en la activación de defensa en respuesta a diferentes factores de estrés. En un trabajo previo, mediante técnicas de "differential display" de mRNA aislados de plantas heridas o tratadas con JA frente a plantas control no tratadas, se identificó en *Arabidopsis* un fragmento con alta homología con el correspondiente a ACX de rata que resultó ser inducible por herida (Titarenko et al., 1997). Posteriormente, en un análisis de micromatrices se confirmó la inducibilidad del gen *ACX1* en respuesta a herida (Reymond et al., 2000) sugiriendo que los procesos de β -oxidación podrían estar implicados en la generación de señales de defensa frente a herida y patógenos en plantas.

Objetivos

Para llevar a cabo este estudio, nos hemos centrado en los genes que codifican las enzimas implicadas en el último paso de β -oxidación, principalmente de *KAT2*, que codifica la proteína KAT mayoritaria de Arabidopsis. La β -oxidación de plantas se localiza exclusivamente en peroxisomas, orgánulos con una gran plasticidad en respuesta a estrés.

Los objetivos planteados en el presente trabajo han sido:

1. Caracterización molecular de los genes *KAT* de Arabidopsis. Análisis funcional del gen *KAT2* en defensa y desarrollo.
2. Análisis de las interacciones entre las respuestas activadas por herida y la proliferación de peroxisomas.
3. Análisis genómico de las respuestas activadas por el proliferador de peroxisomas CFB.

Resultados I

*Caracterización molecular y funcional del gen
3-cetoacil-CoA tiofasa 2 (KAT2) de Arabidopsis*

1. Análisis *in silico* de las secuencias de genes *KAT* de *Arabidopsis thaliana* y de las proteínas que codifican.

Los diferentes genes *KAT* localizados en el genoma de *Arabidopsis* están distribuidos en tres cromosomas, concretamente en los locus At2g33150 (*PED1/KAT2*), At1g04710 (*KAT1*) y At5g48880 (*KAT5/PKT2/PKT1*). En general, los genes *KAT* conservan una gran similitud entre ellos, poseyendo una estructura génica, tamaño de secuencia codificante (CDS) y número de exones similar, y encontrándose por tanto, las mayores divergencias en las regiones UTR's de los mRNA y en los intrones (figura 6.A). Asimismo, el gen *KAT5/PKT2/PKT1* presenta un procesamiento alternativo que puede dar lugar a dos transcritos que varían únicamente en la presencia o no del primer exón, llamados *KAT5.1/PKT1* y *KAT5.2/PKT2* (Carrie et al., 2007) (figura 6.A). Por el contrario, se han encontrado diferencias notables en la cantidad de ESTs (*expressed sequence tag*) disponibles en las bases de datos de los distintos genes *KAT*, sugiriendo niveles de expresión diferentes de estos genes. Para el gen *PED1/KAT2* se ha identificado el mayor número de ESTs (figura 6.A), lo que sugiere que su nivel de expresión es significativamente mayor que el de los otros dos genes, como se ha observado en todos los estudios realizados (Germain et al., 2001; He et al., 2002). En este sentido, todos los trabajos previos sugerían que el gen *KAT2* codificaba la proteína *KAT* más importante de β -oxidación en *Arabidopsis*. Respecto a su secuencia, todos los genes *KAT* presentan un alto grado de similitud, principalmente entre los genes *PED1/KAT2* y *KAT1*, considerados homólogos ya que muestran porcentajes de similitud del 84 % a nivel de nucleótido en la CDS y del 88 % a nivel de su secuencia aminoacídica (figura 6.B). Por otra parte, las proteínas codificadas por los transcritos *KAT5.1/PKT1* y *KAT5.2/PKT2* son idénticas a excepción del extremo N-terminal donde la proteína *KAT5.2/PKT2* contiene 43 aminoácidos más debido a la falta del primer exón en la secuencia codificante de *KAT5.1/PKT1* (Carrie et al., 2007) (figura 6.B-C). La ausencia de este exón produce en la proteína *KAT5.1/PKT1* la pérdida del péptido señal PTS2 que marca la localización peroxisomal en el resto de proteínas *KAT* (Carrie et al., 2007) (figura 6.C). De manera coincidente con el alto grado de similitud encontrado en las secuencias de las diferentes proteínas *KAT*, superior en todos los casos al 69 %, éstas también presentan características similares en cuanto al tamaño y peso molecular, principalmente entre las proteínas peroxisomales (*PED1/KAT2*, *KAT1* y *KAT5.2/PKT2*), siendo el pI la característica mas diferenciable entre ellas. Por último, trabajos previos han sugerido que *KAT2* no presenta

especificidad de sustratos, sin embargo, no existen datos para el resto de proteínas KAT (figura 6.C).

A

GEN	Cod. gen. AGI	Crom.	CDS (nt)	Proc.	Nº exones	ESTs	Estructura génica
<i>PED1/KAT2</i>	At2g33150	2	1389	No	14	>400	
<i>KAT1</i>	At1g04710	1	1332	No	14	<15	
<i>KAT5.1/PKT1</i>	At5g48880	5	1245	Si	13	<100	
<i>KAT5.2/PKT2</i>			1374		14		

B

CDS Prot	KAT2	KAT1	KAT5.1	KAT5.2
KAT2		<i>84</i>	<i>69</i>	<i>69</i>
KAT1	88		<i>69</i>	<i>68</i>
KAT5.1	72	71		<i>100</i>
KAT5.2	69	71	100	

C

PROTEÍNA	Tamaño (aa)	Peso (kDa)	pI	Especif. sustrato	Peptido señal	Localización subcelular
KAT2	463	48,58	8,47	No	PTS2	peroxisoma
KAT1	444	46,61	8,41	?	PTS2	peroxisoma
KAT5.1	415	43,17	7,07	?	-	citosol
KAT5.2	458	47,95	7,45	?	PTS2	peroxisoma

Figura 6. Análisis *in silico* de las secuencias de genes *KAT* de *A. thaliana* y de las proteínas que codifican.

A. Características principales de los distintos genes *KAT*. Se indica para cada gen el código genético AGI, el cromosoma donde se localiza (crom.), el tamaño de la CDS en nucleótidos, la presencia de procesamiento alternativo (proc.), el número de exones que contiene, el número de ESTs disponibles en las bases de datos y la estructura génica indicando el tamaño en pares de bases. Las cajas negras representan exones y las líneas representan intrones. **B.** Porcentaje de identidad (%) a nivel de nucleótido entre los distintos genes *KAT* en la región codificante (CDS) (indicado en letra cursiva), y entre las proteínas *KAT* a nivel de aminoácidos (Prot) (indicado en fondo gris). **C.** Características principales de las distintas proteínas *KAT*. Se indica para cada proteína el tamaño en aminoácidos, el peso molecular en kDa, el punto isoeléctrico (pI), la especificidad de sustrato, presencia de péptido señal y la localización subcelular de la proteína.

2. Patrón de expresión espacial de genes *KAT*.

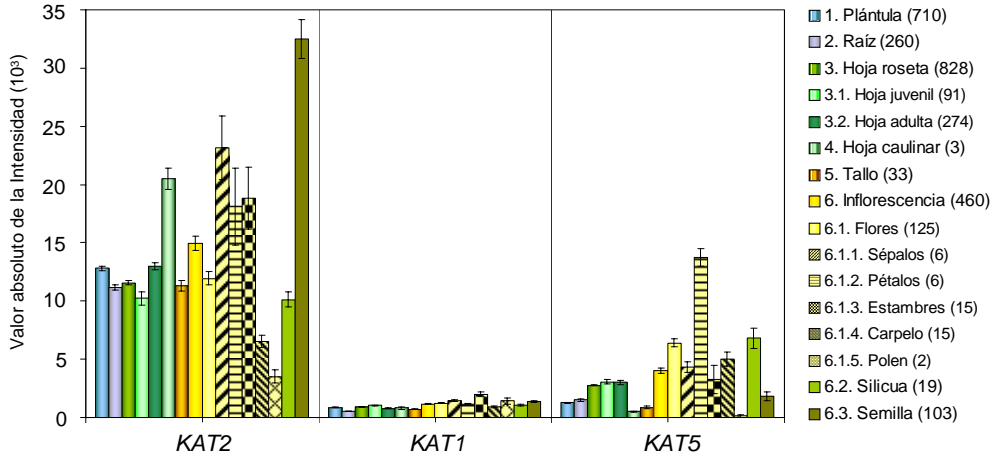
2.1. Expresión de los genes *KAT* en distintos órganos.

Con el propósito de analizar la expresión de los genes *KAT* en distintos tejidos de *A. thaliana* se recurrió en primer lugar a la información existente en la base de datos del *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann et al., 2004) que contiene los resultados de numerosos análisis transcriptómicos. Los valores de la intensidad

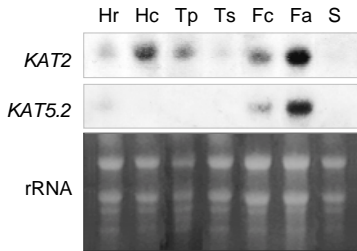
absoluta de las micromatrices indicaron de nuevo el bajo nivel de expresión de los genes *KAT5* y *KAT1* en relación a *KAT2* (figura 7.A). Además, estos datos mostraron un patrón de expresión específico de los distintos genes *KAT* en la planta. Los niveles de expresión del gen *KAT1* fueron muy bajos en todos los órganos y se observaron valores levemente superiores en algunos órganos florales, concretamente en estambres (figura 7.A). El gen *KAT5* mostró valores de intensidad variables según el órgano analizado, encontrándose los niveles máximos de expresión en silicuas y en flores, principalmente en pétalos (figura 7.A). Por último, los altos valores de intensidad hallados para el gen *KAT2* indicaron una expresión mayor de este gen en todos los órganos de la planta comparativamente al resto de genes *KAT*, observándose los mayores niveles de expresión en hojas caulinares, en algunos órganos florales como sépalos, pétalos y estambres y en semillas, donde se obtuvieron los máximos niveles de expresión de este gen (figura 7.A). Concordantemente con los datos de micromatrices, los análisis Northern blot mostraron nuevamente un patrón de acumulación diferencial de los transcritos *KAT2* y *KAT5* en los diferentes órganos analizados (figura 7.B). El nivel mayor de expresión del gen *KAT2* se observó nuevamente en hojas caulinares y sobretodo en flores abiertas (posterior a la antesis) (figura 7.B), coincidiendo con el patrón de luminiscencia emitido por las plantas transgénicas *KAT2::LUC* (generadas según se describe en el apartado Materiales y Métodos), que presentan la mayor actividad luciferasa en flores (figura 7.C). Por el contrario, en raíces se detectaron niveles de transcrito de *KAT2* muy inferiores a los observados en las hojas de las mismas plántulas (figura 7.D). Referente al gen *KAT5*, este trabajo se ha centrado en el análisis del transcrito *KAT5.2* que codifica la proteína *KAT5* peroxisomal. A pesar de los bajos niveles de expresión que dificultan su detección por análisis Northern blot, se observaron niveles relativamente altos del transcrito *KAT5.2* en flores, principalmente en flores abiertas (figura 7.B), coincidiendo con los datos obtenidos de las bases de datos de micromatrices. Sin embargo, en silicuas no se detectaron niveles elevados de transcrito de *KAT5* como se describe en los datos del *Genevestigator*.

Los patrones de expresión analizados indicaron una especificidad de la expresión de los distintos genes *KAT* en diferentes órganos de *A. thaliana*, teniendo el gen *KAT2* niveles de expresión significativamente más altos y una distribución más amplia a lo largo de la planta. Por otra parte, se observó que los tejidos donde más se acumulan los transcritos *KAT* fueron en los órganos reproductores, produciéndose por tanto en éstos, una activación conjunta de la expresión de todos los genes *KAT*.

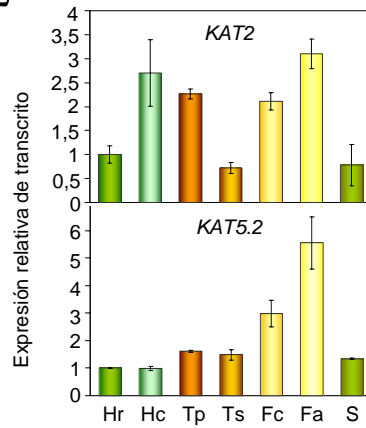
A



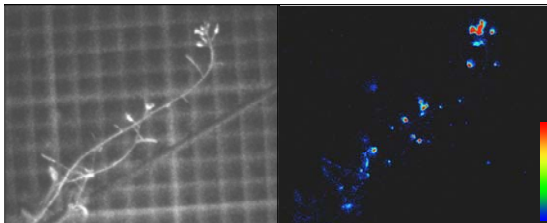
B.1



B.2



C



D

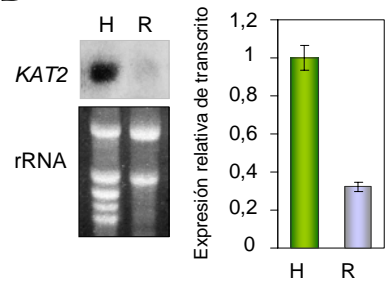


Figura 7. Nivel de expresión de los genes *KAT* en distintos órganos de *A. thaliana*.

A. Representación gráfica de la media \pm EE de la señal de la intensidad absoluta de múltiples análisis de micromatrices obtenidos con la herramienta *GeneAtlas* de la base de datos *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann et al., 2004) para cada gen *KAT*. En la leyenda aparece junto con el nombre del órgano analizado el número de micromatrices con los que se ha obtenido el valor medio para cada tejido (valor entre paréntesis). **B.** Análisis de la expresión de los genes *KAT2* y *KAT5.2* en distintos órganos de plantas Col de seis semanas de edad y cultivadas en condiciones de día largo (DL): hoja de roseta (Hr), hoja caulinar (Hc), tallo principal (Tp), tallo secundario (Ts), flor cerrada (Fc), flor abierta (Fa) y silicua (S). **(1)** Análisis Northern blot. **(2)** Representación gráfica que muestra los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido del rRNA correspondiente en cada muestra. Cada barra representa la media \pm EE de tres réplicas. **C.** Monitorización del nivel de luminiscencia emitido por una planta transgénica *KAT2::LUC* donde se observan distintos órganos como tallo secundario, silicuas y flores. La planta fue rociada con una disolución 0,1 mM de luciferina y la imagen fue obtenida a las dos horas con una cámara para baja luminosidad Hamamatsu C2400. El código de colores correlaciona con la intensidad lumínica detectada, siendo el azul el nivel más bajo y el rojo el nivel superior. Se analizaron varias líneas homocigotas independientes *KAT2::LUC* con resultados similares en todos los casos. **D.** Análisis de la expresión del gen *KAT2* mediante Northern blot en hojas (H) y raíces (R) de plántulas de 11 días. La gráfica representa los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido del rRNA correspondiente en cada muestra. Cada barra representa la media \pm EE de siete réplicas. En los análisis Northern blot se utilizaron sondas radiactivas específicas para cada gen y se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga.

2.2. Patrón de expresión del gen *KAT2* en órganos reproductores.

En *Arabidopsis*, el mutante *aim1*, defectivo en una de las dos MFP implicadas en β -oxidación, presenta alteraciones en los meristemos inflorescentes que finalmente dan lugar a plantas con flores anormales y una fertilidad severamente reducida (Richmond y Bleecker, 1999). Además, el doble mutante *cts1/ped3/pxa1 ped1/kat2* presenta severas alteraciones en el desarrollo floral que no se observan en ninguno de los parentales (Hayashi et al., 2002). Estos resultados indican que la β -oxidación es esencial para un correcto desarrollo de los órganos florales que finalmente determinan el desarrollo reproductivo y la formación del fruto. Ya que los datos de expresión de los genes *KAT* indicaban un patrón específico de acumulación en distintas partes de la flor, se llevó a cabo un análisis más detallado del patrón de expresión del gen *KAT2* a través de la tinción histoquímica con X-gluc en órganos reproductores de plantas transgénicas *KAT2::GUS* (generadas según se describe en el apartado Materiales y Métodos), abarcando varias etapas del desarrollo y maduración de la flor y el fruto. En este sentido, la tinción histoquímica de

la actividad GUS que representa los dominios físicos de la expresión del gen *KAT2*, reveló un patrón espacial y temporal específico durante el desarrollo y maduración de los órganos florales (figura 8). En fases tempranas del desarrollo floral previas a la apertura de la flor, coincidentes con los estadios 10 a 12 descritos por Smyth y col. (Smyth et al., 1990), no se detectó tinción GUS en ningún órgano. En los estadios 13 y 14 correspondientes a flores abiertas donde ha tenido lugar la antesis, se observó una fuerte actividad GUS en las anteras de los estambres y en los extremos de los carpelos que en estadios posteriores se extendía a la totalidad de éstos (figura 8.A-B). En estadios más avanzados del desarrollo floral (estadio 15), correspondientes a flores fecundadas en las que se produce un crecimiento del carpelo, se produjo una reducción progresiva de la expresión GUS de las anteras observándose tinción en los granos maduros de polen (figura 8.C-D y K). En este mismo estadio, se observó una fuerte tinción en los filamentos de los estambres y en el estigma del carpelo, así como en sépalos, base de los pétalos y en los nectarios, glándulas situadas en la base de la flor (figura 8.D-E y N). El análisis del patrón de expresión realizado con microscopía óptica mostró más en detalle las diferencias observadas. La actividad GUS detectada en los nectarios se observó en estadios muy tempranos del desarrollo floral y permaneció a lo largo del periodo de formación de la silicua (figura 8.L). En fases posteriores donde se produce el marchitamiento de pétalos y carpelos conjuntamente con el desarrollo del fruto (estadio 16), se observó una migración de la expresión GUS desde el estigma hasta el estilo del carpelo, manteniéndose una fuerte tinción en los filamentos de los estambres y en los nectarios (figura 8.F). La tinción GUS del estigma observada en flores senescentes sugería que la activación de la expresión del gen *KAT2* es posiblemente simultánea al crecimiento del tubo polínico y a la red vascular de la silicua en formación ya que la tinción GUS parecía darse en las mismas células que están implicadas en estos procesos (figura 8.M). Posteriormente, a medida que la formación de la silicua fue en progreso, la expresión GUS fue extendiéndose al interior de la silicua desde el estilo observándose una fuerte tinción en los sacos embrionarios (figura 8.G). En esta fase (estadio 17), se observó una fuerte activación de la expresión GUS en el embrión de la semilla en formación que finalmente en la silicua madura desaparecía completamente (figura 8.G-J y O). En esta fase final, correspondiente al estadio 18, únicamente se observó tinción GUS en el funículo de la semilla madura, en el haz vascular de la silicua y en la zona de abscisión de las valvas (figura 8.I-J). Además, en semillas abortadas que no habían completado su desarrollo se observó una fuerte tinción como se muestra en las imágenes de microscopía óptica (figura 8.P).

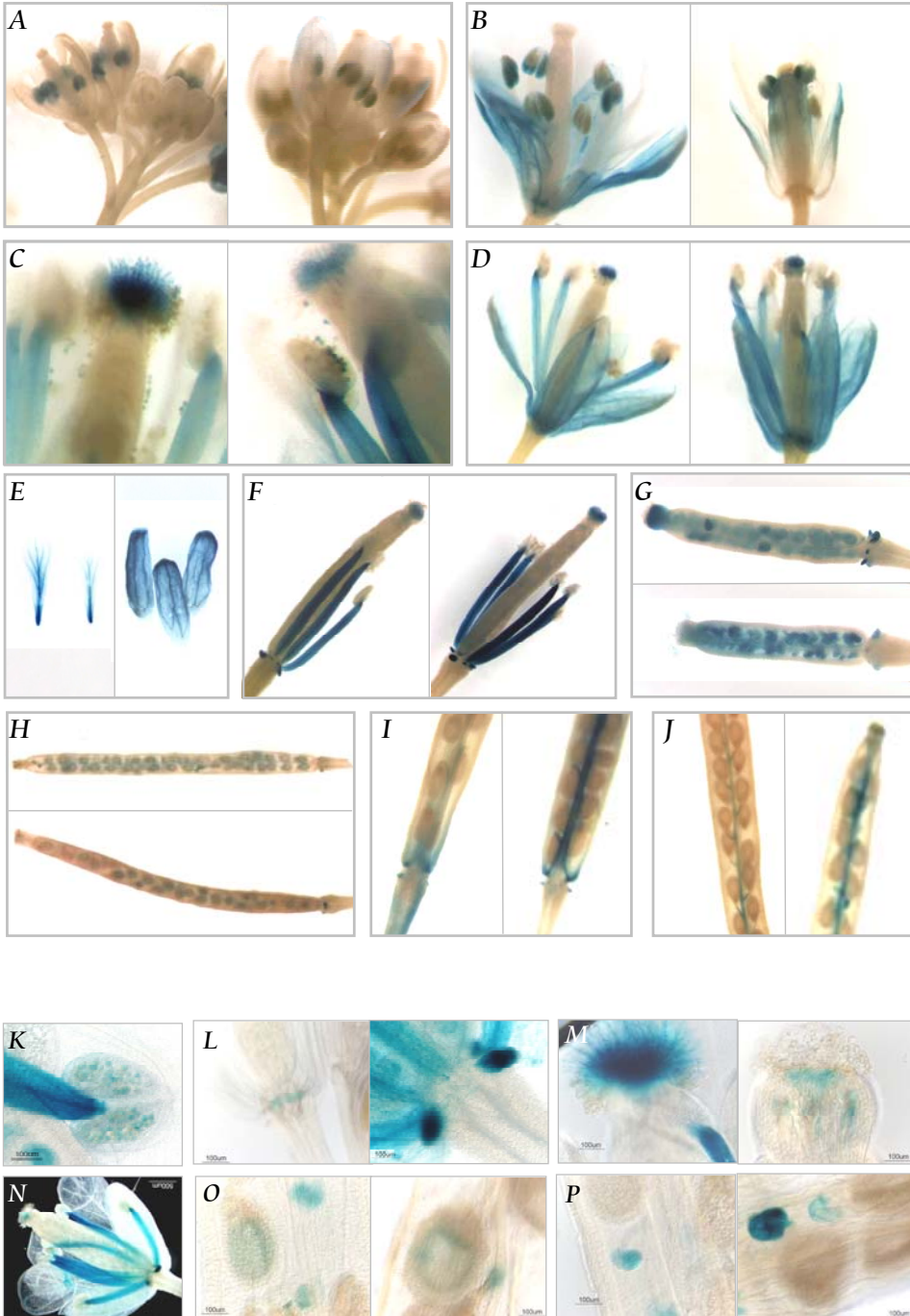


Figura 8. Tinción histoquímica con X-gluc en flores y silicuas de plantas *KAT2::GUS*.

Las tinciones azules representan los dominios físicos de la expresión del gen *KAT2*. **A-J.** Las imágenes corresponden en cada apartado a las líneas transgénicas homocigotas independientes 8-1 y 19-5 y fueron obtenidas con un microscopio estereoscópico SMZ800 (Nikon). **A.** Flores inmaduras (estadios 10 a 13). **B.** Flores jóvenes post-antesis (estadios 13-14). **C.** Detalle de la autopolinización de dos flores donde se observan los granos de polen. **D.** Flores maduras (estadio 15). **E.** Pétalos y sépalos de flores maduras. **F.** Flores senescentes (estadio 16). **G.** Silicuas en formación (estadio 16 a 17). **H.** Silicuas en estadio de formación más avanzado (estadio 17). **I.** Extremo inferior de silicuas maduras (estadio 18). **J.** Extremo superior de silicuas maduras (estadio 18). **K-P.** Detalle de algunas zonas de interés realizadas con microscopio óptico. **K.** Antera con granos de polen. **L.** Glándulas nectarias de flor joven y madura. **M.** Estigmas de flor madura y senescente. **N.** Flor madura. **O.** Semilla en formación. **P.** Óvulos abortados junto con semillas maduras.

En resumen, el patrón de expresión de la actividad GUS observado en plantas transgénicas *KAT2::GUS*, sugería un patrón dinámico de la expresión del gen *KAT2* a lo largo del desarrollo y maduración de la flor. Sin embargo, las flores y silicuas de plantas transgénicas *KAT2as*, generadas según se describe en el apartado Materiales y Métodos, en las que la sobreexpresión del transcrito de *KAT2* en orientación antisentido produce una reducción de su expresión de más del 90 %, (los niveles de transcrito medidos por análisis de RT-PCR cuantitativa se muestran en la figura 22), no mostraron diferencias aparentes respecto a plantas control. De hecho, las plantas *KAT2as* presentan una morfología y anatomía similar a la de plantas silvestres Col, no mostrando diferencias aparentes en el desarrollo o tamaño de las distintas partes de la planta.

3. Análisis molecular y funcional del gen *KAT2* a lo largo del desarrollo postgerminativo.

3.1. Patrón de expresión del gen *KAT2* durante el desarrollo postgerminativo.

La expresión de los genes de β -oxidación se induce de forma coordinada durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de las semillas (Rylott et al., 2001; Graham y Eastmond, 2002), período en el que desempeñan un papel fundamental ya que a partir de la

degradación de ácidos grasos proporcionan la energía suficiente para que estos procesos tengan lugar. En concreto, según los datos transcriptómicos obtenidos del *Genevestigator*, *KAT2* es el único gen *KAT* que aumenta su expresión en los primeros estadios del desarrollo de la plántula (figura 9.A). Este hecho sugiere que *KAT2* codifica la enzima que aporta la actividad KAT necesaria para la movilización de lípidos de reserva que tiene lugar en la fase postgerminativa, como se había descrito previamente (Kato et al., 1996; Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001). La expresión del gen *KAT2* y la actividad tiolasa aumentan desde la germinación hasta plántulas de 3 días para decaer finalmente (Rylott et al., 2001).

Con el propósito de analizar en detalle el patrón de expresión del gen *KAT2* a lo largo del desarrollo postgerminativo, se utilizaron plantas transgénicas *KAT2::GUS* en las que se detectó la actividad GUS mediante tinción histoquímica con X-gluc. desde estadios muy tempranos hasta plántulas de 14 días postgerminación (d.p.g.). Como se observa en la figura 9.B, las plántulas de 3 días presentaron una tinción muy fuerte en los cotiledones, en el hipocotilo y en la unión hipocotilo-raíz, presentando una expresión muy débil en la raíz. En plántulas de 7 días la actividad GUS disminuyó comparativamente con la fase anterior, aunque permaneció en cotiledones, hipocotilo y en la unión con la raíz. En esta fase del desarrollo, no apareció tinción en las hojas nuevas que surgieron, característica que se mantuvo en plántulas de 14 días en las cuales la tinción se observó principalmente en cotiledones, hipocotilo y unión hipocotilo-raíz. Un análisis más exhaustivo de las plántulas de 3 días permitió observar distintos grados de tinción GUS, desde plántulas con prácticamente todo el hipocotilo teñido y otras donde claramente aparecía la zona central sin tinción (figura 9.C).

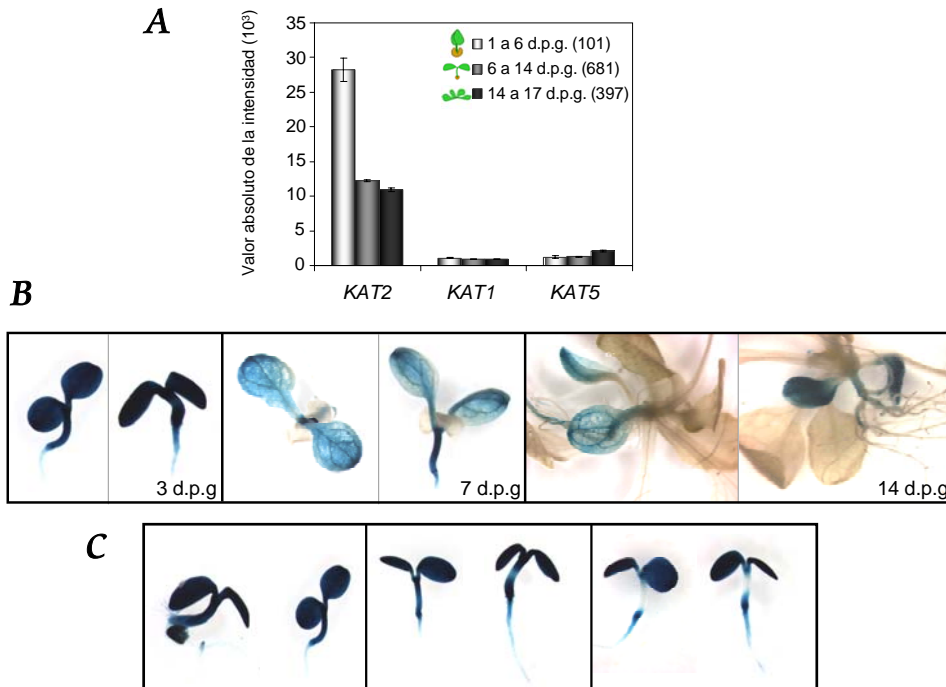


Figura 9. Patrón de expresión del gen *KAT2* en plántulas de *A. thaliana*.

A. Representación gráfica de la media \pm EE de la señal de la intensidad absoluta de múltiples análisis de micromatrices obtenidos con la herramienta *GeneChronologer* de la base de datos *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann et al., 2004) para cada gen *KAT* en tres estadios de plántula, (d.p.g, días postgerminación). En la leyenda aparece en paréntesis el número de micromatrices con los que se ha obtenido el valor medio para cada estadio. **B-C.** Tinción histoquímica con X-gluc en plántulas transgénicas *KAT2::GUS* cultivadas en medio MS suplementado con sacarosa 1% (p/v). Para cada estadio se muestran las imágenes de dos plántulas correspondientes a las líneas transgénicas homocigotas e independientes 8-1 y 19-5 obtenidas con un microscopio estereoscópico SMZ800 (Nikon). Las tinciones azules representan los dominios físicos de la expresión del gen *KAT2* en plántulas. **B.** Actividad GUS detectada en plántulas de 3, 7 y 14 días (d.p.g). **C.** Distintos grados en la actividad GUS detectada en los hipocotilos de plántulas de 3 días.

3.2. Participación de *KAT2* en el desarrollo postgerminativo.

Muchos de los mutantes de β -oxidación, entre ellos el mutante *ped1/kat2*, presentan un bloqueo en la movilización de lípidos de reserva y necesitan, por tanto, un aporte externo de carbohidratos para un correcto desarrollo de la plántula hasta el establecimiento de la capacidad fotosintética (Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001; Hayashi et al., 2002; Fulda et al., 2004; Adham et al., 2005; Pinfield-Wells et al., 2005;

Rylott et al., 2006). En este sentido, se comprobó en primer lugar si las plantas transgénicas *KAT2as*, que presentan una expresión reducida del gen *KAT2*, presentan los mismos defectos en el desarrollo postgerminativo que el mutante *ped1/kat2*. El porcentaje de germinación de las diferentes líneas homocigotas *KAT2as* no mostró diferencias con respecto al ecotipo silvestre Col, tanto en medios suplementados con sacarosa como en medios sin aporte de energía externo. Sin embargo, se observaron fuertes alteraciones al analizar el desarrollo postgerminativo de las plántulas *KAT2as*. Como se muestra en la figura 10.A, las semillas de las líneas transgénicas *KAT2as* germinadas en ausencia de sacarosa, no progresaban más allá de los primeros estadios de desarrollo y permanecían en estado de dos cotiledones sin llegar a acumular clorofila ni formar hojas nuevas. El análisis de la longitud de la raíz en estas plantas mostró de nuevo la función clave de *KAT2* en el desarrollo postgerminativo. Las plántulas de las diferentes líneas *KAT2as* desarrollaron raíces más cortas que el ecotipo silvestre Col principalmente en ausencia de sacarosa (figura 10.B). Posteriormente, las plantas transgénicas *KAT2as* no requirieron sacarosa en el medio de crecimiento para continuar desarrollándose, como se ha descrito para el resto de mutantes de β -oxidación.

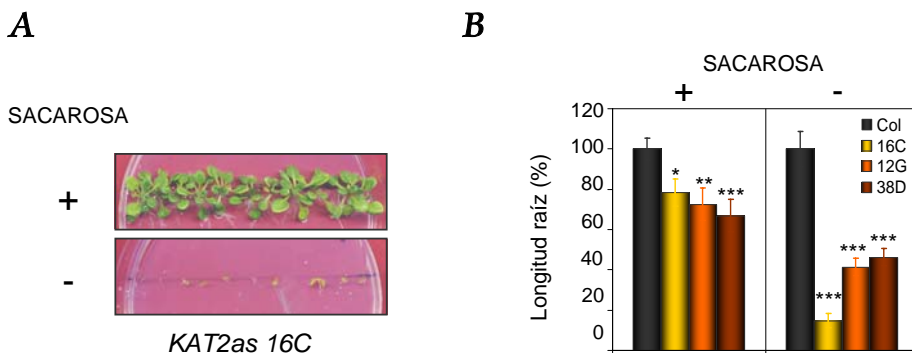


Figura 10. Análisis del desarrollo postgerminativo de las líneas *KAT2as*.

A. Fenotipo de plántulas de 14 días postgerminación de la línea homocigota 16C cultivadas en medio MS suplementado con o sin sacarosa al 1% (p/v). **B.** Representación gráfica de las medidas de la longitud de la raíz de plántulas Col y de tres líneas transgénicas homocigotas independientes (16C, 12G y 38D) cultivadas en medio MS suplementado con o sin sacarosa al 1% (p/v). Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes, cada uno de ellos con aproximadamente 15 a 20 plántulas de la misma edad. Para cada experimento la longitud media de la raíz en Col (control) se consideró como el 100% y se extrapolaron las medidas de las líneas transgénicas referidas a su control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ según análisis t-test para cada línea respecto a Col.

4. Análisis molecular y funcional del gen *KAT2* en respuesta a la herida y otros procesos relacionados.

Como se ha comentado en la introducción, la β -oxidación no es sólo un proceso implicado en el metabolismo de ácidos grasos, sino que además ha sido propuesto durante años como participe de las rutas de biosíntesis de moléculas con actividad señalizadora en defensa como el JA y el SA (Vick y Zimmerman, 1983; 1984; Raskin, 1992; Ribnicky et al., 1998; Jarvis et al., 2000; Miersch y Wasternack, 2000; Hertweck et al., 2001; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002). Sin embargo, no se había determinado que genes concretos intervinieran en cada caso, ni la regulación o funcionalidad de éstos en las respuestas de defensa de las plantas. Con el propósito de averiguar la implicación de la β -oxidación en las respuestas frente a herida en *A. thaliana*, se analizó la expresión de genes *KAT*, y particularmente del gen *KAT2*, en respuesta al daño mecánico y a moléculas con actividad señalizadora en plantas.

4.1. Expresión de los genes *KAT* en respuesta a herida y moléculas funcionalmente relacionadas.

4.1.1. Respuesta al daño mecánico.

Para llevar a cabo un estudio mas completo, se analizó a nivel transcripcional tanto la respuesta local (L), que tiene lugar en las hojas dañadas, como la respuesta sistémica (S) que se activa en las hojas que no han sido heridas. Los análisis Northern blot realizados mostraron una activación transitoria de la expresión de los genes *KAT* en respuesta a la herida, contrariamente a los datos transcriptómicos disponibles en las bases de datos. Como se observa en la figura 11, los genes *KAT2* y *KAT5.2* mostraron cinéticas de inducción distintas. La expresión del gen *KAT2* aumentó unas cuatro veces en hojas heridas, teniendo el máximo de expresión a las 6 horas, momento a partir del cual la expresión comenzó a disminuir pero mantuvo niveles inducidos aún a las 24 horas. El gen *KAT2* también mostró una activación de su expresión en hojas no dañadas que activan la respuesta sistémica, en un rango menor que a nivel local, con un máximo de expresión a las 6 horas (figura 11.A). Por otra parte, la expresión del gen *KAT5.2* se indujo fuertemente a nivel sistémico mostrando niveles altamente inducidos a las 2 horas posteriores a la realización de la herida (figura 11.A). Este patrón coincide con el esperado para el gen *JASMONIC ACID*

RESPONSIVE 2 (JR2)/CORONATINE INDUCIBLE 3 (CORI3) (At4g23600) que codifica una cistina liasa implicada en el metabolismo de aminoácidos (Jones et al., 2003). Este gen se ha caracterizado como un marcador de las respuestas a herida dependientes de JA (Titarenko et al., 1997) y activa su expresión en respuesta a herida, JA, coronatina, ABA, estrés osmótico y a fitotoxinas microbianas (Titarenko et al., 1997; León et al., 1998; Lopukhina et al., 2001; Gong et al., 2001; Devoto et al., 2005). Por otro lado, el patrón de expresión del gen *KAT2* en respuesta al daño mecánico, no coincidía totalmente con el de *JR2* ni con el patrón típico del gen *WOUND RESPONSIVE 3 (WR3)/NRT3.1* (At5g50200) gen marcador de la vía independiente de JA en respuesta a la herida que solo se activa a nivel local (Titarenko et al., 1997; León et al., 1998) (figura 11.A). Este gen codifica un transportador de nitrato de alta afinidad cuya deficiencia en *Arabidopsis* produce una menor absorción y acumulación de nitrato en los brotes (Okamoto et al., 2006; Kawachi et al., 2006). Sorprendentemente, hojas heridas de plantas transgénicas *KAT2::GUS* no presentaron actividad GUS, sugiriendo que el/los elemento/s reguladores del promotor de *KAT2* necesarios para la activación por herida no estaban incluidos en la construcción genética incorporada en estas plantas.

A continuación se analizó la expresión del gen *KATI* en la respuesta local y sistémica desencadenada por la herida. Como hemos visto recientemente, el patrón de expresión del gen *KATI*, homólogo de *KAT2*, no coincidía con éste, según los datos disponibles de micromatrices y, además, presentaba niveles bajos de expresión. Este motivo, junto con el gran porcentaje de similitud existente entre los transcritos de *KATI* y *KAT2*, determinó la utilización de una estrategia de RT-PCR semicuantitativa con oligonucleótidos específicos para cada gen seguida de análisis Southern, para analizar la expresión de este gen. Los niveles de expresión de los genes *KAT2* y *KATI*, cuantificados y normalizados al contenido de *ubiquitina 10 (UBQ10)* (At4g05320), indicaron que la expresión del gen *KATI*, a diferencia de su homólogo *KAT2*, no se induce en respuesta a la herida ni local ni sistémicamente, al menos en los tiempos analizados (figura 11.B). Además, coincidiendo con los valores de intensidad de los datos transcriptómicos, la comparación entre las señales radiactivas obtenidas para *KAT2* y *KATI*, reveló niveles de expresión entre 50 a 100 veces inferiores de *KATI* con respecto a *KAT2*, indicando nuevamente el ínfimo nivel de expresión de este gen en *Arabidopsis*.

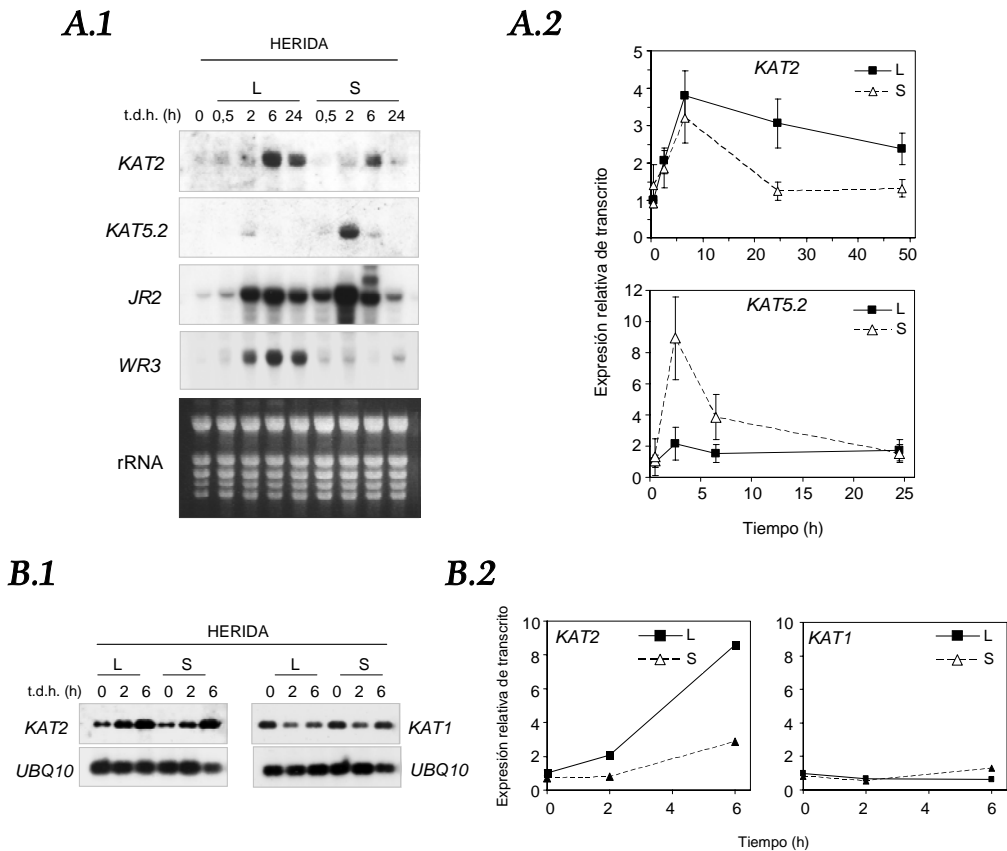


Figura 11. Nivel de expresión de los genes *KAT* en respuesta a la herida en *A. thaliana*.

La mitad de las hojas de la roseta de plantas Col cultivadas durante tres semanas en tierra y en fotoperiodo de DL fueron dañadas mediante pinzas estriadas. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de producirse la herida (t.d.h.), tanto de hojas heridas (L) como de hojas de la roseta no dañadas (S). **A.** Cinética de la expresión de los genes *KAT2* y *KAT5.2* (1). Análisis Northern blot. Se incluye la hibridación con sondas correspondientes a los genes marcadores de las respuestas a herida, dependientes e independientes de JA, *JR2* y *WR3* respectivamente. Se utilizaron sondas radiactivas específicas para cada gen y se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. (2). Los valores de las gráficas representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de entre 8 a 16 experimentos independientes para el gen *KAT2* y de 4 experimentos independientes para el gen *KAT5.2* **B.** Cinética de la expresión del gen *KAT1*. (1). Análisis por RT-PCR semicuantitativa y Southern blot. Como molde se utilizó cDNA obtenido a partir de hojas de la roseta dañadas (L) y no dañadas (S) de las plantas heridas. Se incluye la hibridación con la sonda correspondiente al gen *UBQ10* como control de carga. (2). Los valores de las gráficas representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de *UBQ10* correspondiente en cada muestra. Se han obtenido resultados similares en otros experimentos.

El patrón de inducción diferencial de los genes *KAT2* y *KAT5* en respuesta a la herida parecía indicar que la activación de cada gen ocurría por vías de señalización distintas. Con el propósito de profundizar más en los mecanismos implicados en la activación de los genes *KAT* en respuesta a herida en *Arabidopsis*, se analizó la expresión de estos genes tanto a nivel local como sistémico en plantas heridas Col, *coi1-1*, nahG y en el doble mutante *coi1-1nahG*, (generado según se describe en el apartado Materiales y Métodos). El mutante insensible a JA *coi1-1* (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998) y las plantas transgénicas nahG que no acumulan SA porque lo degradan a catecol (Delaney et al., 1994; 1995; Lawton et al., 1995), representan herramientas muy útiles para analizar la participación de JA y SA en la regulación de la defensa y el desarrollo de las plantas. El análisis Northern blot mostró una activación local y sistémica del gen *KAT2* en respuesta a la herida similar en todos los genotipos analizados, sugiriendo que la inducción de *KAT2* por la herida es independiente de COI1, y por tanto de la percepción de JA. Por el contrario, la activación sistémica del gen *KAT5.2* se produjo en plantas Col y nahG, pero dicha inducción estuvo completamente suprimida en plantas *coi1-1* y *coi1-1nahG* (figura 12). Este patrón sugería que la activación de la expresión del gen *KAT5.2* era totalmente dependiente de la señalización mediada por COI1 y por tanto, dependiente de JA, similar al patrón de inducción que mostraba el gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA (figura 12). En el gen *JR2* se observa a nivel local la represión mediada por etileno que inhibe la vía dependiente de JA (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1999; León et al., 2001), sugiriendo que esta represión está actuando también sobre la expresión del gen *KAT5.2* a nivel local. Por otra parte, la activación en respuesta a la herida de los genes *KAT* fue independiente de la acumulación de SA, ya que se obtuvieron patrones de inducción similares en las plantas Col y en las plantas nahG. Además, el SA parecía ejercer cierto efecto represor en la expresión del gen *KAT2*, ya que de forma repetitiva se encontraron niveles de expresión mayores en las plantas nahG. Sin embargo, dicho efecto no se observaba en plantas *coi1-1nahG* deficientes en la acumulación de SA y en la percepción de JA (figura 12).

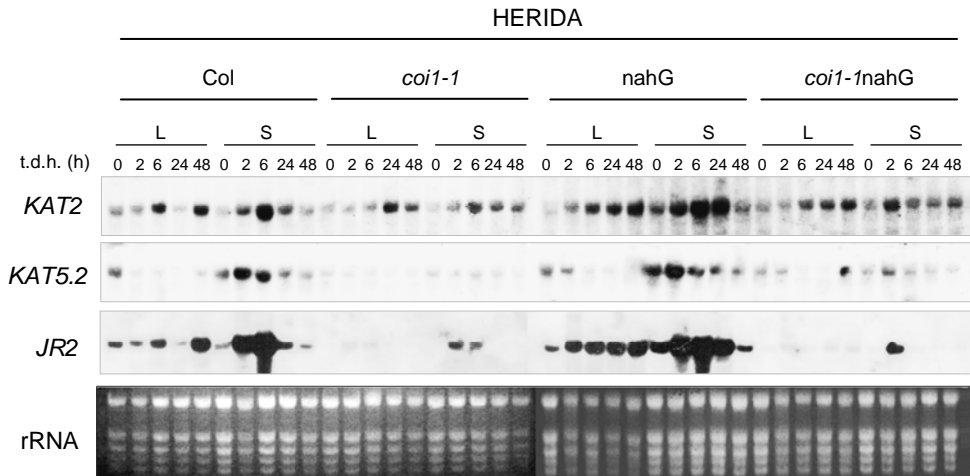


Figura 12. Nivel de expresión de genes *KAT* en respuesta a la herida en plantas Col, deficientes en SA (*nahG*), insensibles a JA (*coi-1*) y en el doble mutante *coi-1nahG*.

La mitad de las hojas de la roseta de plantas cultivadas durante tres semanas en tierra y en fotoperiodo de DL fueron dañadas mediante pinzas estriadas. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de producirse la herida (t.d.h.) tanto de hojas heridas (L) como de hojas de la roseta no dañadas (S). La expresión de los genes se analizó por Northern blot utilizando sondas radiactivas específicas para cada gen. Se incluye la hibridación con la sonda correspondiente al gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA y la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga.

4.1.2. Respuesta a la aplicación exógena de JA y SA.

Ya que en las respuestas a la herida analizadas parecían estar implicadas tanto la vía dependiente de COI1, y por tanto, dependiente de la percepción de JA, como la vía independiente de COI1, para la activación de los genes *KAT5* y *KAT2* respectivamente, se quiso comprobar si la aplicación exógena de JA era capaz de activar la expresión de los genes *KAT* con un patrón de inducción concordante con las respuestas a la herida observadas. Para este propósito, se analizó la expresión de los genes *KAT* en respuesta a concentraciones crecientes de JA en plántulas Col y *coi-1* con el fin de discernir entre vías de señalización mediadas por COI1 o independientes de ésta. En el análisis Northern blot realizado se observó un aumento progresivo de la expresión del gen *KAT5* en plántulas Col a las 6 horas tras el tratamiento con concentraciones crecientes de JA, observándose la máxima inducción entre 50 y 100 μ M (figura 13.A). Coincidiendo con estos datos, los análisis transcriptómicos disponibles en las bases de datos indican que el gen *KAT5* es el

único de los genes *KAT* que aumenta su expresión en plantas tratadas con JA (ratio plantas tratadas/control de 2,21 según el *Genesvestigator*). Este patrón de activación por JA de *KAT5* era similar al mostrado por el gen *JR2*. Además, en plantas *coi1-1* no hubo un aumento de la expresión de los genes *KAT5* y *JR2* en respuesta a JA, indicando de nuevo un patrón de expresión similar de estos dos genes (figura 13.A). Estos resultados indicaban de nuevo que la activación de la expresión del gen *KAT5* en respuesta a la herida, al igual que la del gen marcador *JR2*, ocurre por una vía totalmente dependiente de COI1 y de JA. Por el contrario, la expresión del gen *KAT2* no se vio alterada al aplicar concentraciones crecientes de JA (figura 13.A), incluso cuando se analizaron distintos tiempos posteriores al tratamiento (figura 13.B), lo que nuevamente indicó que la activación de la expresión del gen *KAT2* en respuesta a la herida ocurre por una vía independiente de JA.

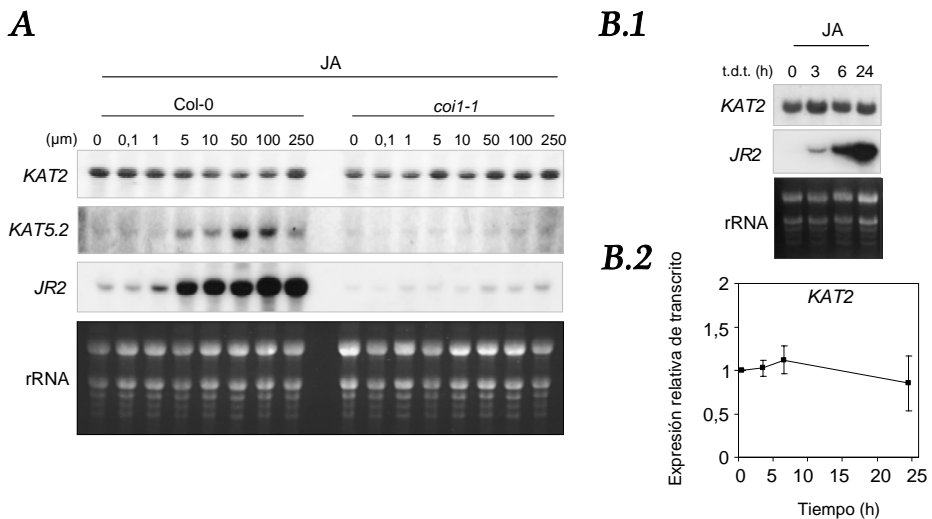


Figura 13. Nivel de expresión de los genes *KAT* en respuesta a la aplicación exógena de JA en plántulas Col y en el mutante insensible a JA *coi1-1*.

Las aplicaciones exógenas de JA se realizaron en plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v). La expresión de los genes se analizó por Northern blot con marcaje radiactivo empleando sondas específicas para cada gen. Se incluye la hibridación con la sonda correspondiente al gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA y la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **A.** Las plántulas se trataron con concentraciones crecientes de JA (μM) y las muestras se recogieron a las 6 horas después de realizar el tratamiento. **B.** Las plántulas se trataron con JA 250 μM y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.). **(1)** Análisis Northern blot. **(2)** Los valores de la gráfica representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

Existen múltiples evidencias que indican que las vías de señalización activadas por JA y SA son antagonicas (revisado por Kunkel y Brooks, 2002; Rojo et al., 2003; Glazebrook, 2005; Devoto y Turner, 2005; Lorenzo y Solano, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Halim et al., 2006; Wasternack, 2007; Loake y Grant, 2007). Con el propósito de determinar posibles interacciones en las respuestas activadas por JA y SA se comparó el patrón de expresión de los genes *KAT* en respuesta a tratamientos individuales y conjuntos de ambas hormonas. Se ha descrito que aplicaciones a bajas concentraciones (10-100 μM) de ambas hormonas tiene efectos sinérgicos en la expresión de genes dependientes de JA o de SA, y que concentraciones altas ($>100 \mu\text{M}$) o tiempos largos, produce antagonismo entre las vías de señalización activadas por ambas hormonas (Mur et al., 2006). Se comprobó por análisis Northern blot que el gen *KAT2* no modificaba su expresión en respuesta a la aplicación de concentraciones crecientes de SA (figura 14.A), ni a lo largo del tiempo después de realizar el tratamiento (figura 14.B). Coincidiendo con estos resultados, los datos transcriptómicos depositados en las bases de datos indican que el SA no altera la expresión de ningún gen *KAT*. De igual manera, la expresión de los genes *KAT5* y *JR2* no varió en el tratamiento con SA (figura 14.A). En cambio, la aplicación conjunta de ambas hormonas reveló diferencias en las vías de señalización que activaban la expresión de ambos genes en respuesta al tratamiento con JA. Mientras que la inducción del gen *JR2* en respuesta a JA fue reprimida en el tratamiento conjunto de SA+JA en todas las concentraciones analizadas, la acumulación del transcrito de *KAT5* en respuesta a JA fue similar en todos los casos, sugiriendo que el SA no actúa como represor en la activación del gen *KAT5* (figura 14.A). Respecto al gen *PRI* (At2g14580) marcador de las respuestas dependientes de SA (Ryals et al., 1996), también se observó un efecto inhibitorio en el tratamiento conjunto en todas las concentraciones analizadas (figura 14.A).

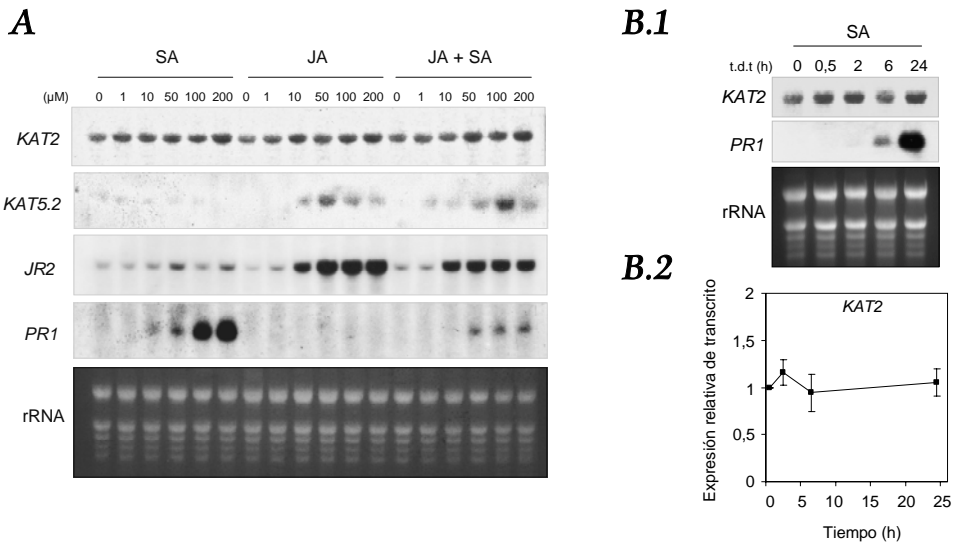


Figura 14. Nivel de expresión de los genes *KAT* en respuesta a la aplicación exógena de SA, JA y a la aplicación conjunta de ambas moléculas en plántulas de *A. thaliana*.

Las aplicaciones exógenas de JA y SA se realizaron en plántulas Col de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v). La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando marcaje radiactivo con sondas específicas para cada gen. Se incluye la hibridación con las sondas correspondientes al gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA y al gen *PR1*, marcador de las respuestas dependientes de SA. La tinción del rRNA con bromuro de etidio se añade como control de carga. **A.** Las plántulas se trataron con concentraciones crecientes de JA y/o de SA (μ M) y las muestras se recogieron a las 6 horas después de realizar el tratamiento. **B.** Las plántulas se trataron con SA 250 μ M y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.). (1) Análisis Northern blot. (2) Los valores de la gráfica representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

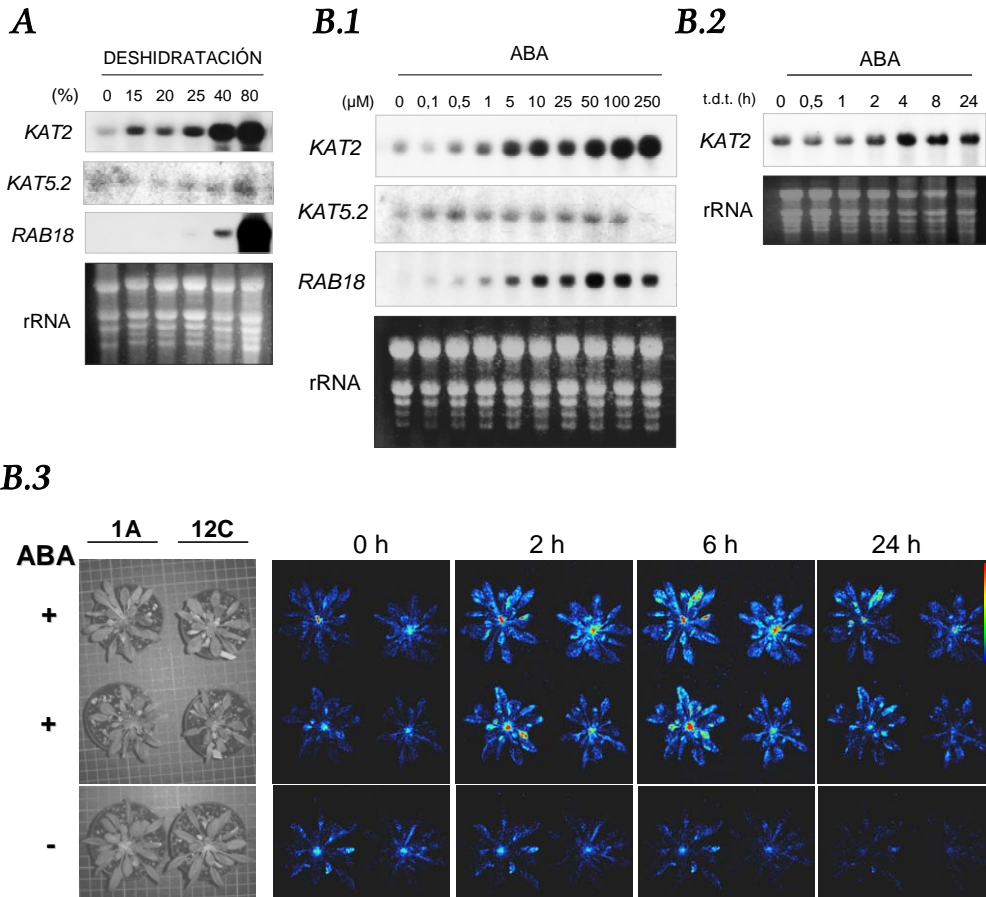
4.1.3. Respuesta a la deshidratación y a la aplicación exógena de ABA.

Como se ha descrito anteriormente, el gen *KAT2* se induce en respuesta a la herida por una vía independiente de COI1/JA. Esta vía de señalización es responsable de la activación génica a nivel local (Rojo et al., 1999; León et al., 2001). Sin embargo, *KAT2* también aumentó su nivel de expresión en respuesta a la herida a nivel sistémico por un mecanismo COI1 independiente y por tanto insensible a JA. Estos datos sugerían la participación de otra molécula móvil generada por la herida distinta del JA que actuase a

nivel sistémico (y podría actuar también a nivel local), activando a genes insensibles a JA, entre ellos *KAT2*. En solanáceas, la herida produce la acumulación local y sistémica de JA y ABA (Peña-Cortés et al., 1995; Birkenmeier y Ryan, 1998), y aunque en *Arabidopsis* la función conjunta de JA y ABA en la respuesta a la herida ha sido desacoplada (León et al., 2001), todavía no se ha determinado con exactitud las posibles funciones reguladoras del ABA en las respuestas a herida. Además, en las zonas dañadas se produce una desestructuración del tejido que va acompañado de una drástica pérdida de agua (Reymond et al., 2000; 2004), siendo la respuesta génica activada en herida, una combinación del daño y del estrés hídrico producido (Birkenmeier y Ryan 1998; Reymond et al., 2000). En este sentido, el ABA tiene una función esencial en las respuestas a estrés hídrico desencadenadas por la deshidratación producida en la herida (Christmann et al., 2006). Ya que los genes *KAT2* y *KAT5* responden a herida de manera diferencial, se analizó la expresión de estos genes en respuesta a la deshidratación y al ABA.

Figura 15. Nivel de expresión de los genes *KAT* en respuesta a la deshidratación y a la aplicación exógena de ABA en plántulas de *A. thaliana*.

La expresión de los genes se analizó por Northern blot utilizando sondas radiactivas específicas para cada gen. Se incluye la hibridación con la sonda correspondiente al gen *RAB18*, marcador de las respuestas a deshidratación dependientes de ABA y la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **A.** Plántulas Col se cultivaron en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v). A los 10 días se deshidrataron eliminando el medio de cultivo de las placas y colocándolas sobre papel Whatman. Las plántulas se pesaron antes de la deshidratación y a distintos tiempos, calculando el porcentaje de deshidratación como el cociente entre el peso fresco posterior a la deshidratación y el peso fresco inicial de cada plántula. **B.1-2.** Las aplicaciones exógenas de ABA se realizaron en plántulas Col de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v). **(1).** Las plántulas se trataron con concentraciones crecientes de ABA (μM) y las muestras se recogieron a las 6 horas después de realizar el tratamiento. **(2).** Las plántulas se trataron con ABA 50 μM y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.). **(3)** Monitorización del nivel de luminiscencia emitido por plantas de dos líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2::LUC* (1A y 12C) en respuesta a la aplicación exógena con ABA. Las plantas fueron rociadas con una disolución 0,1 mM de luciferina y a las 12 horas se realizó el tratamiento con ABA 100 μM . Las imágenes fueron obtenidas a los tiempos indicados desde la aplicación con ABA con una cámara de baja luminosidad Hamamatsu C2400. El código de colores correlaciona con la intensidad lumínica detectada, siendo el azul el nivel más bajo y el rojo el nivel superior. Se incluye el tratamiento con luciferina como control negativo.



Como se muestra en los análisis Northern blot de la figura 15, el comportamiento de los genes *KAT* fue distinto en ambos casos. El gen *KAT2* presentó una fuerte inducción en plántulas deshidratadas proporcional al porcentaje de deshidratación. En plántulas con un 15 % de deshidratación, *KAT2* mostró niveles inducidos y en situaciones de una gran pérdida de agua (>40 %), se observó el máximo nivel de inducción, presentando por tanto una sensibilidad mayor a la deshidratación que la del gen *RAB18* (At5g66400), marcador de las respuestas a deshidratación dependientes de ABA (Lang y Palva, 1992) (figura 15.A).

Por otro lado, el análisis de la expresión en plántulas tratadas con diferentes concentraciones de ABA, mostró que *KAT2* también responde a ABA de manera dependiente a la concentración aplicada, siendo el patrón de inducción similar al del gen *RAB18* (figura 15.B.1). La cinética de inducción del gen *KAT2* en respuesta al ABA fue similar a la observada en respuesta a la herida, mostrando un máximo de expresión a partir de las 4 horas y manteniendo niveles inducidos a las 24 horas (figura 15.B.2). Contrariamente, los datos disponibles en las bases de datos de análisis transcriptómicos indican que ningún gen *KAT* aumenta su expresión por ABA. En este caso, además de los análisis Northern blot, se comprobó si plantas transgénicas *KAT2::LUC* mostraban un aumento de actividad luciferasa en respuesta a ABA. Como se observa en la figura 15.B.3, la aplicación exógena de ABA en las plantas *KAT2::LUC* dio lugar a niveles altos de luminiscencia de forma generalizada en toda la planta, con una cinética de inducción similar a la observada para el análisis Northern blot. Este resultado sugería que la activación del gen *KAT2* en respuesta a deshidratación estaría mediada posiblemente por ABA. Sin embargo, el gen *KAT5* no mostró sensibilidad al ABA y únicamente en casos con un porcentaje de deshidratación muy alto, próximo al 80 %, se observó una ligera acumulación del transcrito de *KAT5* que no se relacionaría con la señalización dependiente de ABA (figura 15.A-B.1). Estos resultados sugerían que en la activación del gen *KAT2* en respuesta a la herida podría participar ABA.

Aunque las vías de señalización activadas por ABA y JA son independientes, se han descrito interacciones entre las vías de señalización de ambas hormonas en las respuestas de defensa frente a herida y patógenos (Hildmann et al., 1992; Peña-Cortés et al., 1995; León et al., 2001; Anderson et al., 2004; Adie et al., 2007b). Con el fin de determinar si la inducción de *KAT2* en respuesta a ABA era independiente de la señalización de JA, se analizó la sensibilidad de este gen a ABA en plántulas *coi1-1*, a las que se les aplicó concentraciones crecientes de ABA. También se comprobó la cinética de la respuesta del gen *KAT2* analizando distintos tiempos después de la aplicación exógena del ABA. En el análisis Northern blot se observa que el patrón de inducción del gen *KAT2* en respuesta a ABA en el mutante *coi1-1* fue similar al obtenido en plantas silvestres Col, ya que concentraciones crecientes de ABA provocaron un aumento progresivo de la expresión del gen (figura 16.A). Además, el máximo de expresión en respuesta a ABA se producía también a partir de las 4 horas, manteniendo niveles inducidos a las 24 horas (figura 16.B). Estos datos indicaban que la inducción de la expresión del gen *KAT2*, al igual que la del

gen *RAB18*, se producía de manera independiente de COI1, y sugería nuevamente que la activación del gen *KAT2* en respuesta a la herida a nivel sistémico era debida a una vía de señalización totalmente independiente a la activada por JA.

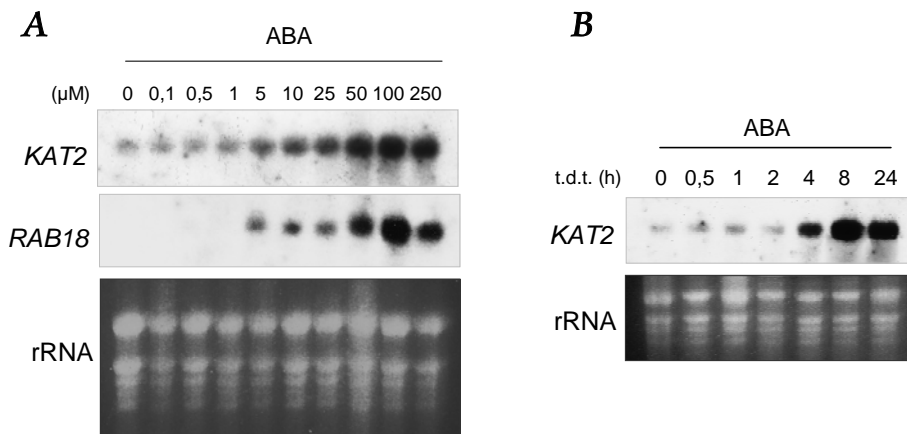


Figura 16. Nivel de expresión de los genes *KAT* en respuesta a la aplicación exógena de ABA en plántulas *coi1-1*, insensibles a JA.

Las aplicaciones exógenas de ABA se realizaron en plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v). La expresión de los genes se analizó por Northern blot utilizando sondas radiactivas específicas para cada gen. Se incluye la hibridación con la sonda correspondiente al gen *RAB18*, marcador de respuestas dependientes de ABA y la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **A.** Las plántulas se trataron con concentraciones crecientes de ABA (μM) y las muestras se recogieron a las 6 horas después de realizar el tratamiento. **B.** Las plántulas se trataron con ABA 50 μM y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.)

En resumen, los resultados obtenidos sugerían que la activación de los genes *KAT* en respuesta a la herida se produce a través de dos vías de señalización distintas. Por un lado, la vía dependiente de JA estaría interviniendo en la activación transcripcional del gen *KAT5* y por otra parte, una vía independiente de COI1/JA (y posiblemente dependiente de ABA), podría ser la responsable de la activación de *KAT2*.

4.2. Participación de KAT2 en la biosíntesis de JA en respuesta a la herida.

Como se ha comentado anteriormente, hasta la realización de este trabajo no se había descrito que genes y en que rutas de síntesis de hormonas están implicados los diferentes genes de β -oxidación. Con el fin de establecer la implicación real de la β -oxidación en estrés y concretamente la función de KAT2 en las respuestas de defensa en *Arabidopsis*, se analizó la posible participación del gen *KAT2* en la biosíntesis de JA, que como se ha comentado en la introducción, es una molécula clave en la respuesta defensiva de las plantas contra la herida y patógenos necrotrofos, aunque también está descrita su participación en otros procesos relacionados con el desarrollo como senescencia y desarrollo floral (revisado por Howe y Schilmiller, 2002; Wasternack y Hause, 2002; Farmer et al., 2003; Browse, 2005; Devoto y Turner, 2005; Wasternack, 2006; 2007; Balbi y Devoto, 2008).

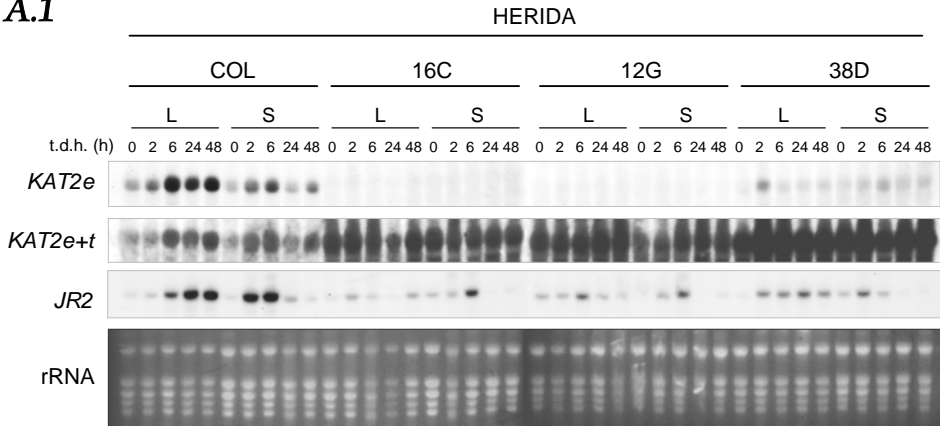
4.2.1. Participación en herida.

4.2.1.1. Respuesta a la herida activada por la vía dependiente de JA en plantas transgénicas con niveles reducidos de KAT2.

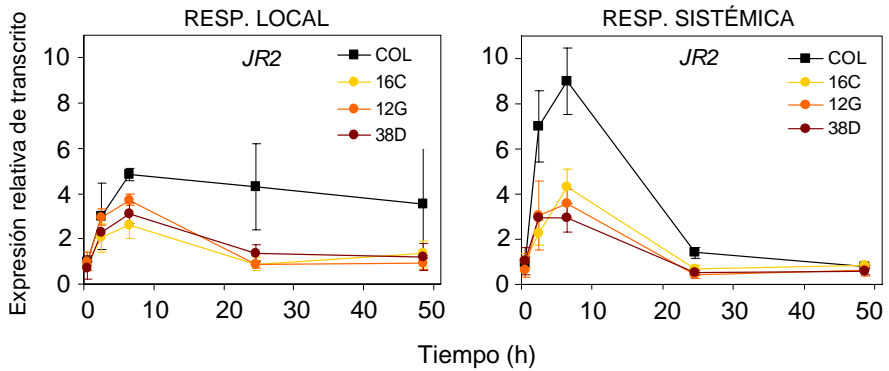
Para analizar si una reducción de la función del gen *KAT2* era capaz de disminuir las respuestas a herida dependientes de JA, lo que indicaría la posible participación de KAT2 en la biosíntesis de esta hormona en respuesta a herida, se utilizaron las plantas transgénicas *KAT2as* que presentan una expresión reducida del gen. El análisis de la respuesta a la herida local y sistémica en plantas de *Arabidopsis* silvestres Col y de tres líneas transgénicas independientes homocigotas *KAT2as*, reveló una relación directa entre la disminución en los niveles de transcrito de *KAT2* y la activación defectiva por la herida del gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA. Como se observa en el análisis Northern blot de la figura 17.A.1, en las líneas transgénicas *KAT2as*, donde el nivel de transcrito endógeno del gen *KAT2* tanto basal como inducido por la herida estaba reducido en más del 90%, el gen *JR2* presentó una fuerte disminución en los niveles de expresión inducidos por la herida respecto a los del silvestre Col. En concreto, en los tiempos de máxima inducción, la expresión inducida por herida del gen *JR2* en las líneas

transgénicas *KAT2as* fue entre un 60-80 % menor tanto a nivel local como a nivel sistémico (figura 17.A.2).

A.1



A.2



B

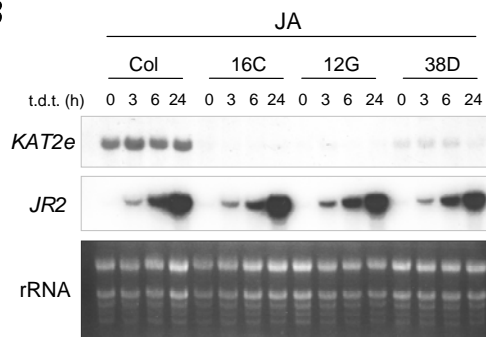


Figura 17. Nivel de expresión del gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA, en Col y líneas transgénicas *KAT2as* heridas y en respuesta a la aplicación exógena de JA.

Las líneas 16C, 12G y 38D corresponden a tres líneas transgénicas homocigotas independientes *KAT2as*. La expresión de los genes se analizó por Northern blot utilizando marcaje radiactivo con sondas específicas. La sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y por tanto solo hibrida con el transcrito endógeno. La sonda *KAT2e+t* corresponde al fragmento del transgén y por tanto hibrida con el transcrito endógeno y con el transgén. Altos niveles de expresión del transgén correlacionan con reducción en el nivel de transcrito endógeno de *KAT2* tanto basal como inducido por la herida. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **A.** La mitad de las hojas de la roseta de plantas adultas cultivadas en tierra durante tres semanas en fotoperiodo de DL se dañaron mediante pinzas estriadas. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de producirse la herida (t.d.h.) tanto de hojas heridas (L) como de hojas no dañadas (S) de la roseta. **(1)** Análisis Northern blot. **(2)** Los valores de las gráficas representan los niveles relativos de transcrito del gen *JR2* cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes. **B.** Plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) se trataron con JA 250 μ M y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.).

Este resultado sugería la participación del gen *KAT2* en la biosíntesis de JA ya que plantas con una menor expresión del gen mostraban una disminución en la activación del gen *JR2* en respuesta a herida. Para corroborar que realmente la menor expresión del gen *KAT2* afectaba a la síntesis de JA y no a la percepción de éste por las plantas, se analizó la expresión del gen *JR2* en plántulas tratadas exógenamente con JA en Col y en las líneas transgénicas *KAT2as*. En el análisis Northern blot realizado se observa que las líneas transgénicas *KAT2as* responden perfectamente a la aplicación exógena de JA ya que la expresión inducida del gen *JR2* fue similar a la observada en Col (figura 17.B). Este resultado demostraba que la menor expresión del gen *KAT2* no afectaba ni a la percepción del JA ni a la activación de señales que se encuentran por debajo del mismo y que activan la expresión de genes como *JR2*. Este hecho indicaba de nuevo que la pérdida de expresión del gen *JR2* en respuesta a la herida en las plantas *KAT2as* era presumiblemente debido a un defecto en la biosíntesis de JA.

4.2.1.2. Niveles de JAs endógenos en condiciones basales e inducidas por la herida en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

Finalmente, se comprobó si la menor acumulación de transcrito del gen *JR2* en las plantas *KAT2as* heridas, iba acompañada de una menor producción de JA. La medida de JAs se realizó en el laboratorio del Dr. Jean-Pierre Métraux (Universidad de Friburgo, Suiza) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, analizando los niveles de JAs basales y a los 90 minutos tras la herida, ya que en ese tiempo se produce la máxima acumulación de JA en *Arabidopsis* (Reymond et al., 2000; Stenzel et al., 2003a). Los experimentos realizados mostraron una menor acumulación de los niveles de JAs en respuesta a la herida en las plantas transgénicas *KAT2as* respecto a plantas silvestres Col, observándose una reducción de un 65 y un 80 % en los experimentos 1 y 2 respectivamente (figura 18). Estos resultados revelaban una función clave del gen *KAT2* en la biosíntesis de JA que se produce en respuesta a la herida en *Arabidopsis*. Por el contrario, a nivel basal no se observaron diferencias significativas en la cantidad de JAs detectada (figura 18).

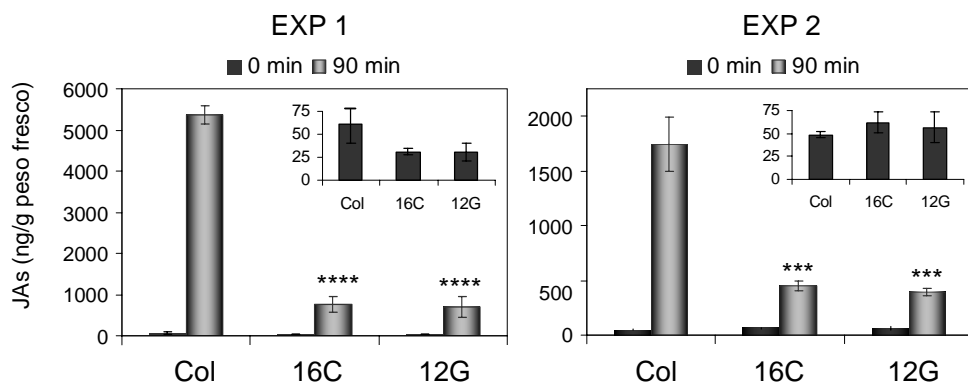


Figura 18. Niveles de JAs endógenos en condiciones basales e inducidas por la herida en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as*.

Las líneas 16C y 12G corresponden a dos líneas transgénicas homocigotas independientes *KAT2as*. Hojas de roseta de plantas adultas cultivadas en tierra durante un mes en fotoperiodo de DL se dañaron mediante pinzas estriadas. Las muestras se recogieron a los 0 y 90 minutos después de producirse la herida. El contenido en JA se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Insertados en el margen superior derecho se muestran los valores obtenidos para el tiempo 0 (basal). Las barras representan la media \pm EE de 4 réplicas en el experimento 1 y de 6 réplicas para el experimento 2. *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ según análisis t-test de cada línea respecto a Col.

4.2.1.3. Respuesta a la herida activada por la vía independiente de JA en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

Una vez determinada la función del gen *KAT2* en la síntesis de JA, se quiso comprobar si la menor expresión de *KAT2* alteraba la expresión de otros genes implicados en la respuesta a la herida. Se analizó la expresión del gen *WR3* cuya activación en la herida ocurre a nivel local por la vía independiente de JA (Titarenko et al., 1997; León et al., 1998), y la del gen *ACX1* (At4g16760), que interviene en el primer paso de la β -oxidación y se induce en respuesta a la herida tanto por la vía independiente como por la vía dependiente de JA (Castillo et al., 2004). Como se muestra en el análisis Northern blot de la figura 19, la activación en respuesta a la herida tanto local como sistémica para ambos genes fue similar en las líneas transgénicas *KAT2as* y en el ecotipo silvestre Col. Estos resultados sugerían que la reducción en la expresión del gen *KAT2* afectaba únicamente a las respuestas activadas en herida dependientes de la señalización por JA, pero mantenía intacta la activación de genes que se inducen por otras vías de señalización distintas al JA. En el caso del gen *ACX1*, cuya expresión se activa en respuesta a la herida parcialmente por la vía dependiente de JA, la menor expresión de *KAT2* sólo afectaba a la acumulación sistémica del transcrito, que es donde prioritariamente actúa la vía dependiente de JA en la activación de este gen (figura 19), denotando de nuevo que la falta de *KAT2* afectaba específicamente a esta vía.

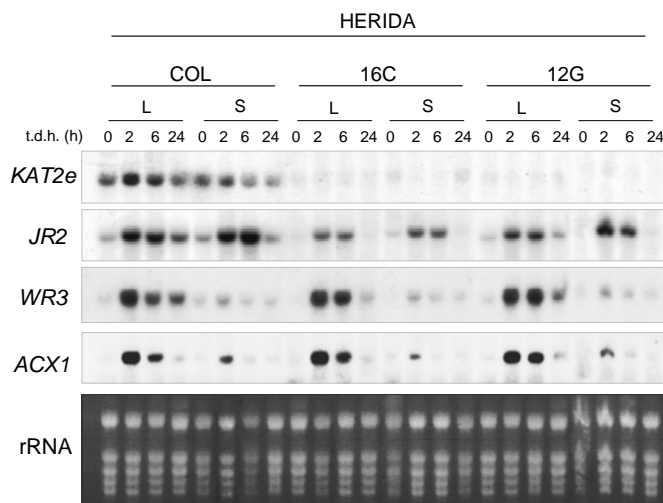


Figura 19. Nivel de expresión de los genes inducibles por herida *WR3* y *ACXI* en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as* heridas.

La mitad de las hojas de la roseta de plantas adultas cultivadas en tierra durante tres semanas y en fotoperiodo de DL se dañaron mediante pinzas estriadas. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de producirse la herida (t.d.h.) tanto de hojas heridas (L) como de hojas de la roseta no dañadas (S). Las líneas 16C y 12G corresponden a dos líneas transgénicas homocigotas independientes *KAT2as*. Se realizó análisis Northern blot con sondas radiactivas específicas. La sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y por tanto solo hibrida con el transcrito endógeno. Se incluye la hibridación con las sondas correspondientes a los genes marcadores de las respuestas a herida, dependientes e independientes de JA, *JR2* y *WR3* así como la hibridación con la sonda del gen *ACXI*, implicado en β -oxidación e inducible por herida. Se muestra la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga.

4.2.1.4. Respuesta a la herida activada por la vía dependiente de JA en plantas transgénicas con niveles aumentados de *KAT2*.

En respuesta a la herida se produce la activación transcripcional de los genes implicados en la biosíntesis de JA (revisado por Creelman y Mullet, 1997a; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002; Schaller et al., 2005; Delker et al., 2006; Liechti y Farmer, 2006; Wasternack, 2007). No obstante, se ha propuesto que los niveles basales de expresión de los genes de biosíntesis de JA pueden ser suficientes para producir una cantidad de JA inicial en respuesta a la herida y que posteriormente, por un mecanismo de retroalimentación positiva, el JA promueva su propia síntesis por activación de sus genes de biosíntesis (Ryan, 2000; Sasaki et al., 2001; Ziegler et al., 2001; Stenzel et al., 2003a; 2003b; Delker et al., 2006; Wasternack, 2007). Sin embargo, *KAT2* no activa su expresión al aplicar exógenamente JA a diferencia de los otros genes de la ruta de biosíntesis, sugiriendo que *KAT2* podría representar un punto de regulación en la síntesis de la hormona independiente al mecanismo de retroalimentación positiva. En este sentido, con el propósito de comprobar si *KAT2* estaba ejerciendo un papel limitante en la síntesis de JA, se comprobó si la sobreexpresión del gen daba lugar a una mayor producción de JA, lo que correlacionaría con altos niveles de expresión del gen *JR2*. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron plantas transgénicas en las cuales se sobreexpresó el transcrito de *KAT2* en orientación sentido en una proporción mayor a cien veces el nivel basal en plantas silvestres (los niveles de transcrito medidos por análisis de RT-PCR cuantitativa se muestran en la figura 22). La generación y caracterización de las líneas transgénicas homocigotas

35S::KAT2 está descrita en el apartado de Materiales y Métodos. El análisis de la respuesta a la herida local y sistémica en las plantas transgénicas *35S::KAT2*, desveló que la sobreexpresión del gen *KAT2* no conllevaba un aumento de expresión del gen *JR2* ni a nivel basal ni inducido por la herida (figura 20) sugiriendo que, niveles altos de expresión de *KAT2* no daban lugar a un aumento en el nivel de JA basal e inducido.

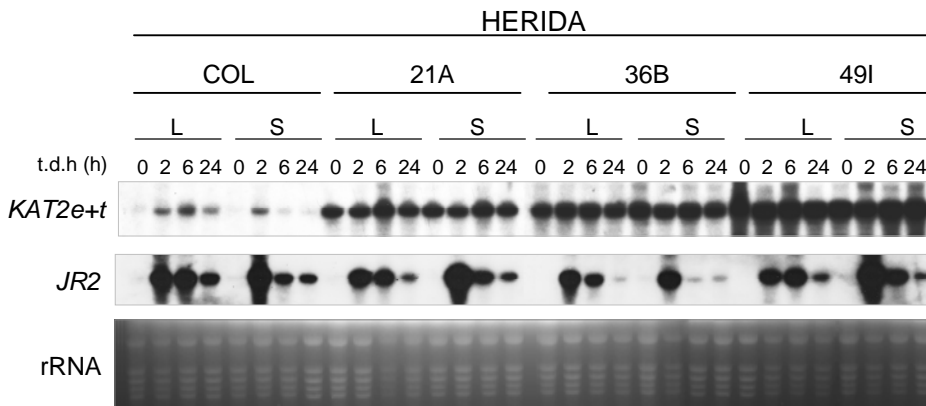


Figura 20. Nivel de expresión del gen *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA, en plantas Col y líneas transgénicas *35S::KAT2* heridas.

La mitad de las hojas de la roseta de plantas adultas cultivadas en tierra durante tres semanas y en fotoperiodo de DL se dañaron mediante pinzas estriadas. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de producirse la herida (t.d.h.) tanto de hojas heridas (L) como de hojas no dañadas de la roseta (S). Las líneas 21A, 36B y 49I corresponden a las tres líneas transgénicas homocigotas independientes *35S::KAT2* seleccionadas. La expresión de los genes se analizó mediante Northern blot empleando sondas específicas marcadas radiactivamente. Se incluye la hibridación con la sonda *KAT2e+t* que corresponde al fragmento del transgén y por tanto hibrida con el transcrito endógeno y con el transgén y la hibridación del gen *JR2*, marcador de la respuesta a herida dependiente de JA. La tinción del rRNA con bromuro de etidio se añade como control de carga.

4.2.1.5. Análisis transcriptómico de la respuesta a herida en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

Hasta ahora, el estudio de las alteraciones que produce la deficiencia de *KAT2* en las respuestas a herida se había realizado mediante el análisis de la expresión de algunos genes marcadores de este factor de estrés. Ya que este enfoque es limitado, se llevó a cabo un análisis transcriptómico en el cual se compararon los niveles de expresión en plantas silvestres Col y en plantas transgénicas *KAT2as*, tanto en condiciones basales como

inducidas por la herida. El propósito de esta aproximación genómica era un análisis global de los efectos que produce una expresión reducida de *KAT2* en el contexto global de la planta. En este caso se eligió la línea transgénica *KAT2as* 16C, que presentaba una reducción de más del 90% del transcrito de *KAT2* tanto en condiciones basales como inducidas por la herida y que, como ya se ha comentado, mostraba una menor expresión del gen *JR2* asociada a una menor síntesis de JA en respuesta a herida. En el análisis transcriptómico se compararon tres muestras biológicas independientes de hojas (5-6 plántulas por muestra), a tiempo 0 y a las 6 horas tras la herida ya que es el tiempo donde se produce un máximo de inducción de *KAT2* por este estrés. En primer lugar se comprobó mediante análisis Northern blot la expresión de los genes *KAT2* y *JR2* en las mismas réplicas con las que se realizó el análisis transcriptómico con el fin de validar las muestras utilizadas. Como se observa en la figura 21, en las muestras correspondientes al ecotipo Col se obtuvieron niveles inducidos de *KAT2* y de *JR2* en respuesta a la herida, y en las muestras correspondientes a la línea transgénica *KAT2as* 16C se observó una reducción drástica de la expresión de *KAT2* tanto a nivel basal como inducido, lo que correlacionaba con una clara disminución del nivel de expresión de *JR2* en respuesta a la herida en estas líneas, sobretodo en las réplicas 1 y 3 donde la expresión de ambos genes fue prácticamente indetectable por Northern blot en la línea transgénica.

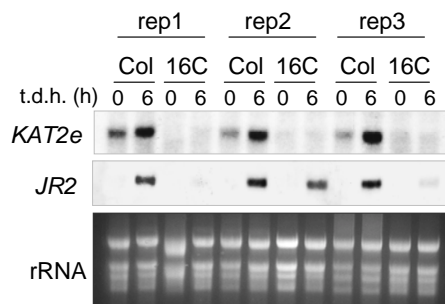


Figura 21. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *JR2* en las réplicas del análisis de micromatrices en plántulas Col y en la línea transgénica *KAT2as* 16C herida.

Las hojas de plántulas de 12 días se dañaron mediante pinzas estriadas. Las muestras se recogieron a las 6 horas después de producirse la herida (t.d.h.). La expresión de los genes se analizó mediante Northern blot con sondas radiactivas específicas. La sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y por tanto solo hibrida con el transcrito endógeno. Se incluye la hibridación con la sonda correspondiente al gen *JR2*, marcador de la respuesta a herida dependiente de JA y la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga.

El análisis genómico se realizó con micromatrices de oligonucleótidos de 70mer de Operon Arabidopsis Genome Oligo Set Version 1.0 (Qiagen) impresos en la Universidad de Arizona (www.ag.arizona.edu/microarray), que contenían 26.101 elementos que representaban 23.668 loci no redundantes del genoma de *Arabidopsis*. La hibridación, detección y tratamiento de las imágenes se llevó a cabo como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Tras la cuantificación y normalización de los datos, se eliminaron aquellos spots con una intensidad de la señal menor de 200. Posteriormente, el tratamiento estadístico de los datos realizado con el programa Acuity 4.0 reveló que una de las réplicas presentaba de forma generalizada una varianza claramente distinta al resto de las réplicas y fue eliminada del análisis. Por otro lado, el rango de los valores de intensidad obtenidos en cada análisis fue muy estrecho presentando el \log_2 del ratio de expresión valores absolutos máximos de 1,2 (equivalente a inducciones o represiones con un valor máximo de 2,3 veces), por lo que se seleccionaron aquellos genes que presentaron un ratio de expresión en \log_2 mayor o igual que 0,4 para los genes inducidos y menor o igual que -0,4 para los genes reprimidos. A pesar de estas limitaciones, los análisis estadísticos realizados conjuntamente con las 4 muestras restantes (0 h rep.1; 0 h rep.2; 6 h rep.1; 6 h rep.2), permitieron seleccionar 69 genes expresados diferencialmente con un p-valor inferior a 0,05, de los cuales, 60 presentaban valores de expresión reprimida en las plantas *KAT2as* (tabla I). Debido a que el origen de las réplicas eran muestras tanto control como herida, los genes seleccionados representaban únicamente aquellos genes cuya expresión estaba significativamente inducida o reprimida en las plantas *KAT2as* independientemente de la situación. Por tanto, la relación de genes que estaban diferencialmente expresados en una de las condiciones (control o herida) no pudo ser obtenida en este análisis transcriptómico. En este sentido, el análisis conjunto de las réplicas que representaban una misma condición, reveló un gran número de genes cuya expresión variaba diferencialmente en ambas réplicas. Entre éstos se encontraba el gen *JR2* que mostró una expresión reprimida en las plantas *KAT2as* en todas las réplicas de herida (\log_2 -0,43 y -0,8), manteniendo niveles invariables en las muestras control (datos no mostrados), análogo a los resultados obtenidos anteriormente en los análisis Northern. En la tabla I se muestran la relación de genes seleccionados en el análisis estadístico. Previsiblemente, entre los genes con expresión reprimida en las plantas *KAT2as* se encontró además de *KAT2* (At2g33150) a su homólogo *KATI* (At1g04710). El análisis de las ontologías génicas realizado con FatiGO (<http://babelomics.bioinfo.cifp.es/fatigoplus/cgi-bin/fatigoplus.cgi>; Al-Shahrour et al., 2004) no mostró ninguna categoría funcional sobrerrepresentada. Sin embargo, entre los

genes con expresión reprimida se encontraron varios genes que activan su expresión por JA (At1g20510, At2g22770, At1g32640, At1g19180, At1g66280, At1g76790, At1g07780, At1g06390) (Taki et al., 2005). Entre ellos se encuentra el gen At1g20510 que codifica a una OPC:8 ligasa implicada en la biosíntesis de JA (Koo et al., 2006), el gen At1g07780 que codifica un enzima implicado en la biosíntesis de triptófano (Li et al., 1995), y el gen At2g22770 que codifica al FT tipo bHLH NAI1, implicado en la formación de estructuras derivadas del retículo endoplasmático (Matsushima et al., 2004). NAI1 regula la expresión de la β -glucosidasa PYK10 que junto con los cuerpos derivados del retículo endoplasmático se han relacionado con las respuestas de defensa frente a herida, herbívoros y patógenos (Matsushima et al., 2002, 2003a, 2003b; 2004; Sherameti et al., 2008). Un miembro de la familia de PYK10 es el gen At1g66280 (Sherameti et al., 2008) que también aparece reprimido en las plantas *KAT2as* y en el en el mutante *jai3-1/jaz3* en respuesta a JA (Chini et al., 2007). Además, entre los genes reprimidos en las plantas *KAT2as* se encuentran *MYC2* (At1g32640) y *JAZ1* (At1g19180), cuya expresión se induce por JA y codifican componentes esenciales de la señalización de JA que regulan muchas de las respuestas de la hormona (Lorenzo et al., 2004; Lorenzo y Solano, 2005; Thines et al., 2007; Chung et al., 2008). Además MYC2 también regula las respuestas a ABA (Abe et al., 2003) y entre los genes reprimidos en las plantas *KAT2as* está el gen *RD29B* (At5g52300), un marcador de las respuestas a deshidratación (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993;1994). Otros genes que aparecen reprimidos codifican proteínas con funciones relacionadas con la regulación de la transcripción (At2g27450 y At5g59150), movimiento de microtúbulos (At4g20890 y At5g19770), regulación de los niveles intracelulares de calcio (At3g20410 y At4g33050), síntesis de flavonoides (At3g19010 y At1g17020), senescencia (At2g44670 y At2g29350) y proteínas de defensa relacionadas con el reconocimiento del patógeno (At1g72900 y At1g72910). Por otro lado, además de *MYC2* (At1g32640) y *NAI1* (At2g22770), previamente comentados, se encuentran otros tres genes codificantes de FT entre los genes cuya expresión se reprime en las plantas *KAT2as*, *ANAC047* (At3g04070), At1g10585 y *IAA16* (At3g04730). Este último aumenta su expresión por auxinas (Liscum et al., 2002).

Tabla I. Relación de genes cuya expresión aumenta o disminuye en plantas *KAT2as*.

Se muestra para cada gen la anotación AGI, la descripción, el valor de inducción o represión en logaritmo en base 2 y el p-valor. Los valores mostrados en las situaciones “Control” y “Herida” representan la media de las 2 réplicas analizadas y en “Ambas situaciones” se representa la media de las 4 réplicas analizadas (independientemente de la situación) calculando el p-valor asociado.

AGI	Descripción	Control	Herida	Ambas situac	p-valor
Genes inducidos					
At4g24840	expressed protein	0,710	0,584	0,647	0,0035
At2g05360	hypothetical protein	0,497	<no data>	0,500	0,0018
At5g04310	pectate lyase family protein	0,573	0,424	0,499	0,0117
At3g13100	ABC transporter family protein (ATMRP7)	0,407	0,462	0,434	0,0003
At1g56180	expressed protein	0,616	0,251	0,433	0,0277
At3g56110	prenylated rab acceptor (PRA1) family protein	0,438	0,425	0,432	0,0000
At2g04850	auxin-responsive protein-related	0,336	0,492	0,414	0,0046
At5g18670	beta-amylase, putative (BMY3) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase	0,353	0,467	0,410	0,0055
At5g66570	oxygen-evolving enhancer protein 1-1, chloroplast (PBSO-1)	0,280	0,538	0,409	0,0145
Genes reprimidos					
At1g04710	acetyl-CoA C-acyltransferase, putative / 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT1)	-1,097	-1,003	-1,050	0,0004
At2g29350	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase (SAG13)	<no data>	-0,999	-1,013	0,0051
At4g30140	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	-1,002	-0,422	-0,712	0,0364
At1g72900	disease resistance protein (TIR-NBS class)	<no data>	-0,773	-0,699	0,0151
At5g50340	DNA repair protein-related similar to RadA	-0,666	-0,629	-0,647	0,0014
At2g33150	acetyl-CoA C-acyltransferase, putative / 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT2)	-0,519	-0,775	-0,647	0,0051
At1g07780	phosphoribosylanthranilate isomerase 1 (PA11)	-0,364	-0,899	-0,631	0,0424
At1g20070	expressed protein	-0,593	<no data>	-0,613	0,0014
At1g66280	glycosyl hydrolase family 1 protein	<no data>	-0,654	-0,598	0,0092
At1g29310	protein transport protein sec61	-0,398	-0,780	-0,589	0,0349
At5g18840	sugar transporter, putative similar to ERD6 protein	<no data>	-0,535	-0,579	0,0193
At1g60170	pre-mRNA processing ribonucleoprotein binding region (EMB1220)	-0,466	-0,682	-0,574	0,0030
At1g06390	shaggy-related protein kinase iota / ASK-iota (ASK9) (GSK1)	-0,434	-0,703	-0,569	0,0136
At4g21410	protein kinase family protein	<no data>	-0,538	-0,558	0,0029
At3g04070	no apical meristem (NAM) family protein (ANAC047)	<no data>	-0,471	-0,554	0,0426
At3g62150	multidrug resistant (MDR) ABC transporter (PGP21)	<no data>	-0,558	-0,548	0,0014
At4g12490	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,641	-0,447	-0,544	0,0142
At1g16560	Per1-like family protein	<no data>	-0,551	-0,543	0,0497
At5g26280	meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain	-0,388	-0,685	-0,537	0,0250
At4g33050	calmodulin-binding family protein (EDA39)	<no data>	-0,563	-0,536	0,0106
At4g20890	tubulin beta-9 chain (TUB9)	-0,587	-0,455	-0,521	0,0014
At3g23390	60S ribosomal protein L36a/L44 (RPL36aA)	-0,765	-0,262	-0,514	0,0470
At1g20510	4-coumarate--CoA ligase family protein (OPCL1)	-0,689	-0,330	-0,509	0,0265
At1g54270	eukaryotic translation initiation factor 4A-2 (EIF-4A-2)	-0,414	-0,600	-0,507	0,0146
At2g34040	apoptosis inhibitory 5 (API5) family protein	-0,305	-0,672	-0,488	0,0386
At1g72910	disease resistance protein (TIR-NBS class)	<no data>	-0,473	-0,488	0,0055
At5g19770	tubulin alpha-3/alpha-5 chain (TUA3)	-0,454	-0,516	-0,485	0,0089
At1g73290	serine carboxypeptidase S10 family protein (SCPL5)	<no data>	-0,468	-0,478	0,0127
At1g44750	purine permease family protein (ATPUP11)	-0,442	-0,507	-0,474	0,0036
At5g55920	nucleolar protein	-0,472	-0,474	-0,473	0,0006
At4g23170	protein kinase family protein	<no data>	-0,429	-0,472	0,0176
At3g19010	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-0,457	-0,486	-0,471	0,0086
At1g60730	aldo/keto reductase family protein	-0,283	-0,657	-0,470	0,0260
At1g76790	O-methyltransferase family 2 protein	-0,463	-0,468	-0,465	0,0288
At2g44400	DC1 domain-containing protein	-0,384	-0,536	-0,460	0,0090
At2g27450	carbon-nitrogen hydrolase family protein (NLP1)	-0,629	-0,291	-0,460	0,0486
At2g37130	peroxidase 21 (PER21) (P21) (PRXR5)	-0,500	-0,417	-0,458	0,0092
At1g53750	26S proteasome AAA-ATPase subunit (RPT1a)	-0,298	-0,602	-0,450	0,0367
At1g10585	Transcription factor; contains domain bHLH	<no data>	-0,419	-0,448	0,0129
At5g59150	Ras-related GTP-binding protein (ATRABA2d)	-0,346	-0,538	-0,442	0,0145
At3g20410	calmodulin-domain protein kinase isoform 9 (CPK9)	<no data>	-0,471	-0,437	0,0070
At3g26170	cytochrome P450 71B19 (CYP71B19)	-0,282	-0,582	-0,432	0,0159
At1g32640	basic helix-loop-helix (bHLH) protein (RAP-1/MYC2)	-0,300	-0,563	-0,431	0,0276
At4g10450	60S ribosomal protein L9 (RPL90D) ribosomal protein L9	-0,423	-0,434	-0,428	0,0013
At3g04730	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 16 (IAA16)	-0,492	-0,365	-0,428	0,0180
At2g30700	expressed protein	-0,387	-0,464	-0,425	0,0009
At5g14200	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplast	-0,455	-0,394	-0,424	0,0132
At5g41940	RabGAP/TBC domain-containing protein	-0,336	-0,513	-0,424	0,0301
At1g17020	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein (SRG1)	-0,398	-0,445	-0,421	0,0221
At5g15650	reversibly glycosylated polypeptide-2 (RGP2)	-0,457	-0,375	-0,416	0,0005
At5g44070	phytochelatin synthase 1 (PCS1/CAD1)	-0,415	-0,416	-0,415	0,0000
At2g44670	senescence-associated protein-related	-0,436	-0,390	-0,413	0,0156
At4g23710	vacuolar ATP synthase subunit G 2 (VATG2)	-0,444	-0,375	-0,410	0,0076
At3g18130	guanine nucleotide-binding family protein	-0,412	-0,403	-0,407	0,0006
At1g19180	jasmonate-ZIM-domain protein 1 (JAZ1)	<no data>	-0,436	-0,406	0,0076
At1g78860	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	-0,424	-0,385	-0,404	0,0110
At2g22770	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein (NAI1)	<no data>	-0,380	-0,404	0,0288
At1g52200	expressed protein similar to PGFS/D12	-0,398	-0,409	-0,403	0,0037
At4g33890	expressed protein	<no data>	-0,424	-0,403	0,0491
At5g52300	low-temperature-responsive 65 kD protein (LTI65/RD29B)	-0,274	-0,529	-0,401	0,0415

Los datos transcriptómicos depositados en las bases de datos indican que, excepto IAA16, el resto de FT están relacionados con las respuestas de defensa, ya que aumentan su expresión en respuesta a estrés salino, hídrico, osmótico, herida, *Pseudomonas* y *Botrytis*. Además, también aumentaron su expresión en respuesta a las hormonas reguladoras de estrés JA y ABA (*Arabidopsis* eFP Browser; <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Genevestigator). De hecho, donde se observa una mayor inducción de los 4 FT es en respuesta a herida, *Botrytis*, *Pseudomonas* y en respuesta a JA, lo que sugiere que la función de *KAT2* está relacionada con las respuestas dependientes de JA principalmente. Por otro lado, el bajo número de genes inducidos que aparecen en plantas con niveles reducidos de *KAT2* respecto al número de genes reprimidos, sugiere que la función de *KAT2* es necesaria principalmente para la activación de rutas de señalización. Curiosamente, la mayoría de estos genes no tienen una función conocida (*At4g24840*, *At2g05360*, *At1g56180* y *At3g56110*) y codifican proteínas de localización cloroplástica o de membrana (*At3g13100*, *At1g56180*, *At3g56110* y *At2g04850* y *At5g66570*). Los análisis transcriptómicos indicaron que, a diferencia de lo observado en los genes reprimidos, ninguno de los genes inducidos modifica significativamente su expresión por factores de estrés ni en respuesta a hormonas, exceptuando al gen *At3g13100* que codifica un transportador tipo ABC (*Arabidopsis* eFP Browser; Genevestigator).

4.2.2. Participación en otros procesos relacionados con JA.

4.2.2.1. Respuesta a patógenos necrotrofos en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

El gen *KAT2* participa en las respuestas activadas frente a herida y tiene una función esencial en la síntesis de JA en respuesta a este factor de estrés. El JA junto con el Et son las hormonas reguladoras clave en la defensa frente a patógenos necrotrofos (Glazebrook, 2005; Halim et al., 2006). Concretamente estas dos hormonas actúan de forma cooperativa en la activación de la expresión de genes implicados en defensa contra patógenos necrotrofos (Xu et al., 1994; Penninckx et al., 1998), y lo hacen a través de la activación de los FT *ERF1* y *ORA59* (Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008). Debido a las relaciones existentes entre las vías de señalización en respuesta a herida y patógenos necrotrofos, se analizó la posible implicación del gen *KAT2* en las respuestas activadas frente a la inoculación con *Plectosphaerella cucumerina*. Además, el análisis de la

expresión del gen *PDF1.2a* (At5g44420), marcador de las respuestas a patógenos necrotrofos dependiente de la vía de señalización JA/Et (Penninckx et al., 1998), en las plantas transgénicas con niveles disminuidos o aumentados de *KAT2* (*KAT2as* y *35S::KAT2*), permitió dilucidar un posible papel de este gen en la activación de las vías de señalización activadas por JA/Et en respuesta a patógenos necrotrofos. Los datos transcriptómicos depositados en las bases de datos indican que *KAT2* es el único gen *KAT* que aumenta su expresión en respuesta a la infección por *Botrytis cinerea*.

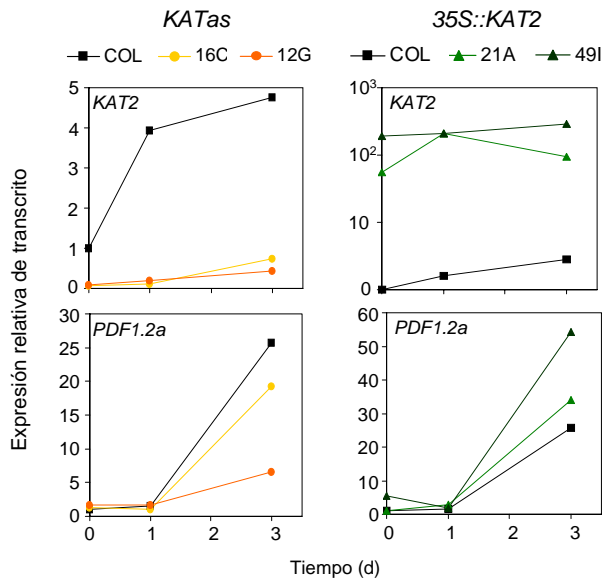


Figura 22. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *PDF1.2a*, marcador de las respuestas a patógenos necrotrofos dependiente de la vía Et/JA, en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2* infectadas con *Plectosphaerella cucumerina*.

Plantas adultas cultivadas en tierra fueron inoculadas por aspersión con una suspensión de *Plectosphaerella cucumerina* $5 \cdot 10^6$ esporas/ml suspendidas en MgSO_4 10 mM estéril. Las plantas se mantuvieron en condiciones estancas con un alto grado de humedad y se recogieron muestras en los días 1 y 3 postinfección. Las plantas transgénicas homocigotas e independientes 16C y 12G corresponden a líneas *KAT2as* y la 21A y 49I a líneas *35S::KAT2*. Se analizó la expresión de los genes por RT-PCR cuantitativa. Para cuantificar los niveles de *KAT2* en las plantas *KAT2as* se utilizaron cebadores localizados en la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y que por tanto solo amplifica el transcrito endógeno (pareja qP-KAT2-2F/ qP-KAT2-2F). En las plantas *35S::KAT2* se utilizaron cebadores localizados dentro de la ORF (pareja qP-KAT2-F/ qP-KAT2-F). Los valores se normalizaron según el contenido de *ACT2/8* determinado en las mismas muestras.

Como se muestra en la figura 22, en las plantas Col se produjo un aumento de la expresión del gen *KAT2* a partir del día 1 tras la infección con *P. cucumerina*, observándose niveles máximos de expresión a los 3 días postinfección precediendo a la inducción de *PDF1.2a*. En las líneas transgénicas *KAT2as*, la activación transcripcional de *PDF1.2a* por *P. cucumerina* fue relativamente menor que la observada en Col, y por el contrario, las plantas transgénicas *35S::KAT2* mostraron niveles de inducción de *PDF1.2a* levemente mayores que Col. Este resultado sugería una correlación entre los niveles de expresión de *KAT2* y la magnitud de la inducción del gen *PDF1.2a* en respuesta a *P. cucumerina*.

4.2.2.2. Control del crecimiento en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

Las respuestas a estrés afectan al desarrollo y el crecimiento de las plantas. Se han descrito numerosas situaciones de estrés como infección por patógenos, sequía, temperaturas extremas o irradiación alta en las que se produce un adelanto del tiempo de floración junto con un incremento en los niveles de las hormonas relacionadas como etileno, ABA, oxilipinas o SA (Raskin, 1992; Ni et al., 1996; Dempsey et al., 1999; Blée, 2002; Pastori y Foyer, 2002). El JA tiene un papel crucial como regulador negativo en algunos aspectos del desarrollo de plantas (Staswick et al., 1992; Creelman y Mullet, 1997b). En nuestro laboratorio se ha comprobado que tanto el SA como el JA se comportan como reguladores del tiempo de floración ejerciendo funciones antagonistas. El SA actúa promoviendo la floración de plantas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones estándar, y se requiere además para la floración acelerada por factores de estrés (Martínez et al., 2004). En cambio, el JA parece ejercer como un regulador negativo del desarrollo reproductivo en *Arabidopsis* dando lugar a un retraso en el tiempo de floración. Ya que las plantas transgénicas deficientes en *KAT2* tenían niveles de JA muy reducidos en respuesta a herida y posiblemente, en respuesta a otros factores de estrés relacionados con JA, se analizó si estas plantas presentaban además cambios en el tiempo de floración. En *Arabidopsis*, existe una buena correlación entre el número de días hasta la producción de la primera flor y el número de hojas producidas (Koornneef et al., 1991), siendo por tanto la forma más común de medir el tiempo de floración el conteo de las hojas totales (de roseta más caulinares). En este caso, se analizó el tiempo de floración en condiciones de día corto (DC), que son

condiciones no inductivas de la floración, para amplificar las posibles diferencias existentes. Como se observa en la figura 23, el número de hojas totales hasta la aparición de la primera flor fue significativamente menor en las líneas *KAT2as* (20-25 hojas) con respecto a Col (37 hojas), indicando que la menor expresión de *KAT2* producía un adelanto de la floración. Para validar los resultados obtenidos se analizó el plastocrono o tiempo necesario para la formación de una nueva hoja (ver apartado 9 de Materiales y Métodos). Diferencias significativas en este índice indicarían alteraciones en la tasa de crecimiento vegetativo y, por tanto, invalidaría las comparaciones entre genotipos basadas en el conteo de hojas. En este sentido, tanto las líneas transgénicas como Col mostraron un valor de plastocrono entre 1,5 y 1,7, sugiriendo que las diferencia observadas en las líneas *KAT2as* estaban asociadas a eventos relacionados con la transición floral y no con el desarrollo vegetativo de las plantas. Como hemos descrito anteriormente, uno de los factores causantes del adelanto de la floración en las líneas *KAT2as* podría ser la menor síntesis de JA en estas plantas.

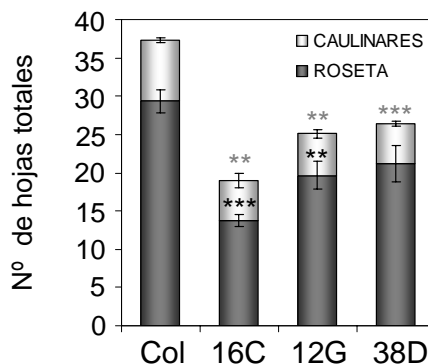


Figura 23. Medida del tiempo de floración en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as* cultivadas en condiciones de DC.

Las plantas fueron cultivadas en condiciones controladas con un fotoperiodo de DC. Las líneas 16C, 12G y 38D corresponden a tres líneas transgénicas homocigotas independientes *KAT2as*. Se realizó el conteo del número de hojas de la roseta hasta la aparición del botón floral más el número de hojas caulinares. Cada barra de la gráfica representa la media \pm EE de 15 plantas. Se ha realizado otro experimento independiente con resultados similares. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ según análisis t-test de cada línea respecto a Col.

4.2.3. Participación en procesos de deshidratación.

Como se ha descrito en el apartado 4.1.3, la expresión del gen *KAT2* aumentó de forma progresiva al aplicar concentraciones crecientes de ABA o en situaciones de deshidratación, donde a partir de porcentajes del 15% de pérdida de agua ya se obtenían niveles inducidos de *KAT2*. Con el propósito de analizar si el gen *KAT2* tiene una función esencial en la activación de las respuestas desencadenadas por deshidratación en *Arabidopsis*, se realizaron experimentos de deshidratación forzada y natural en las plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2* o en las plantas que sobreexpresan el gen. En la figura 24.A se muestra la pérdida de peso en hojas cortadas sometidas a deshidratación a lo largo del tiempo. En este caso no se observaron diferencias entre las líneas analizadas, sugiriendo que el gen *KAT2* no interviene o regula la activación de los procesos desencadenados en respuesta a deshidratación, al menos, en hojas cortadas. Se analizó en segundo caso, las respuestas a deshidratación desencadenadas en plantas adultas sometidas a la falta de riego durante un periodo prolongado. Nuevamente, no se observaron diferencias *de visu* entre las diferentes líneas analizadas con respecto al ecotipo silvestre (figura 24.B). Por último, en plantas con un alto grado de deshidratación, donde únicamente las hojas más nuevas permanecían turgentes, se procedió a restituir el riego para analizar posibles diferencias en los procesos de rehidratación. De manera similar a los resultados anteriores, no se observaron diferencias entre las plantas transgénicas y plantas silvestres. Por tanto, todos los resultados obtenidos indicaban que a pesar de la fuerte activación transcripcional de *KAT2* en respuesta a ABA y deshidratación, la función de *KAT2* no es esencial para la activación de las respuestas de defensa frente a este factor de estrés abiótico.

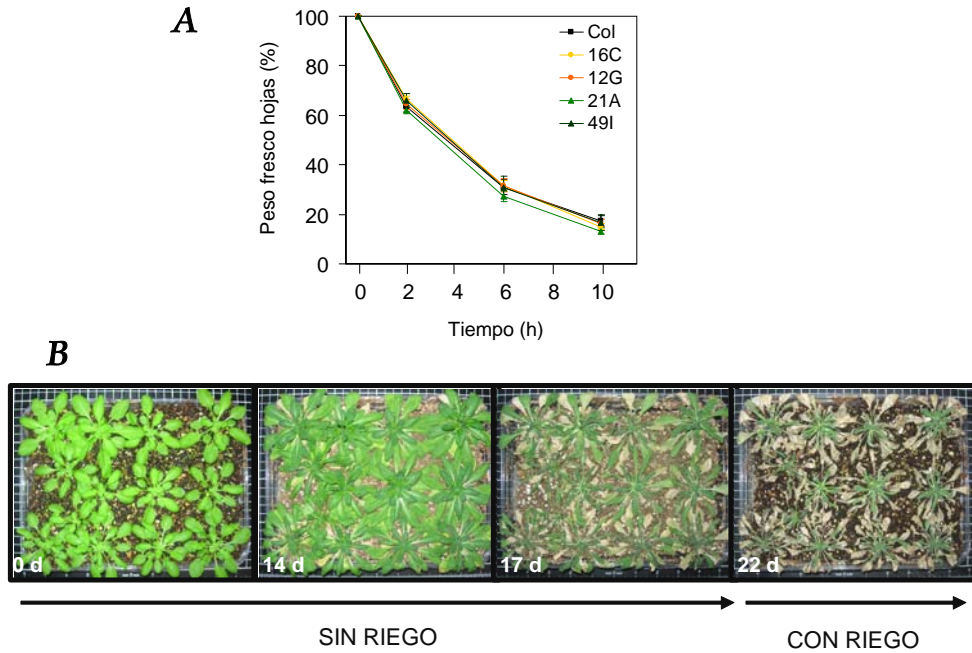


Figura 24. Análisis de la deshidratación en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2*.
A. Hojas cortadas de plantas adultas correspondientes a las líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2as* 16C y 12G o *35S::KAT2* 21A y 49I junto con el ecotipo silvestre Col se mantuvieron en condiciones controladas y se registró el peso en el momento inicial (0) y a las 2, 6 y 10 horas posteriores. Para cada hoja el peso en el tiempo 0 se consideró como el 100% y el resto de medidas se hicieron relativas al peso inicial. Cada punto de la gráfica representa la media \pm EE de 9 hojas. **B.** Plantas de las diferentes líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2as* 16C y 12G o *35S::KAT2* 21A y 49I incluida el ecotipo silvestre Col se cultivaron en tierra en condiciones de DC. Se utilizaron 8 bandejas independientes, cada una con 2-3 plantas de cada línea situadas de forma aleatoria en cada bandeja para evitar resultados sesgados por localización dentro de cada bandeja. Cuando las plantas tenían aproximadamente un mes se dejaron de regar y se tomaron las imágenes en los días indicados (14 y 17 d). En el día 18 después de retirar el riego se administró de nuevo solución de riego y se captó la imagen de las plantas en situación de rehidratación (día 22). En la figura se muestra las imágenes representativas de una bandeja.

5. Análisis molecular y funcional del gen *KAT2* en respuesta a factores de estrés que van acompañados de la síntesis de SA.

El SA ejerce un papel clave en la defensa de las plantas frente a estrés, principalmente en respuesta a la infección con patógenos biotrofos (revisado por Shah,

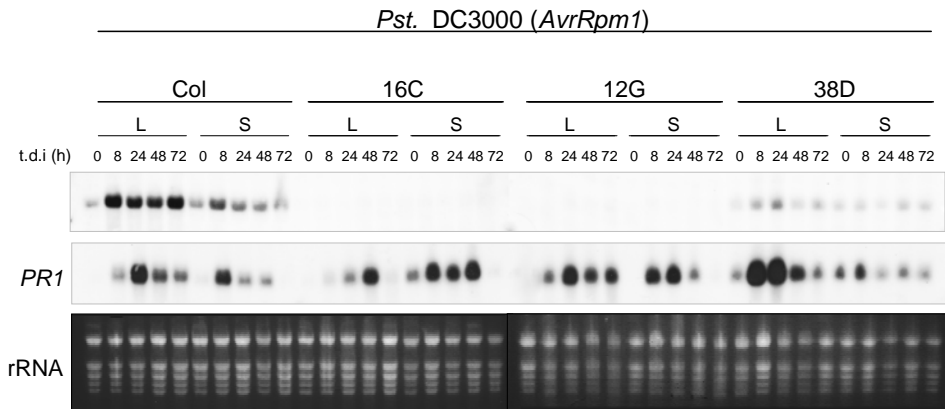
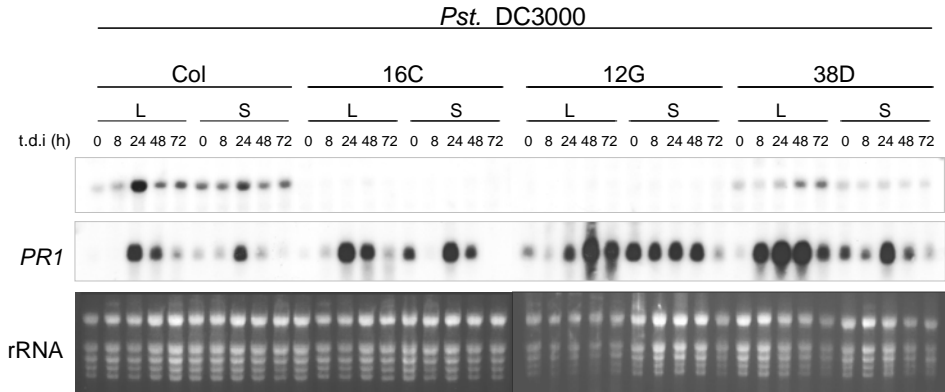
2003; Durrant y Dong, 2004; Glazebrook, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Halim et al., 2006). Además, el SA también interviene en las respuestas frente a otros factores de estrés como la irradiación con luz UV-C y la exposición a ozono (Yalpani et al., 1994; Rao y Davis, 1999; Rao et al., 2002). Como se ha comentado anteriormente, las interacciones entre las vías de señalización mediadas por el JA y el SA permiten organizar y jerarquizar las respuestas que la planta activa frente a estrés y desarrollo, siendo éstas principalmente de carácter antagonista (revisado por Reymond y Farmer 1998; Kunkel y Brooks, 2002; Turner et al., 2002; Farmer et al., 2003; Glazebrook et al., 2003; Rojo et al., 2003; Devoto y Turner 2003; Beckers y Spoel, 2006). Uno de los posibles puntos de regulación entre ambas vías de señalización a nivel de la síntesis de ambas hormonas podría ser la β -oxidación. Esta presunción se basa en la existencia de una vía de síntesis de SA descrita en solanáceas, que requiere reacciones de β -oxidación (Raskin, 1992; Ribnicky et al., 1998; Jarvis et al., 2000; Hertweck et al., 2001; Garcion y Métraux, 2006) y que podría estar activa en *Arabidopsis*. Con el propósito de discernir la posible participación de la β -oxidación, y más concretamente del gen *KAT2* en las respuestas activadas por factores de estrés que conllevan la síntesis de SA, se analizó la expresión del gen y de *PRI* en plantas infectadas con *Pseudomonas syringae* o irradiadas con luz UV-C. El gen *PRI* se utiliza ampliamente como marcador de las respuestas activadas por estrés dependientes de SA, ya que se expresa únicamente por la síntesis y acumulación de SA producida durante la activación de resistencia a patógenos (Ryals et al., 1996) y en respuesta a luz UV o exposición a ozono (Yalpani et al., 1994; Sharma et al., 1996). El análisis de la expresión en plantas transgénicas *KAT2as* permitió comprobar la posible participación de *KAT2* en la biosíntesis de SA en respuesta a estrés.

5.1. Expresión del gen *KAT2* en respuesta a *Pseudomonas syringae* y posibles alteraciones en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

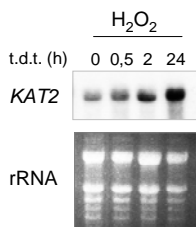
Para llevar a cabo este análisis se utilizó el patógeno biotrofo *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 tanto en un contexto de interacción compatible (IC) como de interacción incompatible (II) donde la cepa lleva el plásmido de avirulencia *avrRpm1*. En ambos casos, se analizó la respuesta originada en las hojas infiltradas (respuesta local) como la respuesta en las hojas adyacentes (respuesta sistémica) hasta las 72 horas

posteriores a la infección. Como se muestra en los análisis Northern blot de la figura 25.A, la expresión del gen *KAT2* aumentó en respuesta a la infección con *P. syringae* con una cinética de inducción distinta según el tipo de cepa utilizada. Concretamente, la cepa virulenta *Pst.* DC3000 desencadenó la activación transcripcional de *KAT2* llegando al máximo de expresión a las 24 horas, similar al patrón observado para el marcador patogénico *PRI* tanto en las hojas infiltradas como en las hojas adyacentes no inoculadas. Se ha descrito que la defensa dependiente de genes R (II) es más rápida en el tiempo y más intensa en la inducción de genes (Tao et al., 2003). Concordantemente, la expresión de *KAT2* en respuesta a la cepa avirulenta DC3000 *avrRpm1* (II) fue más rápida y más intensa que la observada durante la IC, observándose en este caso el máximo de expresión a partir de las 8 horas y manteniendo niveles inducidos hasta las 72 horas postinfección. Estos resultados indican que *KAT2* es un gen inducible por patógenos biotrofos con un patrón de inducción similar al mostrado por genes típicos de defensa frente a patógenos (Ward et al., 1991; Lawton et al., 1996), en los cuales la activación es más rápida e intensa en respuesta a un patógeno avirulento y precede a la activación de *PRI*, similar al patrón observado en *KAT2*. Sin embargo, el gen *KAT2* no altera su expresión en respuesta a la aplicación de SA (figura 14 y 25.C), y por lo tanto, otra molécula señalizadora debe estar implicada en la activación transcripcional de este gen. El H_2O_2 y otras ROS incrementan sus niveles endógenos en respuesta a una gran variedad de factores de estrés bióticos y abióticos, principalmente en infección con patógenos (Apel et al., 2004; Torres y Dangl, 2005; Torres et al., 2007). Aunque las ROS se producen en respuesta a todo tipo de patógenos, es en presencia de patógenos avirulentos cuando tiene lugar una producción masiva de ROS que es mantenida en el tiempo (Torres et al., 2005). De hecho, durante la II, el H_2O_2 se ha descrito como un regulador de los procesos de muerte celular asociados a la HR (Lamb y Dixon, 1997; Bolwell, 1999; Mittler et al., 1999; Grant y Loake, 2000; Greenberg y Tao, 2004). Con el fin de comprobar si el H_2O_2 podría ser la molécula implicada en la activación de *KAT2* en respuesta a *P. syringae* (al menos en la II), se analizó la expresión del gen en respuesta al tratamiento exógeno con este compuesto. El análisis Northern blot realizado mostró una inducción de *KAT2* aproximadamente a partir de las 2 horas tras el tratamiento manteniendo niveles elevados hasta las 24 horas (figura 25.B). Este resultado sugiere que el H_2O_2 podría ser parte de la señalización que activa a *KAT2* en respuesta a *Pseudomonas*.

A



B



C

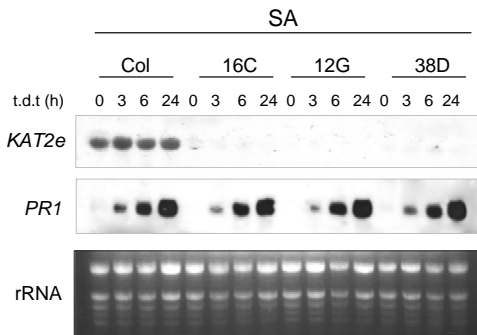


Figura 25. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *PRI*, marcador de las respuestas a patógenos biotrofos dependientes de SA, en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as* inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 y DC3000 (*avrRpm1*) o tratadas exógenamente con SA.

Nivel de expresión de *KAT2* en respuesta a H_2O_2 .

La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando sondas radiactivas específicas para cada gen. La sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y por tanto solo hibrida con el transcrito endógeno. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. Las líneas 16C, 12G y 38D corresponden a las tres líneas transgénicas homocigotas *KAT2as* seleccionadas. **A.** La mitad de las hojas de roseta de plantas adultas cultivadas en tierra durante dos meses en fotoperiodo de DC, fueron infiltradas mediante jeringa con una solución $5 \cdot 10^7$ u.f.c./ml de *Pst.* DC3000 (*avrRpm1*) y 10^4 u.f.c./ml de *Pst* DC3000. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de la inoculación (t.d.i.) tanto de hojas infiltradas (L) como de hojas adyacentes no inoculadas (S). **B-C.** Plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) se trataron con H_2O_2 5 mM (**B**) o con SA 250 μ M (**C**) y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.).

Las plantas que acumulan bajos niveles de SA en respuesta a patógenos o mutantes afectados en las vías de señalización mediadas por SA presentan una menor resistencia a patógenos virulentos y avirulentos (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Glazebrook et al., 1996; Nawrath y Métraux, 1999; Dewdney et al., 2000). El análisis de la expresión del gen *PRI* en las plantas transgénicas *KAT2as* en respuesta a *Pseudomonas* podría revelar una posible función de *KAT2* en la resistencia mediada por SA contra este patógeno. Esta función podría estar relacionada tanto con su posible papel en la síntesis de SA como con eventos de señalización y transducción de SA. Para discriminar entre ambas posibilidades, se analizó también la respuesta de las plantas *KAT2as* al tratamiento con SA. Como se observa en los análisis Northern de la figura 25.A y 25.C, la expresión inducida de *PRI* en respuesta a *Pseudomonas* tanto en un contexto de II como de IC, y en respuesta al tratamiento exógeno con SA, fue similar en Col y en las dos líneas transgénicas *KAT2as* analizadas, indicando que una expresión reducida de *KAT2* no afecta ni a la percepción del SA ni a la vía de transducción que activan la expresión de *PRI*, y que por tanto, *KAT2* no interviene en la activación de la defensa dependiente de SA. Además, estos resultados evidenciaban por primera vez que, a diferencia de la ruta de síntesis descrita en solanáceas, *KAT2* y por tanto la β -oxidación, no parecían intervenir en la biosíntesis de SA en respuesta a patógenos biotrofos en *Arabidopsis*, al menos con una participación significativa en la cantidad de SA producida.

5.2. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* en plantas transgénicas con niveles reducidos y aumentados de *KAT2*.

Se han descrito mutaciones que afectan a la resistencia frente a patógenos biotrofos que no están asociadas a una expresión constitutiva de genes *PR* (Frye y Innes, 1998; Kim y Delaney, 2002; Vogel et al., 2002). *KAT2* aumenta su expresión en respuesta a *P. syringae* pero una menor expresión del gen no varía los niveles inducidos de *PR1*. Con el propósito de indagar más en la posible función del gen *KAT2* en las respuestas contra patógenos biotrofos, analizamos la resistencia basal frente a *Pseudomonas* en las plantas transgénicas *KAT2as* y en las plantas sobreexpresoras *35S::KAT2*. Para detectar posibles diferencias entre genotipos, se analizaron tanto los síntomas de la enfermedad como el crecimiento bacteriano de *Pst.* DC3000 y de DC3000 *avrRpm1* en el día cero, concretamente una hora después de la inoculación y al tercer día postinoculación. En los análisis se incluyó el mutante *detachment9* (*dth9*) caracterizado como un mutante hipersensible a la infección con patógenos virulentos (Mayda et al., 2000). Como se muestra en la tabla II, no hubo diferencias significativas en el crecimiento bacteriano atribuibles a la deficiencia o sobreexpresión de *KAT2* tanto en la II como en la IC, ya que las variaciones puntuales observadas en alguna línea no significan cambios en términos de resistencia biológica. Frente a una cepa avirulenta, la HR produce un confinamiento del patógeno que evita su crecimiento (Abramovitch y Martin, 2004; Belkhadir et al., 2004; Nurnberger et al., 2004). Este hecho es consistente con los resultados obtenidos en plantas inoculadas con *Pst.* DC3000 *avrRpm1*, que no presentan cambios en el número de c.f.u. a lo largo del tiempo. En el caso de las cepas virulentas, se produce el crecimiento bacteriano a medida que progresan los síntomas. En las líneas transgénicas analizadas, tanto el crecimiento bacteriano como los síntomas observados a los tres días postinoculación con *Pst.* DC3000 fueron similares a Col, siendo el mutante *dth9* el que mostraba claramente los mayores síntomas de enfermedad como clorosis, lesiones en las hojas y pérdida de turgencia (datos no mostrados). Por tanto, los resultados obtenidos sugerían que *KAT2* no parecía ser necesaria para la activación y mantenimiento de la resistencia basal frente a *Pseudomonas syringae*.

Tabla II. Crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 y DC3000 *avrRpm1* en plántulas Col y líneas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2*.

Las plantas transgénicas homocigotas de *KAT2as* y *35S::KAT2* están representadas por las líneas 16C y 12G (*KAT2as*) y 21A y 49I (*35S::KAT2*). Plántulas de 14 días cultivadas en tierra en condiciones de DC fueron inoculadas por inmersión con una suspensión de *Pst.* DC3000 *avrRpm1* a $5 \cdot 10^7$ u.f.c./ml o con una suspensión de *Pst.* DC3000 a 10^4 u.f.c./ml. El recuento de las bacterias se realizó a 1 hora y a 72 horas tras la inoculación, expresándolo como el \log_{10} de las u.f.c por peso fresco (u.f.c./mg). Cada dato representa la media \pm DE de cuatro réplicas con cuatro plántulas por réplica. El experimento se repitió una vez más con resultados similares.

t.d.i. (d)	<i>Pst.</i> DC3000		<i>Pst.</i> DC3000 <i>avrRpm1</i>	
	1	72	1	72
Col	3,15 \pm 0,04	5,93 \pm 0,10	2,80 \pm 0,14	2,81 \pm 0,23
16C	3,24 \pm 0,27	5,80 \pm 0,08	2,98 \pm 0,17	2,73 \pm 0,27
12G	3,29 \pm 0,08	6,06 \pm 0,32	3,30 \pm 0,07	2,89 \pm 0,32
21A	3,18 \pm 0,30	5,40 \pm 0,17	2,80 \pm 0,09	3,48 \pm 0,17
49I	3,01 \pm 0,14	6,00 \pm 0,15	2,89 \pm 0,29	3,11 \pm 0,08
<i>dth9</i>	3,10 \pm 0,16	6,56 \pm 0,15	3,10 \pm 0,13	3,52 \pm 0,33

5.3. Expresión del gen *KAT2* en respuesta a luz UV-C y posibles alteraciones en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

Como hemos mencionado anteriormente, en la irradiación de plantas con luz UV-C se acumula SA, el cual conlleva la activación de parte de las respuestas de defensa que se activan frente a patógenos biotrofos, lo que incluye la expresión de determinados genes de defensa como *PRI* (Yalpani et al., 1994). Ya que la expresión de *KAT2* se induce fuertemente frente a patógenos biotrofos, se analizó la respuesta frente a la irradiación con UV-C. De forma similar al análisis anterior, el uso de las líneas transgénicas con expresión reducida de *KAT2* permitió analizar la posible participación de este gen en la biosíntesis de SA en respuesta a luz UV. Además se utilizaron plantas *nahG*, deficientes en la acumulación de SA, y plantas *coi1-1*, deficientes en la señalización dependiente de JA, para determinar las posibles vías de señalización implicadas en la activación de *KAT2* en respuesta a este factor de estrés.

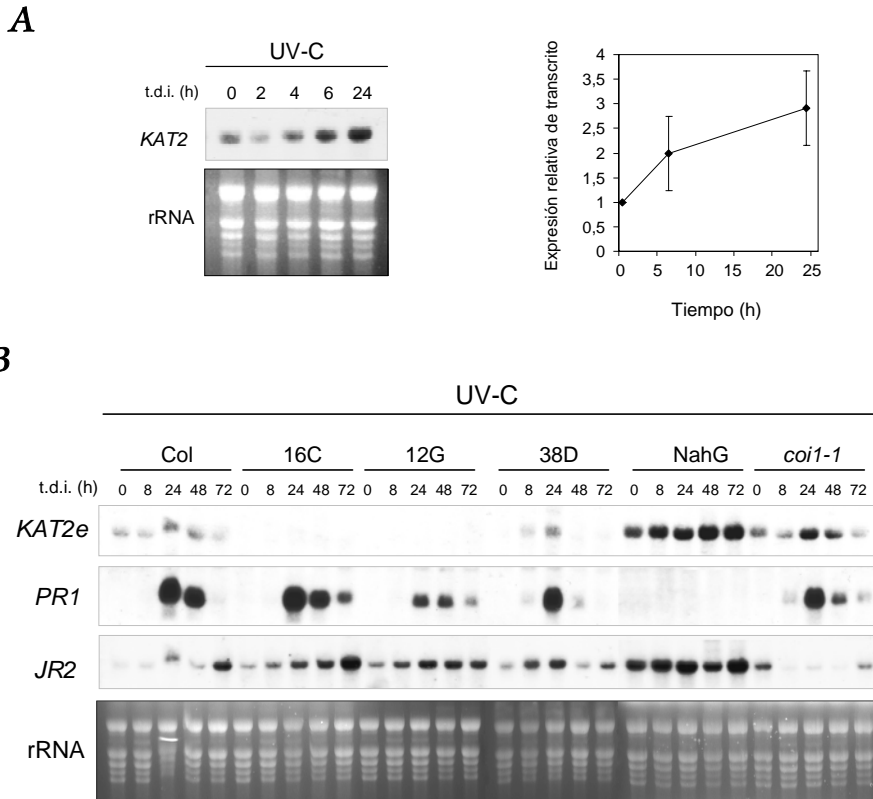


Figura 26. Nivel de expresión del gen *KAT2* y de genes marcadores de las vías de señalización activadas por JA y SA en respuesta a la irradiación con luz UV-C en líneas transgénicas *KAT2as* y en plantas deficientes en las respuestas activadas por SA (*nahG*) y JA (*coi1-1*).

Plántulas de *Arabidopsis* de 14 días fueron irradiadas con luz UV-C con una dosis de 200 mJ/cm². Las muestras se recogieron a distintos tiempos desde la irradiación (t.d.i.). La expresión de los genes se analizó por Northern blot utilizando sondas radiactivas específicas. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **A.** Nivel de expresión del gen *KAT2*. La gráfica representa los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. **B.** Nivel de expresión de los genes *KAT2*, *PR1*, marcador de las respuestas a patógenos biotrofos dependientes de SA, y *JR2*, marcador de las respuestas a herida dependientes de JA. Se analiza la expresión en plántulas Col, en las líneas transgénicas *KAT2as* (16C, 12G y 38D), en el mutante *coi1-1*, insensible a JA y en plantas *nahG*, que no acumulan SA. La sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y por tanto solo hibrida con el transcrito endógeno.

Como se muestra en la figura 26.A, la expresión de *KAT2* aumentó en respuesta a la radiación UV-C progresivamente a lo largo del tiempo analizado, observándose el máximo de expresión a las 24 horas. Además, los niveles inducidos del transcrito de *KAT2* en las plantas *coil-1* y *nahG* (figura 26.B), demostró que las vías de señalización desencadenadas por JA y SA no estaban implicadas en la activación génica de *KAT2* en respuesta a luz UV-C, concordante con la insensibilidad del gen a ambas hormonas. Por otra parte, al igual que en la infección con patógenos biotrofos, no se pudo correlacionar la deficiencia en *KAT2* con una menor expresión del gen *PR1*, ya que las plantas transgénicas *KAT2as* no mostraron diferencias significativas en la activación de este gen con respecto a Col, sugiriendo que *KAT2* no estaba implicada en la síntesis de SA producida en respuesta a UV-C ni en la señalización que media la activación del gen *PR1* en luz UV-C (figura 26.B). Por último, se analizó la expresión del gen *JR2* en respuesta a la luz UV-C, ya que se ha descrito que en este tipo de estrés también se activan genes dependientes de JA (Conconi et al., 1996b). En este sentido, se comprobó que el transcrito del gen *JR2* se acumula en respuesta a luz UV-C, observándose los niveles mayores de inducción entre las 48 h y 72 h posteriores a la irradiación (figura 26.B). De forma similar a la respuesta a la herida, la activación de *JR2* por luz UV-C fue dependiente de COI1, pero sorprendentemente, las líneas transgénicas *KAT2as*, que poseen niveles reducidos de JA en respuesta a la herida, presentaban niveles de inducción de *JR2* similares al ecotipo silvestre. Además, aunque la activación del gen *JR2* en respuesta a UV-C era independiente de SA, como se observa en las plantas *nahG*, esta hormona parece estar regulando los niveles de expresión de los genes *KAT2* y *JR2*, ya que se detectaron niveles claramente superiores en las plantas deficientes en SA, coincidentes con lo observado en la figura 12 (pág 64).

6. Análisis molecular y funcional del gen *KAT2* en senescencia.

La senescencia de las hojas es un proceso complejo regulado tanto por factores endógenos como exógenos y que implica múltiples cambios bioquímicos, fisiológicos y de expresión génica. Entre los factores endógenos, las hormonas regulan e integran los eventos que se producen a lo largo del proceso de senescencia (revisado por Guo y Gan, 2005; Lim y Nam, 2005; Hopkins et al., 2007; Lim et al., 2007), lo que implica que componentes de las vías de señalización activadas por estas hormonas en respuesta a estrés pueden tener una

función en la activación de la senescencia y otros procesos del desarrollo (Hanfrey et al., 1996; Quirino et al., 2000). Entre las hormonas que se han descrito que participan en procesos de senescencia, el JA desempeña un papel fundamental en la activación de este proceso. Las hojas senescentes tienen una mayor síntesis y acumulación de JA y requieren de la percepción de esta hormona, como demuestra la senescencia retrasada descrita en el mutante *coi1-1* (He et al., 2002). Los datos expuestos anteriormente demostraban la participación del gen *KAT2* en la biosíntesis de JA, desempeñando una función en la activación de las respuestas de defensa frente a herida y otros factores de estrés dependientes de JA. Por otro lado, los procesos de β -oxidación intervienen en las primeras fases de la senescencia para degradar los ácidos grasos de las membranas de los tejidos senescentes, obteniendo compuestos ricos en energía que serán transportados al resto de la planta (Graham y Eastmond, 2002; Hopkins et al., 2007). En este sentido, se quiso comprobar si la función de *KAT2* era necesaria para la activación de la senescencia natural e inducida por oscuridad en *Arabidopsis*.

6.1. Expresión del gen *KAT2* en senescencia.

6.1.1. Expresión de los genes *KAT* en hoja senescentes.

La inducción de *KAT2* en senescencia había sido previamente descrita (He et al., 2002) y estaba confirmada con los datos transcriptómicos de la base de datos del *Genevestigator*, que indicaba que ninguno de los otros genes *KAT* modificaba su expresión en senescencia (figura 27.A). Mediante Northern blot se analizaron los niveles de expresión de los genes *KAT2* y *KAT5* en hojas de roseta adultas no senescentes y en hojas que mostraban síntomas evidentes de senescencia. De manera similar a los resultados previos publicados, se observó un aumento de la expresión del gen *KAT2* en hojas senescentes que correlacionaba con la acumulación del gen *SAG12* y con la reducción de la expresión del gen *CAB* (figura 27.B). El gen *SAG12* (At5g45890) que codifica una cisteína proteasa y el gen *CAB* (At3g54890) que codifica una proteína de unión a clorofila a/b, se utilizan normalmente como marcadores asociados a procesos de senescencia, aumentando su expresión o disminuyéndola respectivamente (Lohman et al., 1994; Buchanan-Wollaston, 1997; Gepstein et al., 2003; Gombert et al., 2006).

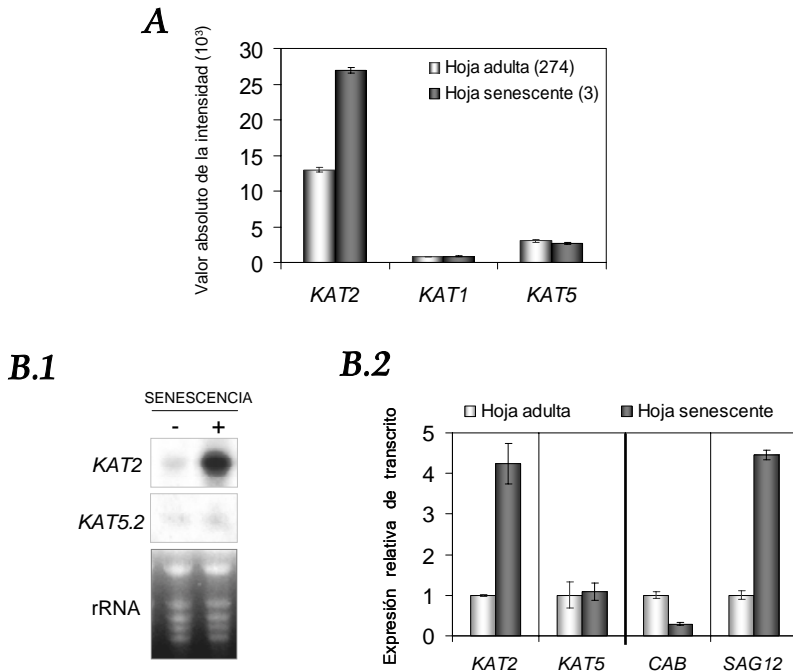


Figura 27. Nivel de expresión de los genes *KAT* en hojas senescentes de *A. thaliana*.

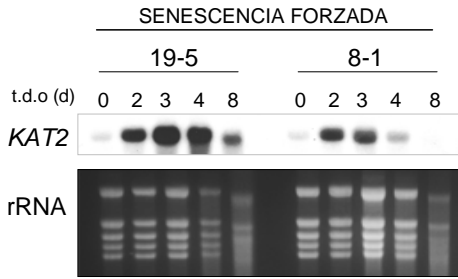
A. Representación gráfica de la media \pm EE de la señal de la intensidad absoluta de múltiples análisis de micromatrices obtenidos con la herramienta *GeneAtlas* del programa *Geneinvestigator* (<https://www.geneinvestigator.ethz.ch>; Zimmermann et al., 2004) para cada gen *KAT*. En la leyenda aparece en paréntesis junto con el tipo de hoja el número de micromatrices con los que se ha obtenido el valor medio para cada tejido. **B.** Expresión de los genes *KAT2* y *KAT5.2* en hojas de roseta Col adultas (-) y en hojas con un 30 % de superficie clorótica (+). (1). Análisis Northern blot empleando sondas radiactivas. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. (2). La gráfica muestra los niveles relativos de transcrito de *KAT2* y *KAT5.2* cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra en el análisis Northern blot. Los niveles de expresión de los genes *CAB* y *SAG12*, marcadores de los procesos de senescencia, se determinaron por RT-PCR cuantitativa normalizando los valores según el contenido de *ACT2/8* determinado en las mismas muestras. Cada barra representa la media \pm EE de tres réplicas.

6.1.2. Expresión del gen *KAT2* en hojas sometidas a senescencia forzada en oscuridad.

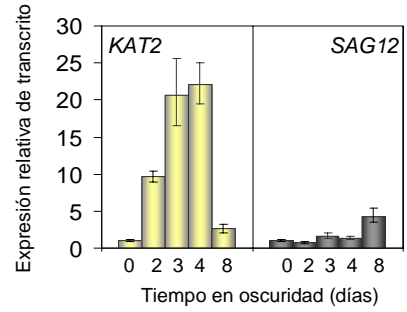
La activación transcripcional del gen *KAT2* en hojas senescentes sugeriría la participación de este gen en los procesos relacionados con la senescencia. Está descrito que diversos factores de estrés son capaces de activar los procesos de senescencia en hojas

jóvenes. Entre ellos, la incubación en la oscuridad promueve la activación de procesos de senescencia que correlacionan con niveles inducidos de genes marcadores *SAG* y síntomas de clorosis en las hojas (Weaver y Amasino, 2001). Existen contradicciones en la participación de la ruta desencadenada por JA/Et en los procesos de senescencia en oscuridad, ya que mientras un trabajo relaciona esta vía únicamente con la senescencia natural (van der Graaff et al., 2006), otro trabajo la relaciona con la senescencia natural e inducida por oscuridad (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Con el propósito de determinar la implicación del gen *KAT2* en los procesos de senescencia forzada, se analizó tanto la expresión de este gen como la actividad GUS en hojas de plantas transgénicas *KAT2::GUS* sometidas a oscuridad. Las hojas de roseta cortadas previamente se mantuvieron en oscuridad durante distintos tiempos con el fin de analizar el proceso de senescencia forzada en varios estadios. El análisis de la expresión del gen *KAT2* en dos líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2::GUS*, mostró de nuevo una fuerte inducción de la expresión de *KAT2*, con los niveles máximos de acumulación entre los días 2 y 4 (figura 28.A). Además, la acumulación del transcrito de *KAT2* se produjo antes de la aparición de los primeros síntomas que evidenciaban senescencia y previamente a la acumulación del marcador de senescencia *SAG12*, cuyo máximo de expresión se detectó en el día 8 (figura 28.A.2). Paralelamente, la tinción histoquímica con X-gluc en las hojas de plantas *KAT2::GUS* reveló una fuerte actividad GUS en el día 4, coincidiendo con el máximo de expresión del gen *KAT2* y el comienzo de los síntomas de clorosis en las hojas. En el día 8 tras la incubación en oscuridad, las hojas presentaban un evidente amarilleamiento que correlacionaba con una gran actividad GUS a pesar de la disminución en los niveles de inducción del gen *KAT2*, debido posiblemente, a la gran estabilidad de la proteína GUS (Koo et al., 2007) (figura 28.B). Comparando la expresión del gen *KAT2* en las líneas transgénicas *KAT2::GUS* seleccionadas, se observó una menor acumulación del transcrito de *KAT2* en la línea transgénica 8-1, que correlacionaba con una menor actividad GUS detectada en las hojas de esa línea transgénica. Además, la tinción histoquímica con X-gluc en las hojas de la línea 8-1 permitió relacionar directamente la expresión de *KAT2* con aquellas áreas que mostraban los síntomas típicos de la senescencia, ya que la actividad GUS dirigida por el promotor del gen *KAT2* se concentró en las zonas cloróticas únicamente (figura 28.B).

A.1



A.2



B

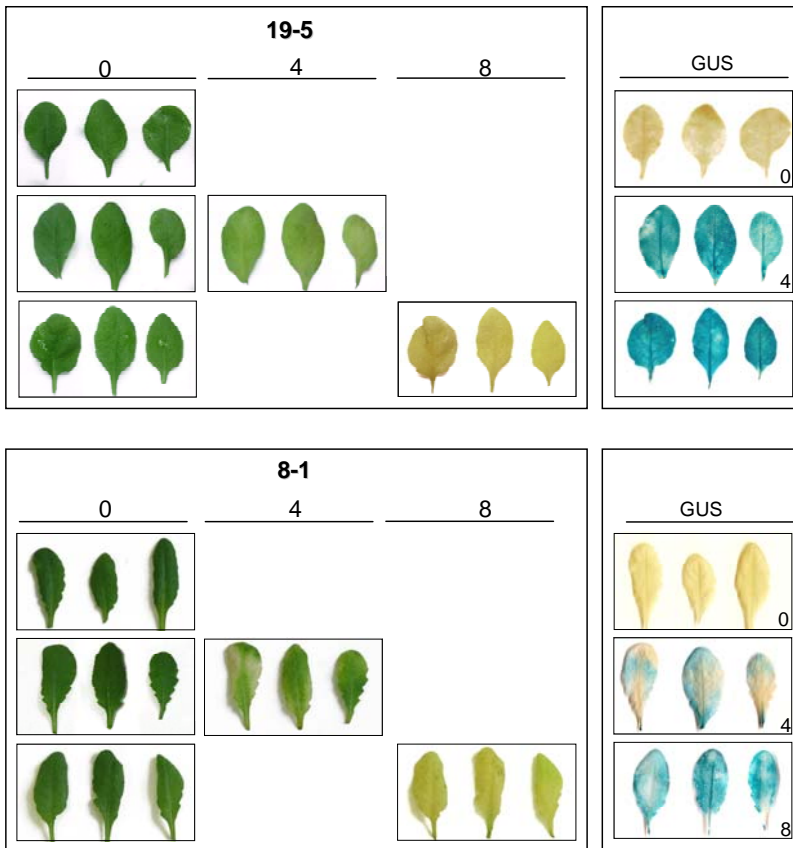


Figura 28. Patrón de expresión del gen *KAT2* en hojas sometidas a senescencia forzada por oscuridad en plantas transgénicas *KAT2::GUS*.

Hojas no senescentes de plantas adultas correspondientes a dos líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2::GUS* se colocaron sobre papel Whatman húmedo en placas Petri manteniéndolas en oscuridad. Los análisis Northern blot, RT-PCR cuantitativa y la tinción GUS se realizaron a distintos tiempos desde la colocación de las hojas en oscuridad (t.d.o). **A.** Expresión del gen *KAT2*. **(1).** Análisis Northern blot empleando una sonda radiactiva. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **(2).** Los niveles de expresión del gen *KAT2* y del gen marcador de senescencia *SAG12* se determinaron en la línea transgénica 19-5 mediante RT-PCR cuantitativa normalizando los valores según el contenido de *ACT2/8* determinado en cada muestra. Cada barra representa la media \pm EE de tres réplicas. **B.** Tinción histoquímica con X-gluc. En el panel de la izquierda se muestra para cada subgrupo la imagen de las hojas antes de la colocación en la oscuridad (0), así como la imagen del momento previo a la realización de la tinción GUS, ya sea el día 0, 4 u 8. En el panel de la derecha aparece la tinción GUS correspondiente para cada subgrupo.

6.1.3. Expresión del gen *KAT2* *in vivo* en plantas sometidas a senescencia forzada en oscuridad.

Previamente a este trabajo se había descrito que los procesos de senescencia forzada por oscuridad en hojas solo afectaban a hojas individuales y no a plantas enteras (Weaver y Amasino, 2001). Con el propósito de analizar si la expresión del gen *KAT2* era alterada en plantas enteras incubadas en oscuridad, se emplearon plantas transgénicas *KAT2::LUC* que permitían visualizar la expresión de *KAT2* *in vivo* durante el tiempo de incubación en oscuridad. Como se observa en la figura 29, los niveles de luminiscencia observados en los distintos días analizados confirmaron la inducibilidad de la expresión del gen *KAT2* en respuesta a la oscuridad. Los cambios de luminiscencia relacionados con la oscuridad eran principalmente aquellos detectados en las hojas expandidas, ya que la luminiscencia en el centro de la roseta parecía estar más relacionada con el estado vegetativo de la planta. Se observaron niveles altos de expresión desde el día 3 hasta el día 7 posterior a la colocación de las plantas en oscuridad, observándose el máximo de expresión entre los días 5 y 6. Finalmente, en el día 10 se observó una disminución en la luminiscencia emitida, indicativo de una menor expresión del gen *KAT2* cuyo nivel fue similar al observado en el día 0. Este resultado sugería que la activación de la expresión de *KAT2* estaría directamente relacionada con los procesos activados por oscuridad que finalmente producen síntomas de senescencia en hojas cortadas.

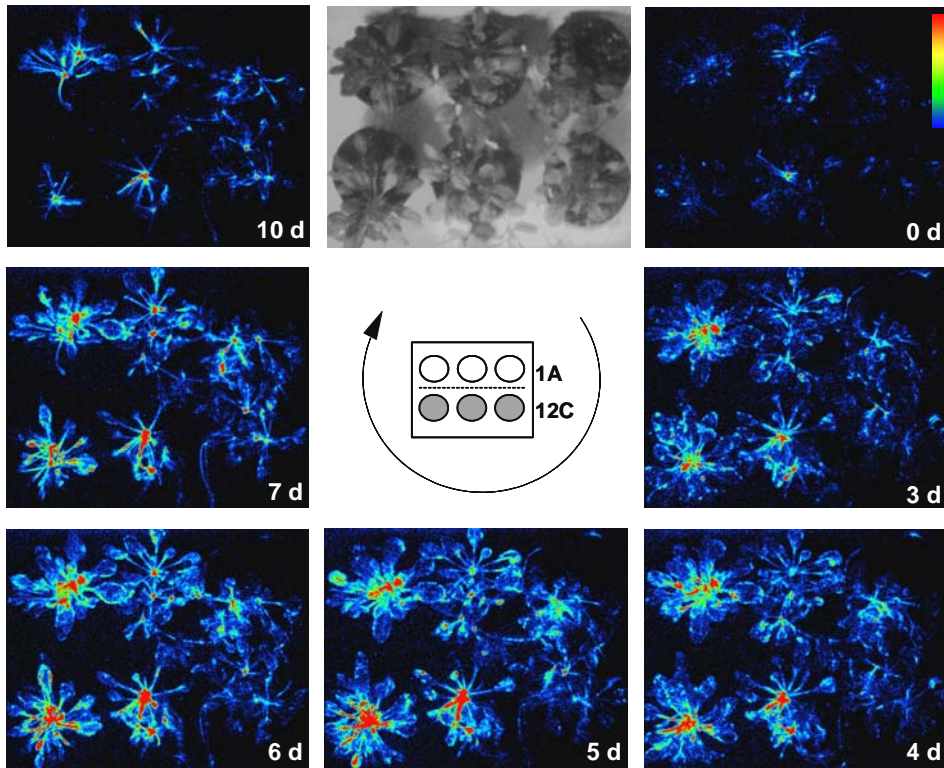


Figura 29. Nivel de luminiscencia emitido *in vivo* por plantas transgénicas *KAT2::LUC* sometidas a oscuridad.

Monitorización del nivel de luminiscencia emitido por seis plantas transgénicas *KAT2::LUC* correspondientes a dos líneas transgénicas homocigotas e independientes. Las tres plantas de la fila superior pertenecen a la línea 1A y las tres de la fila inferior a la línea 12C (mostrado en el panel central). Las plantas cultivadas durante dos meses en fotoperiodo de DC se mantuvieron en oscuridad durante 10 días con un alto grado de humedad en el ambiente. En los tiempos indicados las plantas eran pulverizadas con una disolución 0,1 mM de luciferina obteniéndose la imagen a las 4 horas tras la aplicación con una cámara para baja luminosidad Hamamatsu C2400. La imagen superior central muestra la imagen en campo claro de las plantas previa a la incubación en la oscuridad. Las imágenes correspondientes a los distintos días se muestran cronológicamente en el sentido indicado en la figura. El código de colores correlaciona con la intensidad lumínica detectada, siendo el azul el nivel más bajo y el rojo el nivel superior.

6.2. Participación de KAT2 en el proceso de senescencia.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían la participación del gen *KAT2* en los procesos de senescencia natural y forzada por oscuridad en *Arabidopsis*. Como hemos comentado, la β -oxidación es un proceso implicado en el catabolismo de lípidos durante la senescencia, y por tanto la activación de *KAT2* durante este proceso podría estar asociada con la función de *KAT2* en la degradación de estructuras lipídicas. Por otra parte, muchos de los genes implicados en la biosíntesis de JA aumentan su expresión en hojas senescentes (He et al., 2002), y podría ser su función en la biosíntesis de esta hormona la que relacionara la activación de *KAT2* con los procesos de senescencia. Con el propósito de determinar si *KAT2* está implicada en los procesos que desencadenan la senescencia, se analizaron tanto situaciones de senescencia forzada como natural en las plantas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2*.

6.2.1. Senescencia forzada en plantas transgénicas con niveles aumentados y reducidos de *KAT2*.

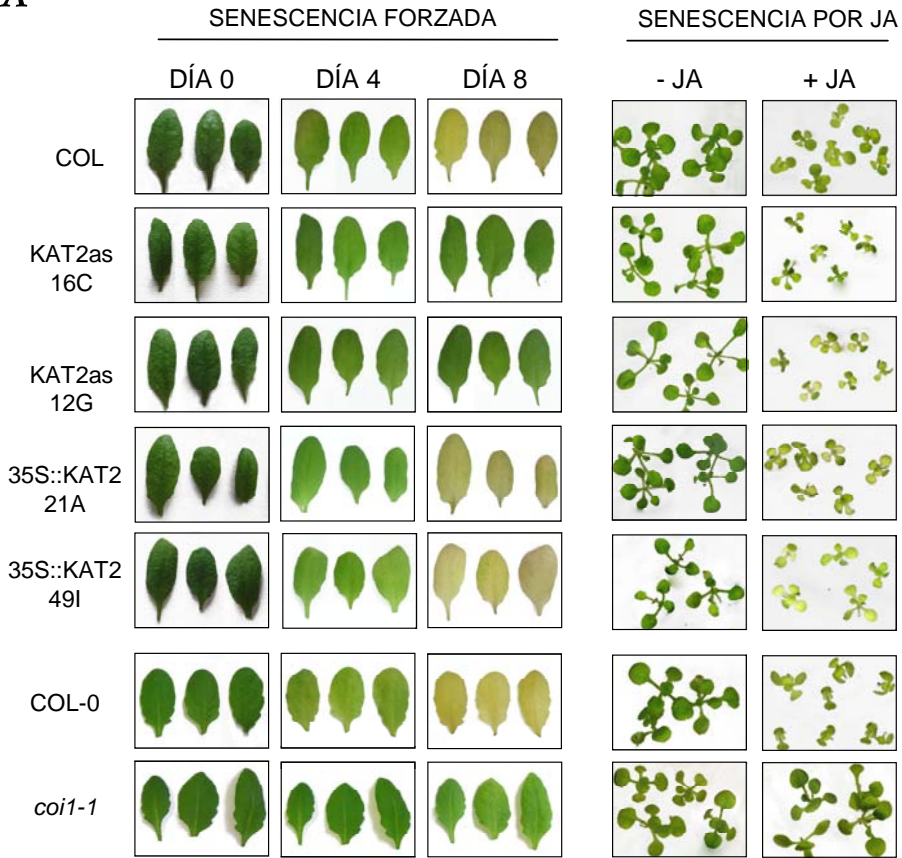
En primer lugar se analizó la función de *KAT2* en hojas cortadas sometidas a senescencia forzada por oscuridad. Para llevar a cabo este análisis, hojas de las diferentes líneas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2* fueron incubadas en oscuridad durante distintos tiempos con el fin de analizar el proceso de senescencia forzada en varios estadios. Para un análisis más cuantitativo de la senescencia, se midió el contenido en clorofilas a+b existentes en cada tiempo y línea analizada. Además, se añadió el mutante *coi1-1* que, como se ha comentado anteriormente, presenta un patrón de senescencia retrasada en comparación al ecotipo silvestre Col-0. Como se muestra en la figura 30.A, las líneas con expresión reducida de *KAT2*, deficientes en la síntesis de JA en respuesta a la herida, presentaron un patrón de senescencia distinto al resto de líneas analizadas. Aunque en el día 4 no se observaron diferencias significativas, en el día 8, correlacionando con una clorosis generalizada en las hojas de los ecotipos silvestres, las hojas de las líneas *KAT2as* presentaban un retraso de los síntomas asociados a senescencia, semejante al fenotipo observado en las hojas del mutante *coi1-1* (figura 30.A). Sin embargo, las plantas sobreexpresoras de *KAT2* (*35S::KAT2*) no mostraron diferencias significativas con los patrones de senescencia mostrados por el ecotipo silvestre Col. Las medidas de las clorofilas a+b analizadas en los días 0 y 8 corroboraron a nivel cuantitativo las diferencias observadas. Las líneas transgénicas *KAT2as* después de 8 días en oscuridad, perdieron entre

un 35 a un 40 % de su contenido en clorofila a+b, a diferencia de los ecotipos silvestres que perdieron aproximadamente el 90 % (figura 30.B). Además, la pérdida de clorofila a+b en el mutante *coi1-1* fue significativamente mayor que la observada en las líneas *KAT2as*, siendo aproximadamente del 60 % de su contenido inicial, sugiriendo que la deficiencia en *KAT2* produce un retraso mayor de la senescencia que la deficiencia en *COI1*. En un trabajo previo se había publicado que la aplicación exógena de JA era capaz de promover de forma prematura senescencia en hojas de plantas silvestres pero no en plantas *coi1-1*, sugiriendo que las rutas de señalización mediadas por JA son esenciales para promover procesos de senescencia en hojas (He et al., 2002). Para comprobar si una posible causa del retraso de la senescencia en las líneas deficientes en *KAT2* era una menor producción de JA, se analizó la senescencia inducida por JA en plántulas de las diferentes líneas analizadas. Como se muestra en el panel derecho de la figura 30.A, las plántulas cultivadas en un medio suplementado con JA mostraron un retraso en el desarrollo y signos de clorosis en todas las líneas transgénicas analizadas y en los ecotipos silvestres, a excepción del mutante *coi1-1* insensible a JA. Estos resultados indicaban que las líneas transgénicas deficientes en *KAT2* mantenían totalmente activas las respuestas desencadenadas por JA, y que por tanto, el fenotipo de senescencia retrasada en las plantas *KAT2as* podría deberse a una menor acumulación de JA en estas líneas. El patrón de senescencia observado en las líneas transgénicas *35S::KAT2* fue similar al mostrado por el ecotipo silvestre (figura 30.A y B) indicando que la sobreexpresión de *KAT2* no es suficiente para producir un cambio en los procesos de senescencia.

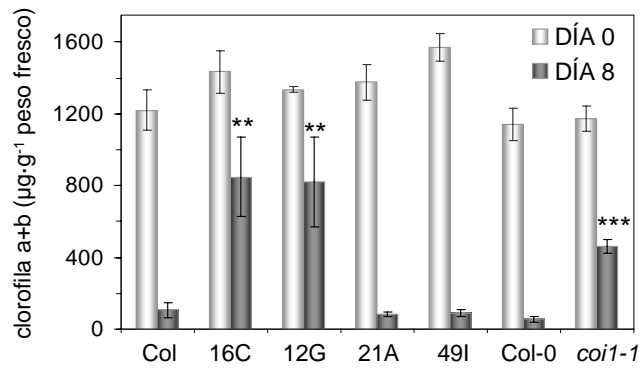
Figura 30. Senescencia forzada por oscuridad en hojas de plantas transgénicas *KAT2as*, *35S::KAT2* y en el mutante *coi1-1*.

Se analizó la senescencia en hojas cortadas de plantas adultas correspondientes a las líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2as* 16C y 12G o *35S::KAT2* 21A y 49I junto con el ecotipo silvestre Col, fondo genético de las plantas transgénicas anteriores. Se añadió en el estudio el mutante *coi1-1*, caracterizado como insensible a los procesos de senescencia mediados por JA, junto al ecotipo silvestre Col-0, fondo genético de éste. Las hojas se colocaron sobre papel Whatman húmedo en placas Petri manteniéndolas en oscuridad. Se analizó la senescencia en distintos tiempos desde la colocación de las hojas en oscuridad (0, 4 y 8 días). **A.** En la parte izquierda, se muestran imágenes representativas de las hojas de los distintos genotipos analizados en los días 0, 4 y 8. En la parte derecha, se muestran las imágenes de plántulas de 10 días de edad de los distintos genotipos analizados cultivadas en un medio MS con 1 % sacarosa (p/v) suplementado (+JA) o no (-JA) con JA 20 μ M. **B.** Medidas de la clorofila a+b referidas en μ g por gramo de peso fresco de hojas. Cada punto de la gráfica representa la media \pm DE de seis réplicas conteniendo cada una aproximadamente 100 mg de peso fresco. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ según análisis t-test de cada línea respecto a su fondo genético para un mismo tiempo. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares tanto en condiciones de fotoperiodo de DL como de DC.

A



B



6.2.2. Patrones de expresión relacionados con senescencia en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

El requerimiento de la función de *KAT2* en el desencadenamiento de la senescencia debería correlacionar con una inducción temprana del gen. Al analizar el nivel de expresión del gen *KAT2* en hojas cortadas sometidas a senescencia forzada, se detectó una rápida acumulación del transcrito en el día 1 posterior a la incubación en oscuridad, activándose la expresión del gen hasta el día 5, momento en el que el nivel de transcrito comenzó a disminuir. Por el contrario, la acumulación del gen marcador de senescencia *SAG12* no se detectó durante los primeros seis días (figura 31.A). Además, corroborando los resultados mostrados anteriormente, la acumulación de transcrito de *SAG12* en el día 8 tras la incubación en oscuridad, fue prácticamente anulada en las plantas *KAT2as* (figura 30.B). Según los datos transcriptómicos publicados en las bases de datos, la expresión de *SAG12* no está regulada por JAs, sugiriendo que la menor inducción del gen *SAG12* en las líneas transgénicas *KAT2as* no está relacionada con una menor síntesis de JA en esas líneas, sino con el fenotipo de senescencia retrasada de estas plantas.

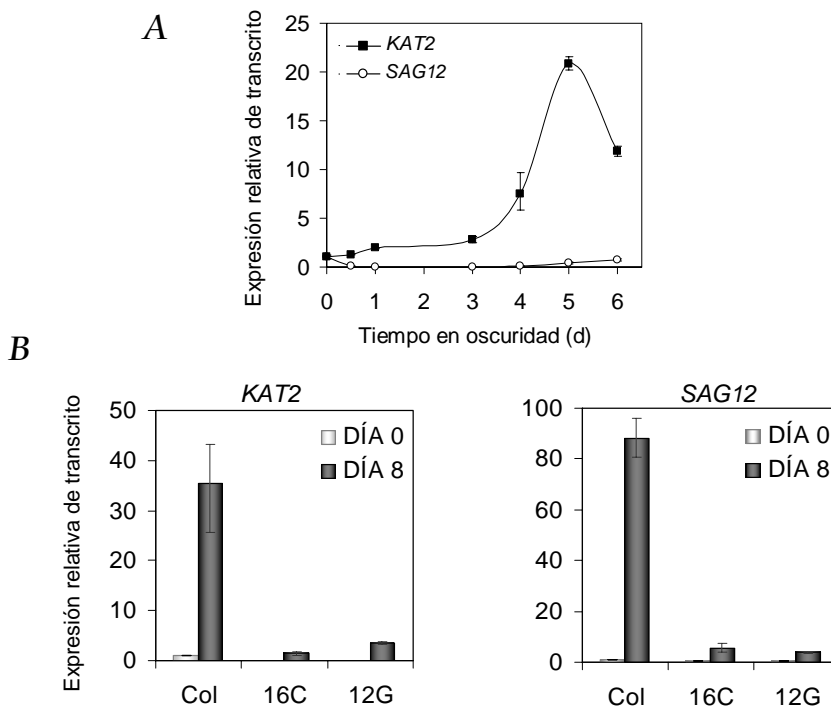


Figura 31. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *SAG12*, marcador de senescencia, en hojas cortadas sometidas a senescencia forzada por oscuridad en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as*.

Se analizó la senescencia en hojas cortadas de plantas adultas cultivadas en DC. Las hojas se colocaron sobre papel Whatman húmedo en placas Petri manteniéndolas en oscuridad. La expresión de los genes se analizó por RT-PCR cuantitativa normalizando los valores según los niveles de *ACT2/8* determinados en las mismas muestras. **A.** Cinética de la acumulación de los transcritos de los genes analizados en distintos tiempos posteriores a la incubación en oscuridad en hojas del ecotipo silvestre Col. **B.** Acumulación de los transcritos de los genes analizados en el día 0 y 8 posterior a la incubación en oscuridad en hojas correspondientes a las líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2as* 16C y 12G y en el ecotipo silvestre Col. Para cuantificar los niveles de *KAT2* en las plantas *KAT2as* se utilizaron cebadores localizados en la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y por tanto solo amplifica el transcrito endógeno (pareja qP-KAT2-2F/ qP-KAT2-2F). Se realizaron tres experimentos independientes con resultados similares.

6.2.3. Senescencia natural en plantas transgénicas con niveles reducidos de *KAT2*.

Como se ha comentado anteriormente, aunque la senescencia natural o inducida por oscuridad comparten algunos síntomas y componentes moleculares, se han descrito diferencias considerables en los patrones de expresión y en las rutas de señalización activadas entre ambos tipos de senescencia (Buchanan-Wollaston et al., 2005, van der Graaff et al., 2006). En este sentido, se analizó si la menor expresión de *KAT2* provocaba un retardo en la senescencia natural, similar al observado en condiciones inducidas. Para ello se determinó el contenido de clorofila a+b en cada hoja de la roseta de plantas transgénicas *KAT2as* y plantas Col que ya mostraban varias hojas senescentes. En cada planta se analizó desde la hoja más antigua hasta la más joven según su posición en la roseta. Como se muestra en la gráfica de la figura 32.A o en la imagen representativa (figura 32.B), las hojas más antiguas de plantas Col (hasta la hoja 4), mostraron síntomas de amarilleamiento típicos de procesos de senescencia. Las hojas más jóvenes, donde los procesos de senescencia todavía no se habían producido, correlacionaban con niveles de clorofila a+b más altos en esas hojas (figura 32.A). Las plantas transgénicas *KAT2as*, mostraron un patrón de senescencia natural atenuado respecto al ecotipo silvestre Col, siendo más acentuadas las diferencias en las hojas más antiguas, en las cuales las plantas *KAT2as* presentaban menos signos de clorosis, exceptuando la hoja 1 (la más antigua), que no mostró diferencias significativas entre los genotipos analizados. Concretamente, los

niveles de clorofila a+b en las hojas 2 a 4 contenían aproximadamente entre el 55-70 % del contenido inicial de clorofila en las líneas *KAT2as* y se había reducido hasta el 35 % en las plantas silvestres (figura 32.A). Este resultado sugería la función esencial de *KAT2* no solo en los procesos de senescencia forzada por oscuridad, sino también en la senescencia producida de manera natural en las plantas.

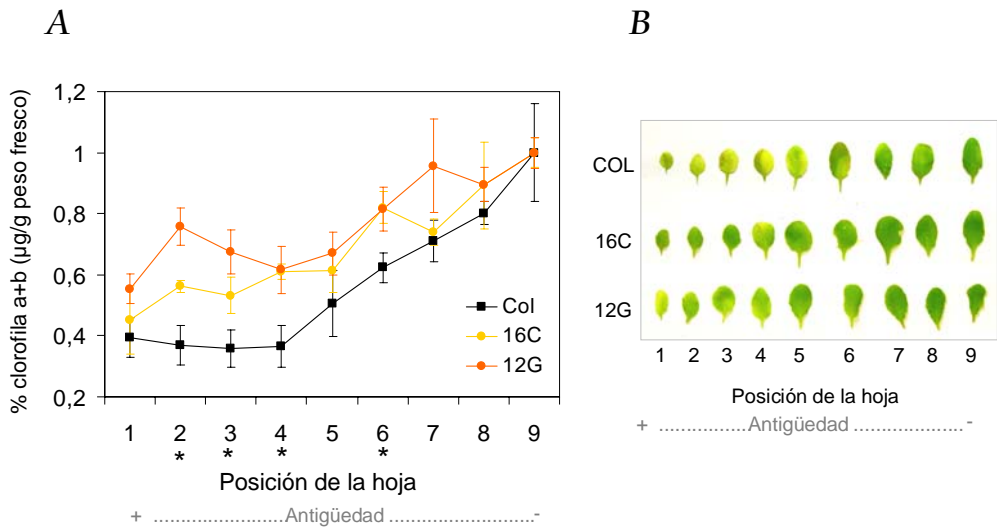


Figura 32. Senescencia natural en plantas Col y líneas transgénicas *KAT2as*.

Plantas del ecotipo silvestre Col y de las líneas transgénicas homocigotas e independientes *KAT2as* 16C y 12G, se cultivaron durante dos meses en condiciones de fotoperiodo de DL. Posteriormente las hojas de la roseta fueron cortadas analizando el contenido de clorofila a+b según la posición de la hoja en la roseta. La hoja 1 representa dentro de cada roseta la hoja más antigua. **A.** Las medidas de la clorofila a+b están expresadas relativa al contenido en clorofila obtenido en la hoja más joven (hoja 9). Cada punto de la gráfica representa la media \pm EE de cuatro réplicas conteniendo cada réplica tres hojas de plantas independientes. * $p < 0,05$ según análisis t-test de las líneas transgénicas respecto a Col para un mismo grupo de hojas.

Resultados II

Participación de los peroxisomas en las respuestas a herida en Arabidopsis

1. Interacción entre las vías de señalización activadas por la herida y por clofibrato.

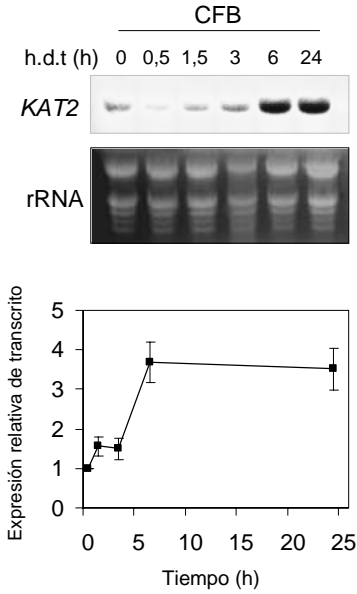
Los peroxisomas intervienen en una gran variedad de funciones metabólicas esenciales para las células. Estos orgánulos tienen una gran plasticidad metabólica ya que modifican su contenido enzimático dependiendo del organismo, tipo celular, estados del desarrollo o condiciones ambientales (Yan et al., 2005; Hayashi y Nishimura, 2006; Schrader y Fahimi, 2006a). En plantas, se han descrito cambios tanto en el contenido enzimático como en el número y tamaño de los peroxisomas en respuesta a diferentes situaciones de estrés metabólico o ambiental incluyendo estrés oxidativo, ozono, herbicidas, metales pesados y senescencia (de Felipe et al., 1988; Droillard y Paulin, 1990; Morré et al., 1990; Palma et al., 1991; Romero-Puertas et al., 1999; López-Huertas et al., 2000; Corpas et al., 2001; Oksanen et al., 2003). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en levaduras y mamíferos, la señal o señales que desencadenan la proliferación de peroxisomas en respuesta a estrés, así como los componentes de las vías de señalización implicadas en la percepción y transducción de los agentes proliferadores, todavía no han sido identificados en plantas (Hu, 2007). En animales se han descrito una gran variedad de xenobióticos, principalmente drogas hipolipidémicas, que inducen la proliferación de peroxisomas (Gray et al., 1982; Reddy et al., 1982; Lalwani et al., 1983; 1985; Hofstra et al., 1995; Reddy y Chu, 1996). Estos compuestos artificiales y otros ligandos endógenos, activan la proliferación de peroxisomas a través de los FT PPARs, modulando mecanismos de desarrollo y defensa a través de la función de estos receptores (Wahli, 2002). La expresión de los genes *PPAR* aumenta en respuesta a las drogas hipolipidémicas y también en respuesta a prostaglandinas y otros derivados de ácidos grasos (Isseman y Green, 1990; Devchand et al., 1996; Wolf, 1996; Forman et al., 1997; Krey et al., 1997). Existen muchas analogías estructurales entre las prostaglandinas y los JAs, ya que ambos son derivados cíclicos de ácidos grasos y tienen la misma estructura conteniendo un anillo de cinco carbonos como motivo central (Bergey et al., 1996; Creelman y Mullet, 1997b; Blée, 2002). Entre las drogas hipolipidémicas, el ester etílico del ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico, llamado comúnmente clofibrato (CFB), ha sido caracterizado ampliamente en animales como un ligando eficiente de los $PPAR\alpha$ y como un inductor de la proliferación de peroxisomas y de la activación de las enzimas de β -oxidación (Reddy y Chu, 1996). En esta parte del trabajo, se utilizó el CFB como agente proliferador de

peroxisomas para analizar las respuestas activadas durante la proliferación de peroxisomas en *Arabidopsis* y las posibles interacciones con las vías de señalización activadas por JA en respuesta a la herida.

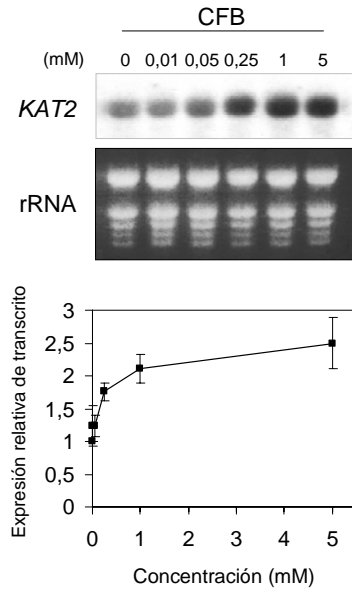
1.1. Expresión del gen *KAT2* en respuesta a CFB.

La activación de la β -oxidación por agentes proliferadores de peroxisomas como el CFB ha sido ampliamente estudiada en animales (Mortensen et al., 1982; Harrison, 1984; Eliassen y Osmundsen, 1984; Sharma et al., 1988; Kvannes et al., 1994; Reddy y Chu, 1996). Sin embargo, hasta la realización de este trabajo solo se había descrito que el CFB era capaz de potenciar la actividad de la proteína ACX, implicada en el primer paso de la β -oxidación, en plantas de guisante (Palma et al., 1991). Para determinar los efectos que el CFB puede tener sobre las plantas, se empezó por analizar si este compuesto era capaz de inducir la expresión del gen *KAT2* de *Arabidopsis*. Como se muestra en la figura 33, plántulas tratadas exógenamente con CFB mostraron un aumento del transcrito de *KAT2* en respuesta a CFB llegando al máximo de inducción a las 6 horas y manteniendo niveles inducidos hasta las 24 horas (figura 33.A.1). Asimismo, dicha activación transcripcional fue dependiente de la dosis empleada, ya que plántulas tratadas con concentraciones crecientes de CFB mostraron un aumento progresivo de la expresión de *KAT2*, observándose el máximo nivel de inducción con dosis de 1 mM o superiores (figura 30.A.2). Por último, se analizó la actividad luciferasa y el nivel de transcrito *KAT2* por ensayos Northern en plantas transgénicas *KAT2::LUC* tratadas con CFB. Tanto en el análisis Northern blot (figura 33.B1-B.2) como en las imágenes de luminiscencia (figura 33.B.3), únicamente las plantas tratadas con CFB mostraron un aumento de la expresión de *KAT2* que correlacionaba con un aumento de la luminiscencia emitida, observándose el nivel máximo de inducción a las 6 horas. El aumento de la luminiscencia se concentró principalmente en la zona central de la roseta y en las hojas más jóvenes de las plantas *KAT2::LUC* (figura 33.B.3.)

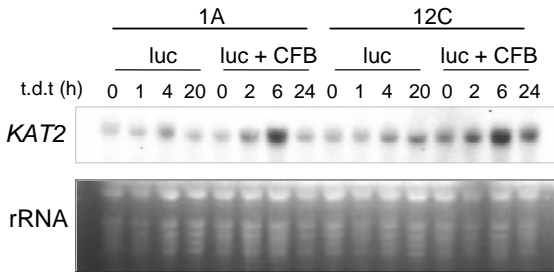
A.1



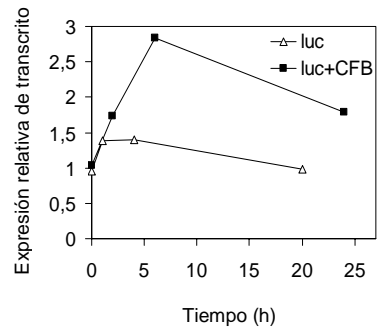
A.2



B.1



B.2



B.3

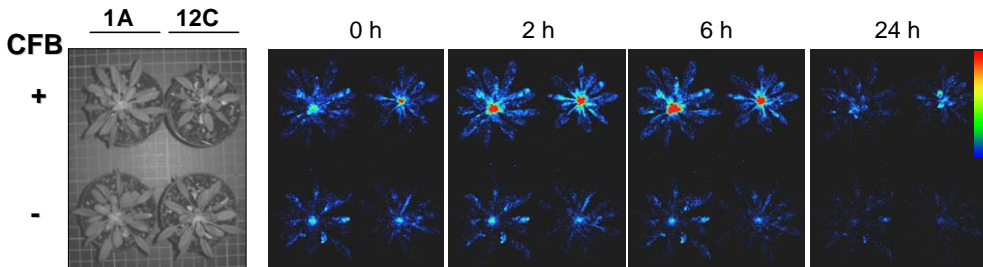


Figura 33. Nivel de expresión del gen *KAT2* en respuesta a la aplicación exógena de CFB en *A. thaliana*.

A. Plántulas Col-0 de 11 días de edad cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas exógenamente con CFB. La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando una sonda radiactiva específica. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. (1). Las plántulas se trataron con CFB 1 mM y las muestras se recogieron a distintos tiempos después de realizar el tratamiento (t.d.t.). (2). Las plántulas se trataron con concentraciones crecientes de CFB (mM) y las muestras se recogieron a las 6 horas tras el tratamiento. Las gráficas representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto de las gráficas en 1. y 2. representa la media \pm EE de 9 y 3 experimentos independientes respectivamente. **B.** Patrón de expresión del gen *KAT2* en respuesta a la aplicación exógena de CFB en plantas transgénicas *KAT2::LUC*. Plantas adultas de las líneas independientes y homocigotas 1A y 12C fueron pulverizadas con luciferina 0,1 mM. Tras 4 horas, la mitad de las plantas fueron tratadas con CFB 2 mM (luc+CFB), permaneciendo la otra mitad sin tratar (luc). Se analizó la respuesta a distintos tiempos después de realizar el tratamiento en todas las plantas (t.d.t.) (1). Análisis Northern blot. Se utilizó una sonda radiactiva específica y se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. (2). Los valores de las gráficas representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media de las dos líneas analizadas. (3). Monitorización del nivel de luminiscencia emitido. Las imágenes fueron obtenidas a los tiempos indicados desde la aplicación con CFB con una cámara de baja luminosidad Hamamatsu C2400. El código de colores correlaciona con la intensidad lumínica detectada, siendo el azul el nivel más bajo y el rojo el nivel superior.

1.2. Expresión de genes de herida en respuesta a CFB.

Como hemos descrito en este trabajo, *KAT2* está implicado en las respuestas de defensa frente a herida y patógenos y tiene un papel fundamental en la síntesis de JA. En este sentido, se comprobó la especificidad del CFB en términos de activación de genes de respuesta a estrés en *Arabidopsis*. Se analizó la expresión de los genes *JR2* y *WR3*, marcadores de las respuestas a herida activadas por la vía dependiente e independiente de JA respectivamente (Titarenko et al., 1997; León et al., 1998). Además, para analizar si el CFB induce respuestas de estrés generales o activa específicamente rutas de señalización relacionadas con herida, se analizó la expresión del gen *PRI*, marcador de las respuestas mediadas por SA (Yalpani et al., 1994; Ryals et al., 1996). La cinética de la expresión de los distintos genes analizados mediante análisis Northern blot, indicó una relación directa entre los procesos activados por CFB y la activación de genes relacionados con la herida (figura 34). Tanto el gen *JR2* como el gen *WR3* aumentaron su expresión al aplicar CFB con un patrón de inducción específico, ya que mientras *WR3* mostró el máximo de

expresión a las 6 horas, similar al patrón observado para el gen *KAT2*, *JR2* presentó una inducción más tardía en el tiempo, con un máximo de expresión a las 24 horas (figura 34.B). Por otra parte, la expresión del gen *PR1* no aumentó al aplicar CFB en ninguno de los tiempos analizados (figura 34.A), sugiriendo que el CFB produce la activación de vías específicas de señalización, entre ellas las relacionadas con la respuesta a la herida, y no una activación generalizada de respuesta a estrés en *Arabidopsis*.

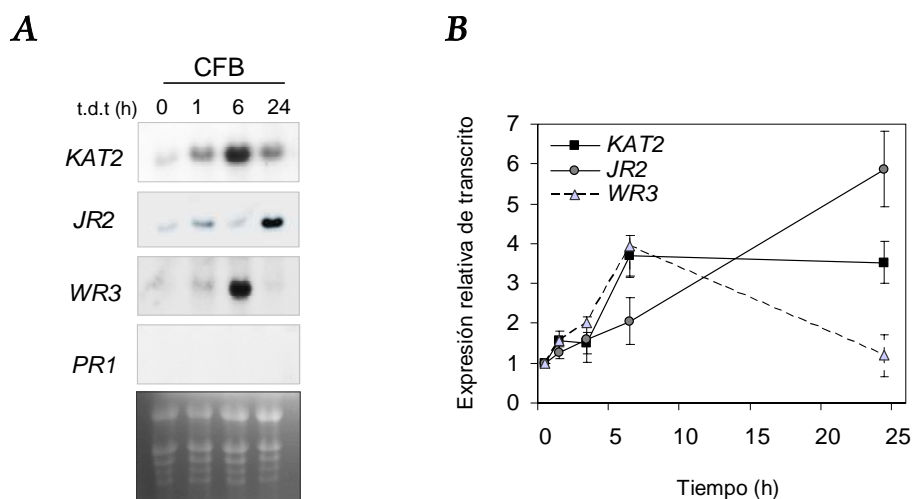


Figura 34. Nivel de expresión de genes relacionados con herida y patógenos en respuesta a la aplicación exógena de CFB.

Se analiza la expresión del gen de β -oxidación *KAT2*, implicado en la biosíntesis de JA en respuesta a herida, de los genes *JR2* y *WR3*, marcadores de las respuestas a herida activadas por la vía dependiente e independiente de JA respectivamente, y la del gen *PR1*, marcador de las respuestas activadas frente a patógenos biotrofos dependientes de SA. Para este fin, plántulas Col-0 de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas con CFB 1 mM y se analizó la respuesta en los tiempos indicados después del tratamiento (t.d.t). **A**. La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando sondas radiactivas específicas para cada gen. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **B**. La gráfica representa los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de varios experimentos independientes, concretamente 9 para el gen *KAT2*, 4 para el gen *JR2* y de 3 experimentos independientes para el gen *WR3*.

1.3. Relación entre las vías de señalización activadas por CFB y por la herida dependiente de JA.

Aunque se ha determinado que el CFB es capaz de inducir la activación de genes relacionados con la herida, sugiriendo cascadas de señalización similares en ambos casos, se analizó si realmente existen puntos de conexión entre las vías de señalización activadas en respuesta a herida, concretamente la vía dependiente de JA, y las rutas de señalización desencadenadas por CFB que conducen finalmente a la proliferación de peroxisomas. Con este propósito, se analizó la expresión de los genes *KAT2* y *JR2* en respuesta al CFB en las plantas insensibles a JA *coi1-1*. Además, se incluyeron plantas transgénicas nahG, que no acumulan SA y el doble mutante *coi1-1nahG* con el fin de analizar posibles efectos regulatorios del SA en la activación de estos genes en respuesta al CFB. Como se observa en el análisis Northern blot de la figura 35.A, la activación transcripcional del gen *KAT2* en respuesta al CFB fue similar en todos los genotipos analizados, indicando que la activación de *KAT2* ocurre por una vía totalmente independiente de COI1/JA y además, dicha activación no estaba regulada por SA. Por otro lado, la expresión del gen *JR2* aumentó de forma diferencial según el genotipo analizado. Mientras que la deficiencia en SA dio lugar a una mayor activación del gen por CFB (como ya se había observado en respuesta a la herida o a luz UV-C), en las plantas *coi1-1* y en el doble mutante *coi1-1nahG* dicha activación estuvo totalmente anulada, indicando que la activación del gen *JR2* en respuesta a CFB era completamente dependiente de COI1, y por tanto potencialmente dependiente de la señalización mediada por JA (figura 35.A). Este resultado sugería que el CFB y la herida podían compartir la misma vía de señalización en la activación de genes de respuesta a herida dependientes de JA como *JR2*. Con el propósito de determinar si la activación del gen *JR2* en respuesta a CFB es dependiente de JA, como ocurre en la respuesta a herida, se analizó la expresión de este gen en las plantas transgénicas *KAT2as*, que como caracterizamos previamente, son deficientes en la síntesis de JA y en la inducción del gen *JR2* en respuesta a la herida. Como se muestra en la figura 35.B, la activación transcripcional de *JR2* en plántulas tratadas exógenamente con CFB fue similar en las plantas *KAT2as* y en el ecotipo silvestre, sugiriendo que la síntesis de JA no es necesaria para la activación de genes de herida en respuesta a CFB y que, por tanto, las vías de señalización activadas en cada caso son distintas pero tienen a COI1 como elemento común.

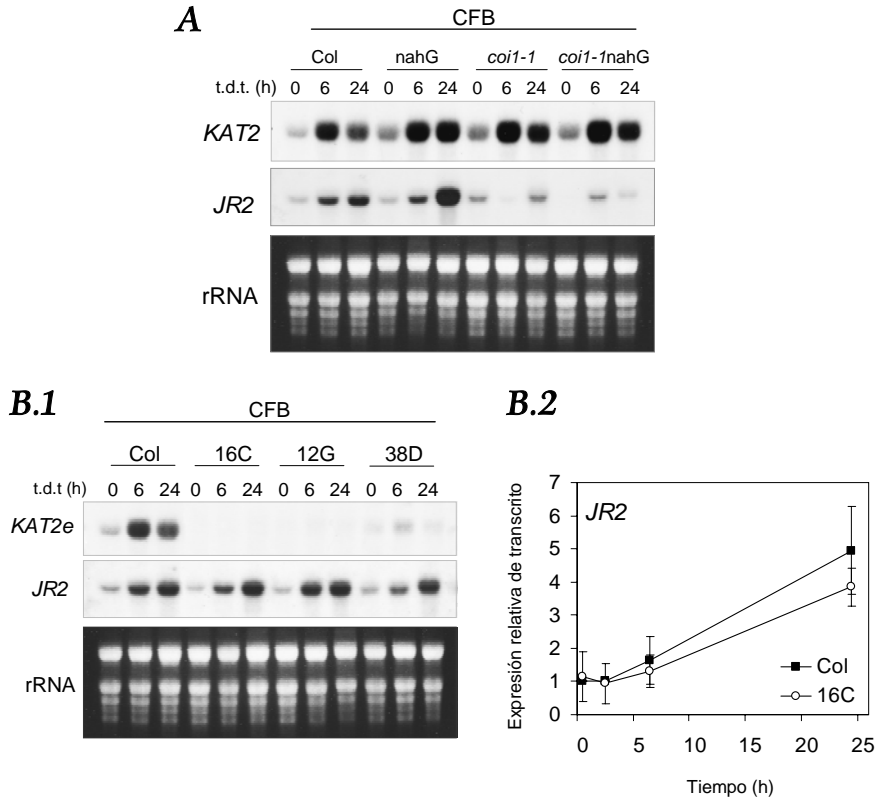


Figura 35. Nivel de expresión de los genes *KAT2* y *JR2* en respuesta a CFB en plántulas Col, deficientes en SA (*nahG*), insensibles a JA (*coi1-1*), en el doble mutante *coi1-1nahG* y en las líneas transgénicas *KAT2as*.

A-B. Plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas con CFB 1 mM y se analizó la respuesta en los tiempos indicados después del tratamiento (t.d.t). Para las plantas transgénicas *KAT2as* se muestran las líneas homocigotas e independientes 16C, 12G y 38D. La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando sondas radiactivas específicas para cada gen. La sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA que no está presente en el transgén y que por tanto solo hibrida con el transcrito endógeno. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **B.2.** Los valores de la gráfica representan los niveles relativos de transcrito del gen *JR2* cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra, en plantas Col y en la línea *KAT2as* 16C. Cada punto representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

Para profundizar más en la vía de señalización que activa a *JR2* en respuesta a CFB, se analizó la expresión de este gen en el mutante *jail-1/jin1-1* insensible a JA y deficiente en la activación de genes de respuesta a herida dependientes de JA (Lorenzo et

al., 2004). A diferencia del patrón observado en el mutante *coi1-1*, la inducción de *JR2* por CFB no estuvo alterada en el mutante *jai1-1/jin1-1* (figura 36), sugiriendo un desacoplamiento entre la vía de señalización que actúa en respuesta a la herida y en respuesta a CFB. Por otra parte, la activación de los genes *KAT2* y *WR3*, marcador de las respuestas activadas frente a herida independientes de JA, fue totalmente independiente de la función de *COI1* y de *MYC2/JIN1/JAI1* (figura 36), indicando que las vías de señalización que activan la expresión de los genes *KAT2* y *WR3* en respuesta a CFB no parecen requerir ningún componente de la vía de señalización mediada por JA, de forma similar a lo observado en respuesta a la herida para estos dos genes. Sin embargo, a pesar de que la activación del gen *JR2* en herida es totalmente dependiente de la síntesis y percepción de JA, que actúa a través de *COI1*, parece que genes de herida como *JR2* se activarían por CFB a través de otras vías de señalización distintas. En este sentido, aunque ambas rutas parecen depender de la función de *COI1* diferirían en la participación de JA.

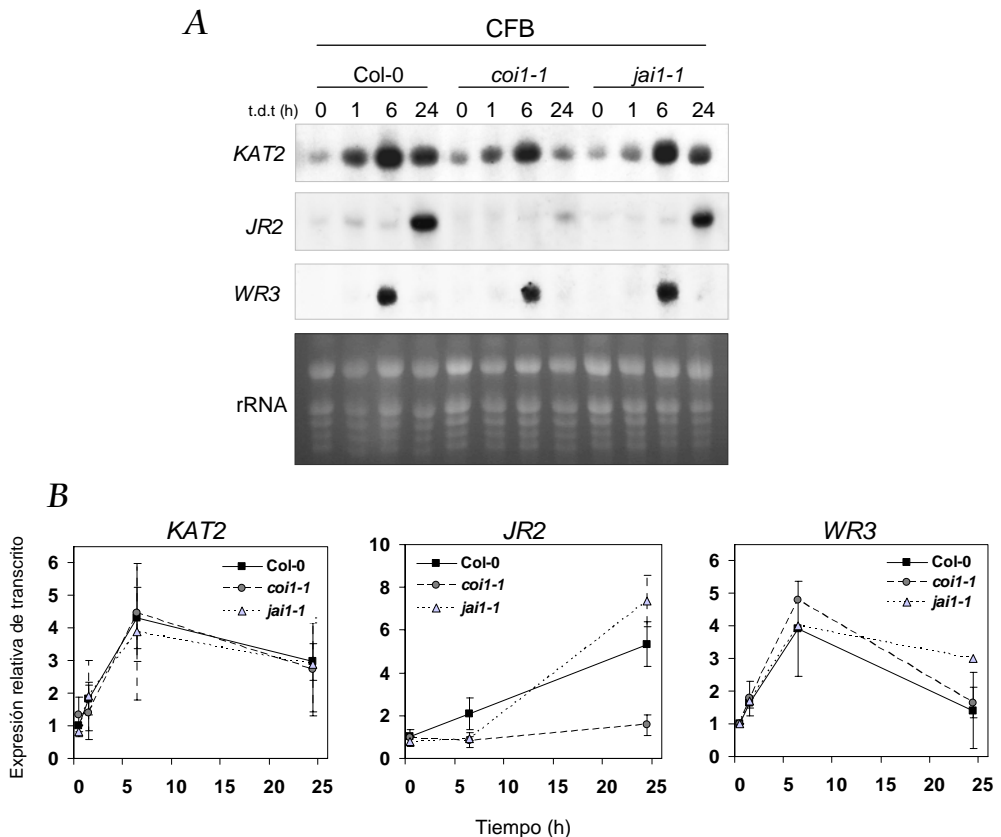


Figura 36. Nivel de expresión de genes relacionados con herida en respuesta a CFB en plántulas Col-0 y en los mutantes insensibles a JA *coil-1* y *jail-1*.

Se analiza la expresión del gen de β -oxidación *KAT2*, implicado en la biosíntesis de JA en la herida, y de los genes *JR2* y *WR3*, marcadores de las respuestas a herida activadas por la vía dependiente e independiente de JA, respectivamente. Para este fin, plántulas de 11 días de edad cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas con CFB 1 mM y se analizó la respuesta en los tiempos indicados después del tratamiento (t.d.t). **A.** La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando sondas radiactivas específicas para cada gen. Se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. **B.** Las gráficas representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de tres experimentos independientes.

2. Análisis del número y tamaño de peroxisomas en respuesta a CFB, herida y JA.

Se ha publicado que plantas transgénicas de *Arabidopsis* en las que la expresión del gen luciferasa estaba dirigida por el promotor del gen *PEX1*, mostraban picos de luminiscencia cuando éstas eran sometidas a factores de estrés como herida, patógenos o estrés oxidativo (López-Huertas et al., 2000). El hecho de que *PEX1* esté implicado en la biogénesis de peroxisomas (Titorenko et al., 2000; Titorenko y Rachubinski, 2000), junto con los resultados obtenidos anteriormente en este trabajo, en los que se apuntaba que las vías de señalización activadas en respuesta a proliferadores de peroxisomas y a herida parecían compartir algunos elementos, sugería una conexión entre la proliferación de peroxisomas y las respuestas activadas frente a herida en *Arabidopsis*. Con el propósito de investigar esta posible conexión, se analizaron cambios en el número o tamaño de los peroxisomas tanto en hojas heridas como en hojas tratadas con JA. Además, aunque está ampliamente descrito en animales, en plantas únicamente estaba documentado que el CFB producía proliferación de peroxisomas en guisante (Palma et al., 1991). Se analizó el número y tamaño de peroxisomas en hojas de *Arabidopsis* tratadas con CFB y también en respuesta a los factores relacionados funcionalmente con la herida.

2.1. Número de peroxisomas en respuesta a CFB, herida y JA.

Para llevar a cabo el conteo de los peroxisomas en las células de hojas de *Arabidopsis* se emplearon dos técnicas independientes que permitían la visualización de estos orgánulos mediante microscopía.

2.1.1. Marcaje fluorescente de los peroxisomas en plantas *MFP2::YFP-MFP2*.

La técnica llamada *Fluorescent Tagging of Full-Length Proteins (FTFLP)* se basa en etiquetar proteínas completas con una marca (proteína) interna fluorescente de forma que permite determinar los patrones de expresión y la localización subcelular *in vivo* de esa proteína en la planta. Además, la expresión de la proteína marcada ocurre bajo la regulación de sus propias secuencias reguladoras nativas, y por tanto se expresa y se localiza únicamente en el tejido o momento del desarrollo donde ocurre de forma natural en la planta (Tian et al., 2004). Plantas transgénicas que expresan proteínas de distinta localización subcelular etiquetadas con esta técnica están disponibles públicamente (<http://gfp.stanford.edu/>). Para nuestro análisis, utilizamos plantas transgénicas (caracterizadas en el apartado de Materiales y Métodos) que expresaban la proteína MFP2 (At3g06860), enzima implicada en el segundo paso de β -oxidación, unida a la proteína fluorescente YFP y bajo el control de la propia secuencia promotora del gen *MFP2*, localizándose la proteína recombinante dentro de peroxisomas (Tian et al., 2004). La localización peroxisomal de la proteína está descrita también para la proteína MFP2 de *Brassica napus*, que presenta un 85 % de identidad con la MFP2 de *Arabidopsis* (Cutler et al., 2000). Por tanto, la cuantificación de las señales fluorescentes emitidas por las proteínas YFP-MFP2 localizadas en el interior de peroxisomas, permitiría determinar el número de peroxisomas en cada célula. La visualización de la fluorescencia emitida se llevó a cabo mediante microscopía confocal que permite el estudio de muestras con marcaje fluorescente haciendo secciones ópticas de las mismas (planos), posibilitando el estudio tridimensional de la muestra. Sin embargo, la imposibilidad de realizar una cuantificación de las marcas fluorescentes por célula impidió realizar una estimación cuantitativa real del número de peroxisomas. No obstante, la técnica permitió observar cambios cualitativos entre las imágenes obtenidas procedentes de las distintas situaciones analizadas y, por tanto, determinar de forma relativa la existencia de cambios en el número de peroxisomas. Como

se muestra en la figura 37.A, las plantas *MFP2::YFP-MFP2* mostraron señales fluorescentes provenientes de la proteína YFP localizadas próximas a los cloroplastos (autofluorescencia roja), correspondiendo cada punto verde con un peroxisoma. Los peroxisomas de plantas se asocian a cloroplastos para poder llevar a cabo la fotorespiración (Somerville, 2001, Schumann et al., 2007). Para analizar si el CFB actúa como un inductor de la proliferación de peroxisomas en *Arabidopsis*, se comparó la fluorescencia debida a YFP en hojas de plantas tratadas con CFB respecto a hojas de plantas control. Las plantas *MFP2::YFP-MFP2* tratadas con CFB mostraron una mayor acumulación de puntos fluorescentes, observándose al realizar el solapamiento de múltiples planos Z de la hoja la formación de aparentes agrupamientos (figura 37.B). Estos resultados sugerían que el CFB era capaz de activar la proliferación de peroxisomas en *Arabidopsis*. La cuantificación de las señales fluorescentes asociadas a YFP correspondientes a las distintas situaciones analizadas, reveló nuevamente las diferencias observadas *de visu*. Las plantas tratadas con CFB mostraron un incremento de fluorescencia de 1,5 veces respecto a plantas control, mientras que plantas heridas o tratadas con JA no mostraron diferencias significativas en la fluorescencia emitida (figura 37.C). Estos datos sugieren que ni la herida ni JA dan lugar a cambios en el número de peroxisomas en las células. Ya que la estimación que se realizó estaba basada en la cuantificación de la fluorescencia total de cada imagen y no el número real de puntos verdes por imagen, se analizó la expresión de la proteína YFP-MFP2 en respuesta a los diferentes tratamientos con el fin de comprobar que el incremento en la fluorescencia era debido a un aumento del número de peroxisomas y no a una mayor acumulación de la proteína recombinante. El análisis, realizado mediante Western blot con un anticuerpo que reconoce a YFP, no mostró diferencias significativas en la acumulación de la proteína YFP-MFP2 en respuesta a CFB, herida o JA (figura 37.D). Asimismo, los datos transcriptómicos de las bases de datos públicas (*Arabidopsis* eFP Browse, Genevestigator), indican que la expresión del gen *MFP2* no varía en respuesta a la herida o a la aplicación de JA. Además, en el análisis transcriptómico realizado en el apartado 5, tampoco se encontraron niveles inducidos del gen *MFP2* en respuesta a CFB. Todos estos resultados parecían indicar que el aumento de la fluorescencia observado en las plantas *MFP2::YFP-MFP2* tratadas con CFB era debido a un incremento en el número de peroxisomas y no a un incremento en la acumulación de la proteína YFP-MFP2, y de igual forma, que la herida o el tratamiento de JA no producía cambios en el número de peroxisomas de las células.

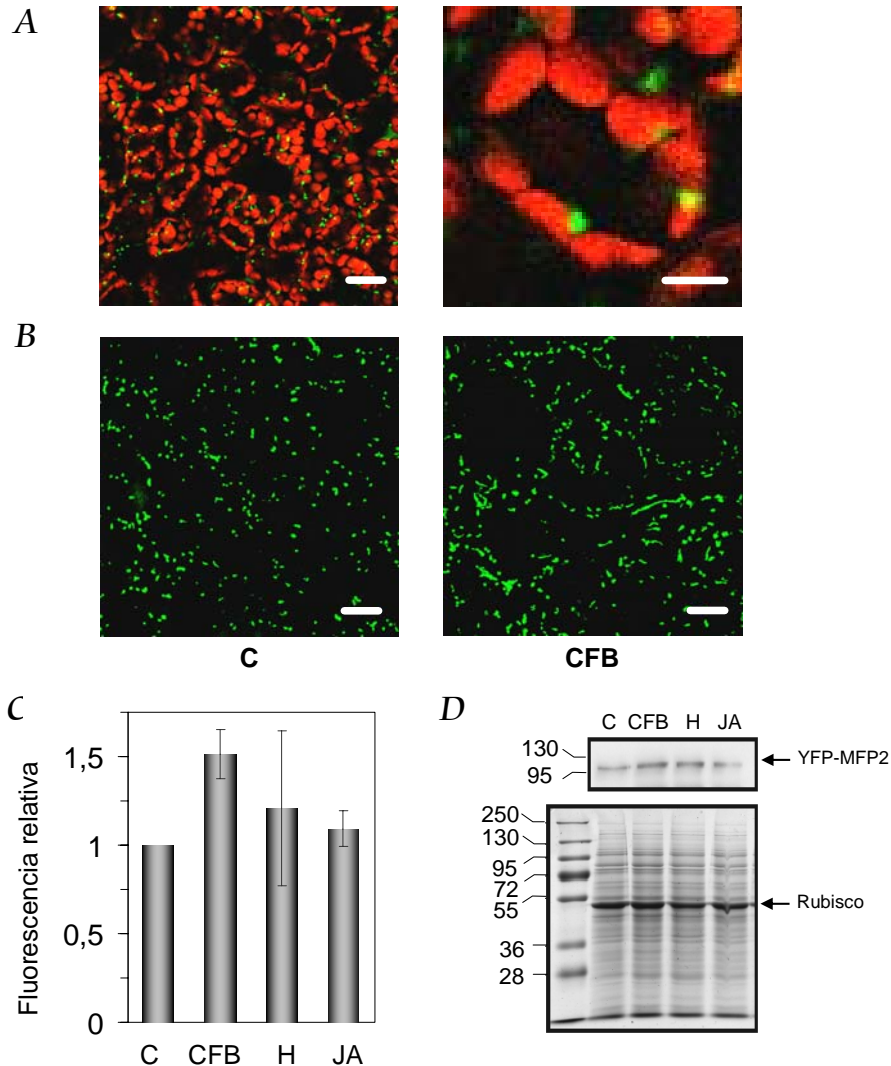


Figura 37. Análisis del número de peroxisomas mediante microscopía confocal de la proteína YFP-MFP2 en hojas de plantas transgénicas *MFP2::YFP-MFP2* heridas o tratadas con CFB o JA. Plantas adultas de un mes cultivadas en condiciones de DC se hirieron o trataron con JA o CFB. La aplicación exógena de CFB o JA se realizó mediante pulverización sobre la superficie de las hojas con una emulsión acuosa que contenía cada uno de los compuestos. La herida se realizó de forma manual, presionando parte de la superficie foliar con pinzas estriadas. Cada conjunto de plantas con diferentes tratamientos se aisló del resto para evitar contaminaciones por compuestos volátiles. Las imágenes de microscopía confocal se tomaron a las 0 y 24 horas post-tratamiento. **A.** Las marcas fluorescentes verdes debidas a la proteína YFP-MFP2 peroxisomal indican la posición de los peroxisomas entre los cloroplastos que muestran autofluorescencia roja. La imagen derecha corresponde a la magnificación de una única célula. Las barras blancas corresponden a 20 μm (imagen izquierda) o 5 μm (imagen derecha). **B.** Imágenes representativas resultantes del

solapamiento de planos Z correspondientes al mesófilo de una hoja control (C) o tratada con CFB (CFB). Las barras blancas corresponden a 20 μm . **C.** Fluorescencia relativa de hojas heridas, tratadas con CFB o JA respecto a sus correspondientes hojas control. Las medidas se obtuvieron cuantificando los canales de color de las imágenes con el programa informático *Adobe Photoshop*. Cada valor representa la media del ratio tratamiento/control \pm EE de 10 imágenes correspondientes a 3 experimentos independientes. **D.** Extractos de proteína total procedentes de hojas control (C), heridas (H) o tratadas con CFB 1 mM (CFB) o JA 100 μM (JA) fueron separados mediante SDS-PAGE 10 % y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La proteína YFP-MFP2 fue detectada por Western blot con un anticuerpo primario policlonal anti-GFP(Ct) que reacciona contra YFP, y un anticuerpo secundario anti-conejo-HRP. Se incluye la tinción con Coomassie de un duplicado del gel como control de carga indicando la posición de la rubisco.

2.1.2. Tinción citoquímica de los peroxisomas con 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

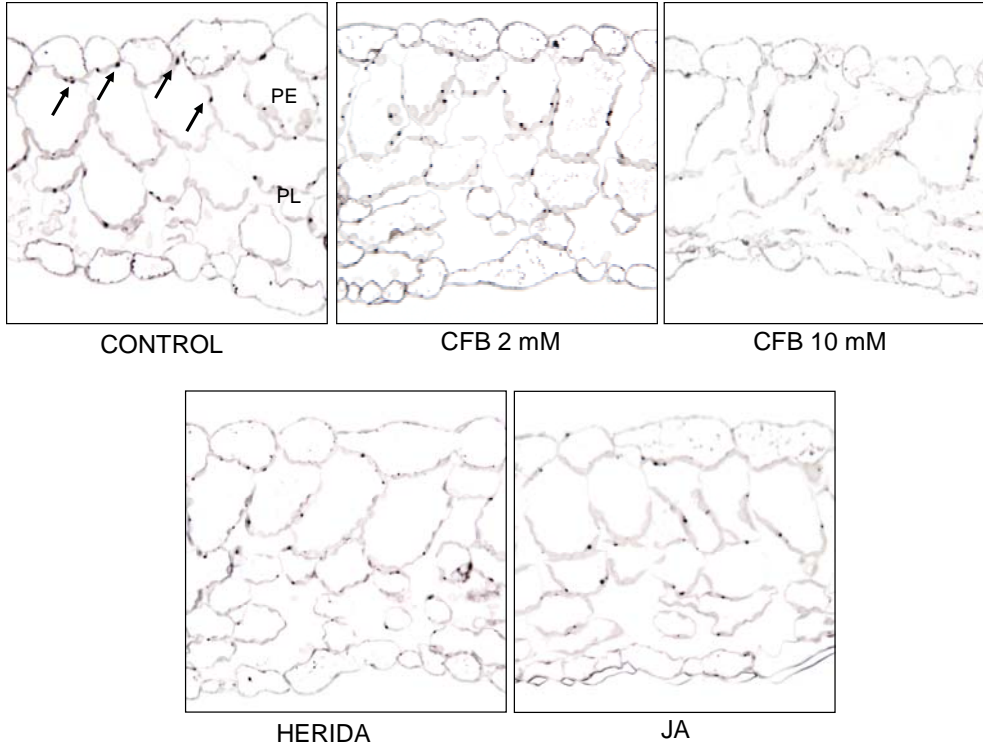
A pesar de ser informativa, la medida de la fluorescencia en plantas *MFP2::YFP-MFP2* solo permitió un análisis cualitativo del número de peroxisomas en las situaciones comparadas. Con el fin de realizar un análisis más exhaustivo, se llevó a cabo una segunda aproximación que permitió la cuantificación del número de peroxisomas por célula. La técnica empleada se basó en el marcaje de los peroxisomas mediante tinción citoquímica con el compuesto 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y la catálisis de la catalasa, enzima más abundante de los peroxisomas y que se utiliza normalmente como marcador de estos orgánulos (descrita también en el apartado de Materiales y Métodos). Concretamente, la catalasa utiliza H_2O_2 para oxidar substratos. En esta técnica, el DAB es oxidado por la catalasa en presencia de H_2O_2 dando lugar a DAB oxidado (Fahimi, 1968; 1969; Novikoff y Goldfischer, 1969), que por la fijación con OsO_4 produce un precipitado negro cuya visualización es posible mediante microscopía óptica e indica la posición de cada peroxisoma en las células (figura 38.A). El conteo de los peroxisomas marcados con DAB fue realizado en secciones semifinas de hojas mediante microscopía óptica. La cuantificación del número de peroxisomas por célula en un número de secciones estadísticamente significativo reveló una acumulación diferencial de peroxisomas en el parénquima en empalizada y en el parénquima lagunar dependiendo del tratamiento realizado (figura 38). Mientras que en el parénquima lagunar no se observaron diferencias significativas en ningún caso, las hojas tratadas con CFB mostraron un aumento significativo del número de peroxisomas en células del parénquima en empalizada respecto a plantas control no tratadas. Concretamente, el tratamiento con CFB 2 mM produjo un aumento significativo de 1,7 veces el número de peroxisomas por célula (5 peroxisomas por

plano de célula en CFB y 3 en el control), valor muy próximo al cociente detectado previamente en la fluorescencia de plantas *MFP2::YFP-MFP2* tratadas con CFB (figura 38.B). Por otra parte, en la mayoría de las imágenes obtenidas por microscopía óptica y electrónica de hojas tratadas con concentraciones altas de CFB como 10 mM o 25 mM, se observaron daños estructurales severos en las células debido al efecto tóxico de este compuesto a dosis altas, lo que probablemente dificultó la citoquímica en estas muestras y podría explicar el menor incremento observado en las hojas tratadas con CFB 10 mM. No se observaron alteraciones en el número de peroxisomas en respuesta a la herida, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las plantas *MFP2::YFP-MFP2*. Sin embargo, el tratamiento con JA dio lugar a una disminución significativa en el número de peroxisomas en las células del parénquima en empalizada (figura 38.B). Estos resultados indicaban la capacidad del CFB como agente proliferador de peroxisomas en *Arabidopsis* y un desacoplamiento en las respuestas activadas por herida y la proliferación de este orgánulo. De hecho, a tenor de los resultados obtenidos, el JA parece funcionar como un regulador negativo de la proliferación de peroxisomas.

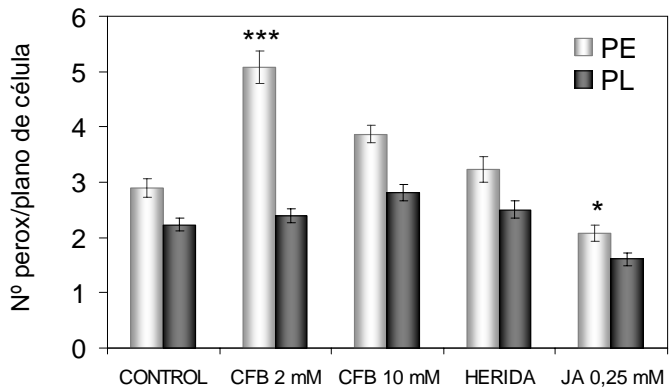
Figura 38. Análisis del número de peroxisomas mediante tinción citoquímica con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y visualización con microscopía óptica en hojas de plantas Col-0 heridas o tratadas con CFB o JA.

Plantas adultas de un mes de edad cultivadas en condiciones de DC se dividieron en grupos de forma aleatoria (3 plantas por grupo). A cada grupo se les aplicó un tratamiento distinto: CFB 2 mM, CFB 10 mM, herida o JA 0,25 mM. La aplicación de CFB o JA se realizó pulverizando las respectivas emulsiones sobre la superficie de las plantas. La herida se realizó de forma manual, presionando parte de la superficie foliar con pinzas estriadas. Cada conjunto de plantas se aisló del resto para evitar contaminaciones por compuestos volátiles, y la tinción citoquímica se realizó a las 24 horas post-tratamiento. **A.** Imágenes representativas de secciones semifinas visualizadas con microscopía óptica de la tinción citoquímica en los distintos tratamientos. Los peroxisomas (indicados con una flecha en el panel correspondiente al control) aparecen teñidos en negro por la acción de la catalasa peroxisomal y posterior fijación con OsO_4 . El control de tinción con 3-amino-1,2,4-triazol, inhibidor de la catalasa, no da lugar a tinción de peroxisomas (mostrado en figura 39.A). El número de peroxisomas se analizó en el parénquima en empalizada (PE) y en el parénquima lagunar (PL). **B.** Recuento del número de peroxisomas en células de hojas control, heridas o tratadas con CFB o JA a las concentraciones indicadas. Cada valor representa la media \pm EE del número de peroxisomas por plano de célula. Para cada tratamiento, el número de peroxisomas se contó en tres secciones independientes (50 a 100 células por sección). Se realizó un análisis estadístico ANOVA univariante con dos variables y con el factor “sección” anidado dentro de la interacción entre los factores “tipo celular (PE o PL)” y “tratamiento (CFB, herida o JA)”. “Tipo celular” y “tratamiento” fueron tratados como factores fijos y “sección” como un factor aleatorio. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ para cada tratamiento respecto al control. Un test estadístico similar utilizando como variable el tamaño celular no mostró diferencias significativas entre tratamientos. Se realizó otro experimento independiente analizando la herida y JA y se obtuvieron resultados similares.

A



B



2.2. Tamaño de los peroxisomas en respuesta a CFB, herida y JA

La tinción citoquímica de los peroxisomas con DAB permitió a su vez determinar el tamaño de estos orgánulos en las situaciones analizadas previamente. Para ello, se determinó el área de los peroxisomas en secciones ultrafinas visualizadas con microscopía electrónica de transmisión en las que aparecían teñidos de negro. Esta tinción marcó específicamente peroxisomas ya que la reacción utilizando el compuesto 3-amino-1,2,4-triazol (AT), inhibidor de la catalasa (Fahimi, 1968; 1969; Novikoff y Goldfischer, 1969), no produjo tinción de estos orgánulos (figura 39.A). Paralelamente, con el fin de poder establecer diferencias entre efectos específicos sobre peroxisomas o comunes a otros orgánulos, se analizó en las mismas muestras el área de las mitocondrias. Como se muestra en la figura 39.B, la herida y el CFB no provocaron cambios en el tamaño peroxisomal, sin embargo, la aplicación exógena de JA dio lugar a peroxisomas anormales con un tamaño de aproximadamente 1,5 veces el área de estos orgánulos en el control. Por el contrario, el tamaño de las mitocondrias fue similar en todos los casos analizados, indicando que los cambios originados por la aplicación de JA eran específicos sobre peroxisomas. Por lo tanto, según los resultados obtenidos, el JA originaba una reducción del número de peroxisomas y un aumento del tamaño de éstos, sugiriendo que, al menos en *Arabidopsis*, el JA interviene en la regulación del tamaño y de la proliferación de estos orgánulos. Por otra parte, en las imágenes de microscopía electrónica no se encontraron asociaciones entre peroxisomas formando agrupamientos o cadenas como sugerían las imágenes de microscopía confocal de plantas *MFP2::YFP-MFP2* tratadas con CFB (figura 39.B), indicando que no existían interacciones físicas entre peroxisomas promovidas por CFB y que, por tanto, era únicamente el solapamiento de planos Z el causante de las agrupaciones observadas.

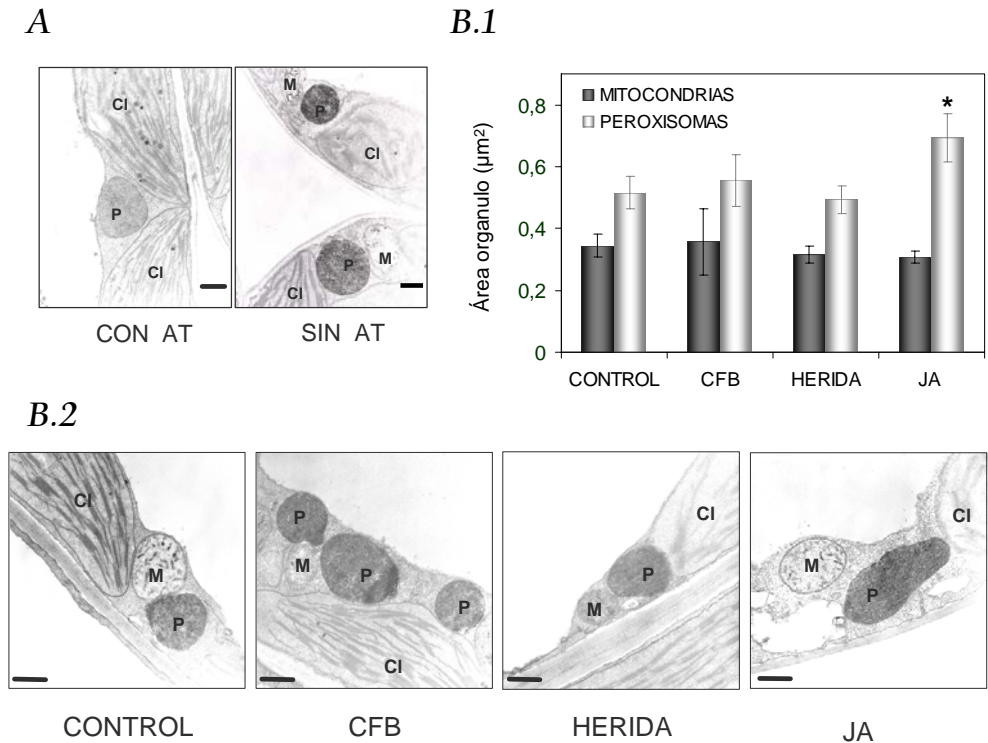


Figura 39. Análisis del tamaño de los peroxisomas mediante tinción citoquímica con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y visualización con microscopía electrónica de transmisión en hojas de plantas Col-0 heridas o tratadas con CFB o JA.

Plantas adultas de un mes de edad cultivadas en condiciones de DC se dividieron en grupos de forma aleatoria (3 plantas por grupo). A cada grupo se les aplicó un tratamiento distinto: herida, CFB 2 mM, o JA 0,25 mM. La aplicación exógena de CFB o JA se realizó pulverizando las respectivas emulsiones sobre la superficie de las plantas. La herida se realizó de forma manual, presionando parte de la superficie foliar con pinzas estriadas. Cada conjunto de plantas se aisló del resto para evitar contaminaciones por compuestos volátiles y la tinción citoquímica se realizó a las 24 horas post-tratamiento. **A.** Los peroxisomas aparecen teñidos en negro por la acción de la catalasa peroxisomal y posterior fijación con OsO₄. El control de tinción se realizó añadiendo a la reacción 3-amino-1,2,4-triazol (AT), inhibidor de la catalasa, lo que impide la tinción de los peroxisomas. **B.** Medida del área de peroxisomas y mitocondrias en células de hojas control, heridas o tratadas con JA o CFB. **(1).** Representación gráfica de los valores obtenidos. Cada barra representa la media ± EE del área de todos los orgánulos medidos. Se analizaron aproximadamente 25 secciones ultrafinas diferentes con varios orgánulos por sección utilizando el programa informático *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). * $p < 0,05$ según análisis t-test para cada tratamiento respecto al control. **(2).** Imágenes representativas de las secciones ultrafinas visualizadas con microscopía electrónica de transmisión de la tinción citoquímica con DAB en los diferentes tratamientos analizados. Se observan peroxisomas (P), cloroplastos (Cl) y mitocondrias (M). Las barras de referencia corresponden a 0,5 µm.

3. Expresión de genes *PEX* en respuesta a CFB, a la herida y a JA.

Las peroxinas (*PEX*) son un grupo de proteínas implicadas en muchos aspectos relacionados con la biogénesis y mantenimiento de los peroxisomas, entre ellas el ensamblaje de nuevas membranas, transporte de proteínas al interior del peroxisomas y la división/proliferación del orgánulo (Lazarow, 2003; Baker y Sparkes 2005; Hayashi y Nishimura, 2006). Con el fin de investigar si los distintos comportamientos observados, en términos de proliferación de peroxisomas, en hojas heridas o tratadas con JA o CFB eran debidos a una regulación diferencial de los genes *PEX*, se analizó la respuesta de los genes *PEX1* y *PEX14* en las situaciones analizadas. Además, variaciones en la expresión de estos genes en respuesta a la herida y JA podrían revelar una posible función de los *PEX* en la defensa frente a herida en *Arabidopsis*. El gen *PEX1* (At5g08470) codifica una ATPasa de membrana tipo AAA relacionada con la biogénesis de peroxisomas (Faber et al., 1998; Titorenko et al., 2000; Titorenko y Rachubinski, 2000), y como se ha comentado, se había descrito la activación transcripcional de *PEX1* en respuesta a estrés oxidativo, senescencia, herida y patógenos (López-Huertas et al., 2000). El gen *PEX14* (At5g62810) codifica una proteína transmembrana peroxisomal implicada en el importe de las proteínas que contienen los péptidos señal PTS1 y PTS2 (López-Huertas et al., 1999; Hayashi et al., 2000a). El mutante *ped2/pex14* presenta peroxisomas anormales morfológicamente y una reducción de las proteínas peroxisomales en el interior del orgánulo, sugiriendo una función esencial del gen *PEX14* tanto en la biogénesis como en el mantenimiento de las funciones de dicho orgánulo (Hayashi et al., 2000a). Además, en los análisis realizados se incluyeron los genes *KAT2* y *JR2* como controles internos de la respuesta a herida, JA y CFB. El tratamiento exógeno con CFB, que conlleva proliferación de peroxisomas, dio lugar a un aumento de la expresión de los genes *PEX1* y *PEX14* con una cinética de inducción progresiva a lo largo del tiempo. Este patrón de expresión fue similar al observado para los genes *KAT2* y *JR2* (figura 40.A). Se observó un aumento progresivo de la expresión de los genes *PEX1* y *PEX14* en respuesta a la herida a lo largo del tiempo, siendo en ambos casos con una magnitud de inducción mucho menor que la de los genes *KAT2* y *JR2* (figura 40.B). Estos resultados sugerían una posible función de los genes *PEX* en las respuestas activadas frente a la herida en *Arabidopsis*. Para profundizar en las vías de señalización que actúan en la activación de los genes *PEX* en respuesta a la herida, se analizó la respuesta a JA. En este caso, la aplicación exógena de concentraciones crecientes de JA no produjo ningún cambio en la expresión de *PEX1* o *PEX14* (figura 40.C), sugiriendo que la

activación en respuesta a la herida de los genes *PEX* discurriría por una vía de señalización independiente de JA.

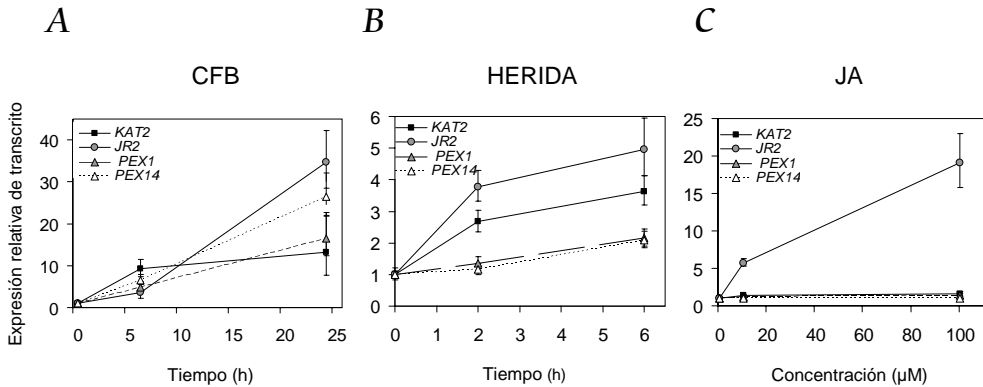


Figura 40. Nivel de expresión de los genes *PEX1* y *PEX14*, implicados en la biogénesis y función de peroxisomas, en respuesta a CFB, herida y JA.

Representación gráfica de los niveles de expresión obtenidos por RT-PCR cuantitativa. Los valores se muestran normalizados según los niveles de *ACT2/8* determinados en las mismas muestras. Los datos muestran la media \pm EE de 3 réplicas. **A.** Plántulas Col-0 de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas con CFB 1 mM y se analizó la respuesta en los tiempos indicados después del tratamiento. **B.** Hojas de roseta de plantas adultas Col-0 fueron heridas mediante pinzas estriadas. Se analizó la respuesta de los genes en los tiempos indicados. **C.** Plántulas Col-0 de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) se trataron con concentraciones crecientes de JA (μ M) y las muestras se recogieron a las 6 horas después de realizar el tratamiento.

4. Análisis de las respuestas desencadenadas por CFB, herida y JA en el mutante de inserción de T-DNA *pex14*.

Los resultados de este trabajo indican que en respuesta a la herida no se producen alteraciones en el número o tamaño de los peroxisomas pero si un aumento de la expresión de los genes *PEX1* y *PEX14*, previsiblemente por una vía de señalización independiente de JA. Estos resultados sugieren que las peroxinas codificadas por los genes *PEX* e implicadas en la biogénesis y mantenimiento de los peroxisomas podrían estar ejerciendo alguna función en las respuestas de defensa activadas frente a herida en Arabidopsis. Para analizar

la relevancia de los genes *PEX* en el correcto desarrollo de estas respuestas, se analizaron las respuestas frente a herida, CFB y JA en plantas que presentaban alteraciones en los peroxisomas, tanto morfológicas como en el contenido enzimático. Como se ha descrito anteriormente, el mutante *ped2* presenta una mutación en el gen *PEX14* que da lugar a defectos en β -oxidación y en fotorespiración debido a una drástica reducción de las enzimas de la matriz peroxisomal como KAT2, además de alteraciones en la morfología de los peroxisomas (Hayashi et al., 1998b; 2000a). En este estudio, se ha seleccionado un mutante de inserción de T-DNA en el gen *PEX14* (colección pública SALK) con el fin de conseguir un mutante con pérdida de función. La caracterización de estas líneas transgénicas está descrita en el apartado de Materiales y Métodos. Estas plantas se emplearon para indagar tanto la función del gen *PEX14* como la relevancia de la integridad de los peroxisomas en las respuestas de defensa desencadenadas por la herida.

4.1. Caracterización fenotípica del mutante *pex14*.

La línea transgénica homocigota *pex14* seleccionada presentó niveles nulos de expresión del transcrito *PEX14* en condiciones basales (figura 41.A). Esta reducción en la expresión de *PEX14* dio lugar a un fenotipo enano, dándose las mayores diferencias de tamaño cuando eran cultivadas en condiciones de DC (figuras 41.B y C). Las plantas *pex14* mostraron hojas más pequeñas y cloróticas que las plantas silvestres y una menor longitud del tallo a lo largo de todo el desarrollo, produciendo finalmente un menor número de flores (figuras 41.B-C). Este fenotipo morfológico fue idéntico al ya descrito previamente para el mutante *ped2* (Hayashi et al., 2000a), hechos que hacían presuponer que los defectos observados en las plantas *pex14* eran debidos a las mismas alteraciones en la morfología de los peroxisomas y en la carencia de proteínas peroxisomales que ya habían sido descritas en el mutante *ped2*.

4.2. Caracterización molecular del mutante *pex14* en respuesta a CFB, herida y JA.

Para determinar si el mutante *pex14* estaba afectado en alguna respuesta tanto a herida, como a JA o CFB, se analizó la expresión de los genes *KAT2* y *JR2* como marcadores de estos procesos. Las plantas *pex14* a pesar de los defectos que presentan en sus funciones



Figura 41. Caracterización fenotípica del mutante de inserción de T-DNA *pex14*.

A. Representación gráfica de los niveles de expresión del gen *PEX14* obtenidos por RT-PCR cuantitativa. Los valores se muestran normalizados según los niveles de *ACT2/8* determinados en las mismas muestras. Los datos muestran la media \pm EE de 3 réplicas. **B-C.** Fenotipo morfológico de plantas *pex14* comparado con plantas silvestres Col-0, fondo genético de las plantas transgénicas, cultivadas en las mismas condiciones. **B.** Plantas de un mes cultivadas en condiciones de DL. **C.** Plantas de un mes (panel superior) o de dos meses (panel inferior) cultivadas en condiciones de DC.

peroxisomales, mostraron niveles inducidos de los genes *KAT2* y *JR2* en respuesta a CFB similares a los del ecotipo silvestre Col-0 (figura 42.A), sugiriendo que las vías de señalización que se activan en respuesta a CFB eran independientes tanto de la función de *PEX14* como de la propia integridad de los peroxisomas. De manera similar a la respuesta observada por CFB, el mutante *pex14* no mostró diferencias respecto a Col-0 en los patrones de acumulación de los transcritos *KAT2* y *JR2* en respuesta a la herida, tanto local como sistémica, así como en la respuesta a la aplicación exógena de JA (figura 42.B-C). La activación completa de estos genes en el mutante *pex14* sugería que las vías de señalización activadas en respuesta a herida permanecían intactas en el mutante *pex14*. Sin embargo, la expresión de *PEX1*, tanto basal como inducido por la herida, fue menor en las plantas *pex14* (figura 40.C.3), sugiriendo que en el caso del gen *PEX1*, y posiblemente de otros genes *PEX*, si se requieren peroxisomas íntegros para una completa activación de la expresión tanto basal como en respuesta a estrés.

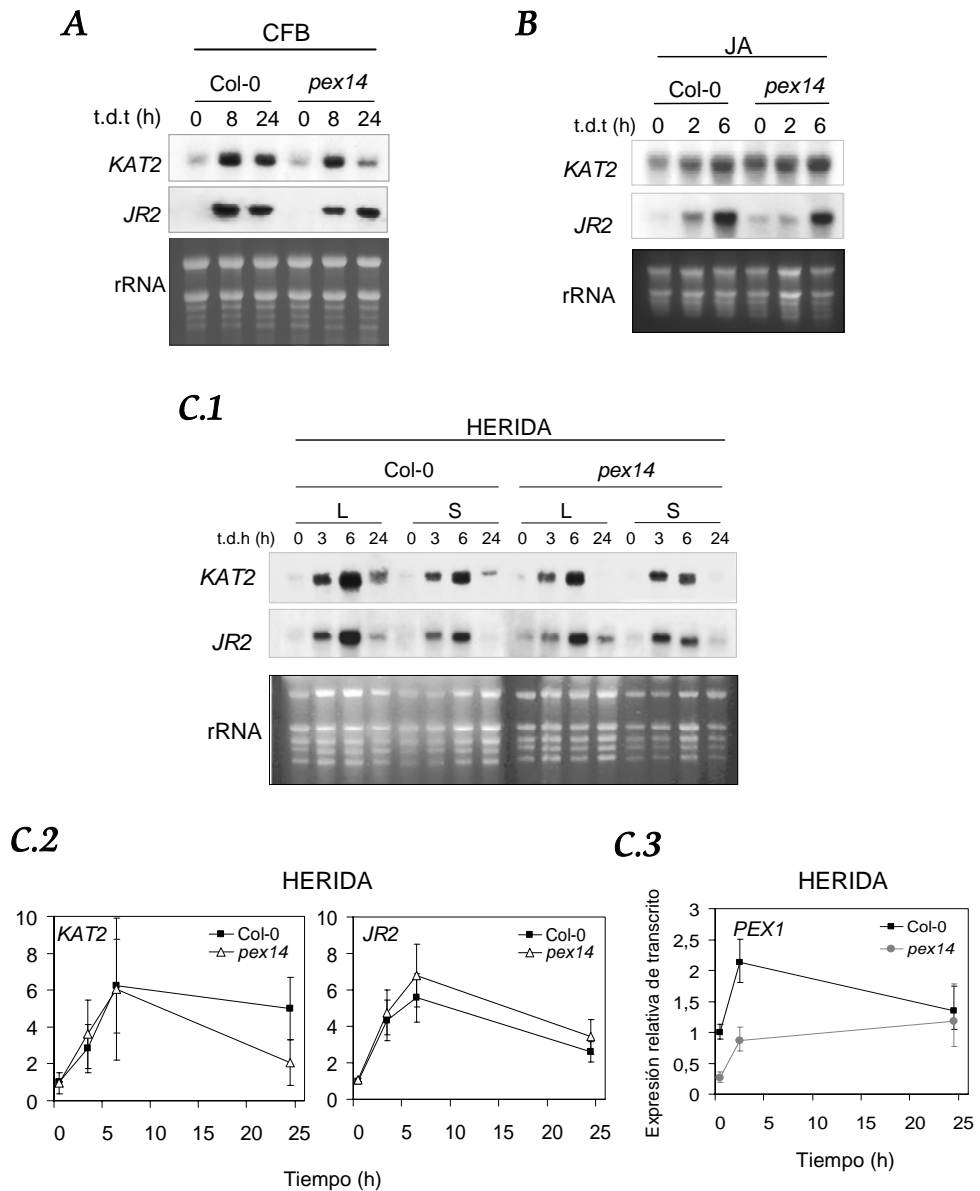


Figura 42. Nivel de expresión de los genes inducibles por herida *KAT2* y *JR2* en respuesta a CFB, JA y herida en el mutante de inserción de T-DNA *pex14*.

A-B. Plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas con CFB 2 mM (A) o con JA 250 μ M (B) y se analizó la respuesta en los tiempos indicados después del tratamiento (t.d.t). La expresión de los genes se analizó por Northern blot empleando sondas radiactivas específicas para cada gen y se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. C. Herida. La mitad de las hojas de la roseta de plantas adultas de un mes de edad

cultivadas en tierra en condiciones de DL se dañaron mediante pinzas estriadas. Se recogieron muestras a distintos tiempos después de producirse la herida (t.d.h.) tanto de hojas heridas (L) como de hojas no dañadas de la roseta (S). (1). Cinética de la expresión de los genes *KAT2* y *JR2* analizada por Northern blot. Se utilizaron sondas radiactivas específicas para cada gen y se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. (2). Los valores de las gráficas representan los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada punto representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes para el gen *KAT2* y de 4 experimentos independientes para el gen *JR2*. (3). Nivel de expresión del gen *PEX1* obtenido por RT-PCR cuantitativa. Los valores se muestran normalizados según los niveles de *ACT2/8* determinados en las mismas muestras y representan la media \pm EE de 3 réplicas. Se determinaron también los niveles de expresión de los genes *KAT2* y *JR2* por RT-PCR cuantitativa en las mismas muestras obteniéndose resultados similares a los indicados en C.2.

5. Análisis transcriptómico de la respuesta a CFB en plántulas de *Arabidopsis*.

Como se ha comprobado anteriormente, el CFB es capaz de desencadenar proliferación de peroxisomas en plantas. Sin embargo, a diferencia de en mamíferos, donde la función del CFB como un ligando de los FT PPARs está bien caracterizada, el modo de acción del CFB en plantas es totalmente desconocido. En este sentido, aunque en *Arabidopsis* no se encuentra ningún gen con homología con los PPARs de animales, la expresión heteróloga del PPAR α de *Xenopus* en tabaco produce proliferación de peroxisomas, y aumento de la actividad ACX (Nila et al., 2006). Además, el CFB es capaz de activar la expresión de genes de β -oxidación en plantas (Palma et al., 1991; este trabajo). Estos datos sugieren la existencia de elementos comunes en las vías de señalización activadas por PP en animales y plantas. Con el propósito de descubrir las vías de señalización que se activan en respuesta a CFB en *Arabidopsis* y las posibles similitudes con las vías de señalización activadas en respuesta a estrés en plantas, se llevó a cabo una aproximación genómica en la que se compararon los transcriptomas de plántulas Col-0 tratadas o no con CFB. Los análisis transcriptómicos se realizaron a las 24 horas tras el tratamiento, ya que en este tiempo se observaron las mayores diferencias de expresión génica en respuesta a CFB y se observaron previamente cambios en el número de peroxisomas.

5.1. Genes expresados diferencialmente en respuesta al CFB.

En el análisis transcriptómico se emplearon micromatrices de oligonucleótidos de 70mer de Operon Arabidopsis Genome Oligo Set Versión 1.0 (Qiagen) impresos en la universidad de Arizona (<http://ag.arizona.edu/microarray/>), y se compararon muestras procedentes de tres experimentos independientes. La hibridación, detección y tratamiento de las imágenes se llevó a cabo como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Tras la cuantificación y normalización de los datos, se eliminaron aquellos genes con p-valor corregido (FDR) mayor a 0,05. En primer lugar, del grupo de genes con señales estadísticamente robustas ($FDR < 0,05$), se analizó mediante herramientas de Ontología génica que rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) estaban implicadas en las respuestas al CFB de manera general. En este sentido, la mayoría de genes estaban incluidos principalmente en rutas KEGG relacionadas con rutas metabólicas y de degradación. Entre éstas, la ruta de fenilpropanoides, que conlleva a la biosíntesis de coumarinas y ligninas fue la máxima representada, y rutas relacionadas con el metabolismo del ascorbato, de la fenilalanina, del glutation, del metano y del ciclo del glioxilato estuvieron también representadas en alta proporción. Otras rutas KEGG representadas se relacionaban con degradación de compuestos tóxicos como clorociclohexanos, fluorenos, pinenes y con el metabolismo de xenobióticos. Además, el 40 y el 30 % de estos genes codificaban proteínas con localización en plastidios o mitocondrias, respectivamente. A continuación, del grupo de genes con $FDR < 0,05$ se seleccionaron aquellos con un valor del \log_2 del ratio de la expresión mayor o igual que 0,678 (expresión 1,6 veces mayor en la muestra tratada respecto al control) para los genes inducidos y menor o igual a -0,678 (expresión 0,6 veces en la muestra tratada respecto al control) para los genes reprimidos. Finalmente, el número de genes que pasaron este escrutinio y con los que se realizaron los análisis funcionales descritos posteriormente, fue de 295 para el grupo de inducidos y de 309 para el grupo de genes reprimidos. Este dato sugiere que el CFB afecta en la misma proporción tanto la activación como la represión de distintas vías de señalización. Las tablas III y IV muestran el listado de los genes que presentaban el mayor cambio de expresión en respuesta al CFB, tanto genes inducidos como reprimidos hasta un valor de cambio en \log_2 de 1,2 o -1,2 respectivamente (equivalente a inducciones de 2,3 veces y represiones de 0,4).

Tabla III. Relación de genes cuya expresión aumenta en respuesta a CFB.

Se muestra para cada gen el código AGI, la descripción, el valor medio de la inducción en log₂ en las tres réplicas analizadas y el p-valor corregido por FDR

AGI	Descripción	Inducción	p-valor (FDR)
At1g10585	expressed protein	2,7340	0,0041
At3g60140	glycosyl hydrolase family 1 protein	2,5528	0,0188
At3g28740	cytochrome P450 family protein	2,4745	0,0058
At2g29350	tropinone reductase	2,4570	0,0033
At2g29490	glutathione S-transferase	2,4492	0,0026
At1g09500	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family	2,4411	0,0088
At1g60730	aldo/keto reductase family protein	2,3637	0,0077
At1g69880	thioredoxin	2,2343	0,0041
At1g78380	glutathione S-transferase	2,1583	0,0048
At4g34135	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	2,1533	0,0026
At3g44300	nitrilase 2 (NIT2)	2,0692	0,0041
At1g05560	UDP-glucose transferase	2,0604	0,0041
At5g43580	protease inhibitor	2,0387	0,0128
At5g16980	NADP-dependent oxidoreductase	1,9999	0,0036
At5g61820	expressed protein MtN19, Medicago truncatula	1,9618	0,0026
At1g05680	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,9577	0,0203
At5g22860	serine carboxypeptidase S28 family protein	1,9570	0,0041
At1g69680	expressed protein similar to MOG1 isoform A	1,9477	0,0041
At1g17170	glutathione S-transferase	1,8998	0,0100
At2g17500	auxin efflux carrier family protein	1,8681	0,0071
At1g14130	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	1,8610	0,0033
At2g29420	glutathione S-transferase,	1,8522	0,0054
At2g23170	auxin-responsive GH3 family protein	1,8348	0,0103
At2g15490	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,8297	0,0054
At3g46660	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,8116	0,0026
At2g38340	AP2 domain-containing transcription factor, putative (DRE2B)	1,7477	0,0415
At5g16970	NADP-dependent oxidoreductase	1,7306	0,0048
At2g45570	cytochrome P450 76C2	1,7017	0,0110
At2g36800	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family	1,6791	0,0096
At3g22370	alternative oxidase 1a, mitochondrial (AOX1A)	1,6618	0,0210
At4g37370	cytochrome P450	1,6539	0,0166
At1g63530	hypothetical protein	1,6454	0,0134
At2g29460	glutathione S-transferase	1,6390	0,0182
At1g35820	hypothetical protein	1,6387	0,0403
At4g34131	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,6069	0,0048
At2g33380	calcium-binding RD20 protein (RD20)	1,5929	0,0054
At3g48300	cytochrome P450 family protein	1,5442	0,0033
At5g48180	kelch repeat-containing protein	1,5341	0,0170
At2g29480	glutathione S-transferase	1,5244	0,0105
At3g59140	ABC transporter family protein putative multi resistance protein mrp	1,5229	0,0081
At2g37770	aldo/keto reductase family protein	1,5224	0,0106
At5g12030	17,7 kDa class II heat shock protein 17.6A	1,4633	0,0133
At2g36780	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,4567	0,0130
At1g17020	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	1,4545	0,0073
At4g37990	mannitol dehydrogenase	1,4419	0,0267
At3g24500	ethylene-responsive transcriptional coactivator	1,4169	0,0199
At1g72680	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	1,4023	0,0041
At5g18270	no apical meristem (NAM) family protein	1,3601	0,0054
At5g61950	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related	1,3576	0,0041
At3g48580	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	1,3397	0,0176
At3g21720	isocitrate lyase	1,3297	0,0126
At1g68620	expressed protein similar to PrMC3	1,3269	0,0376
At2g15480	UDP-glucoronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,3264	0,0042
At5g39050	transferase family protein	1,3233	0,0120
At5g13210	expressed protein	1,3218	0,0235
At5g66760	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	1,3090	0,0102
At3g04000	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	1,2882	0,0107
At1g53540	17,6 kDa class I small heat shock protein	1,2794	0,0110
At2g46680	homeobox-leucine zipper protein 7 (HB-7) / HD-ZIP transcription factor 7	1,2782	0,0113
At2g34810	FAD-binding domain-containing protein	1,2780	0,0048
At1g62570	flavin-containing monooxygenase family protein	1,2771	0,0087
At3g51840	short-chain acyl-CoA oxidase identical to Short-chain acyl CoA oxidase	1,2764	0,0136
At2g47190	myb family transcription factor (MYB2)	1,2737	0,0210
At2g05380	glycine-rich protein (GRP3S)	1,2695	0,0120
At3g27380	succinate dehydrogenase, iron-sulphur subunit	1,2692	0,0076
At1g59660	nucleoporin family protein	1,2569	0,0261
At4g01360	expressed protein	1,2466	0,0444
At5g17000	NADP-dependent oxidoreductase	1,2224	0,0088
At5g40370	glutaredoxin	1,2215	0,0054
At5g39520	expressed protein predicted protein	1,2212	0,0390
At4g15760	monooxygenase, putative (MO1)	1,2207	0,0280
At2g05510	glycine-rich protein	1,2198	0,0348
At4g02940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	1,2117	0,0088
At2g43510	trypsin inhibitor	1,2107	0,0248

Tabla IV. Relación de genes cuya expresión disminuye en respuesta a CFB.

Se muestra para cada gen la anotación AGI, la descripción, el valor medio de la represión en log₂ en las tres réplicas analizadas y el p-valor corregido por FDR.

AGI	Descripción	Represión	p-valor (FDR)
At1g73600	phosphoethanolamine N-methyltransferase 3	-2,3820	0,0026
At5g20630	germin-like protein (GER3)	-2,3428	0,0264
At2g43620	chitinase	-2,1499	0,0102
At1g52060	jacalin lectin family protein	-1,9166	0,0105
At1g74670	gibberellin-responsive protein	-1,7421	0,0138
At5g14740	carbonic anhydrase 2 / carbonate dehydratase 2 (CA2)	-1,7343	0,0170
At5g05960	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,7078	0,0033
At4g07820	pathogenesis-related protein, putative similar to Pathogenesis-related protein 1 precursor (PR-1)	-1,6891	0,0355
At5g40590	DC1 domain-containing protein	-1,5926	0,0151
At1g75830	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1,1)	-1,5870	0,0258
At1g31580	expressed protein identical to ORF1	-1,5709	0,0272
At2g10940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,5692	0,0365
At1g05240	peroxidase	-1,5582	0,0147
At3g05950	germin-like protein	-1,5362	0,0102
At1g52050	jacalin lectin family protein	-1,5189	0,0264
At3g01500	carbonic anhydrase 1, chloroplast / carbonate dehydratase 1 (CA1)	-1,5051	0,0113
At3g45160	expressed protein	-1,4926	0,0077
At2g25510	expressed protein	-1,4894	0,0081
At5g44430	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1,2c) plant defensin protein family member	-1,4840	0,0260
At1g26250	proline-rich extensin	-1,4791	0,0337
At3g63160	expressed protein	-1,4615	0,0048
At4g26530	fructose-bisphosphate aldolase	-1,4546	0,0088
At5g43520	DC1 domain-containing protein	-1,4439	0,0147
At2g26010	plant defensin-fusion protein, putative (PDF1,3) plant defensin protein family member	-1,4269	0,0306
At1g12080	expressed protein	-1,4238	0,0058
At1g13420	sulfotransferase family protein	-1,4028	0,0300
At4g36540	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1,3891	0,0148
At5g65730	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	-1,3811	0,0110
At1g70830	Bet v 1 allergen family protein	-1,3782	0,0100
At2g24850	aminotransferase	-1,3758	0,0496
At4g15210	beta-amylase (BM1) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase	-1,3722	0,0372
At2g46750	FAD-binding domain-containing protein	-1,3605	0,0166
At2g18300	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1,3605	0,0264
At1g22890	expressed protein	-1,3560	0,0301
At1g32450	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-1,3452	0,0198
At1g54010	myrosinase-associated protein	-1,3334	0,0199
At2g06850	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	-1,3270	0,0182
At5g22580	expressed protein	-1,3086	0,0088
At5g25460	expressed protein	-1,3080	0,0199
At5g03120	expressed protein	-1,2998	0,0081
At3g10720	pectinesterase	-1,2878	0,0138
At2g41810	expressed protein	-1,2823	0,0090
At5g39180	germin-like protein	-1,2788	0,0088
At4g26010	peroxidase, putative peroxidase ATP13a	-1,2780	0,0246
At1g19670	coronatine-responsive protein / coronatine-induced protein 1 (COR1)	-1,2761	0,0195
At4g02270	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	-1,2667	0,0201
At3g44860	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-1,2657	0,0371
At1g49860	glutathione S-transferase	-1,2593	0,0260
At5g11420	expressed protein	-1,2517	0,0107
At1g78450	SOUL heme-binding family protein weak similarity to SOUL protein	-1,2508	0,0147
At3g19710	branched-chain amino acid aminotransferase	-1,2477	0,0054
At4g33790	acyl CoA reductase	-1,2431	0,0054
At5g60950	phytochelatin synthetase-related	-1,2405	0,0110
At5g61160	transferase family protein	-1,2264	0,0102
At3g03190	glutathione S-transferase	-1,2190	0,0055
At4g29905	expressed protein	-1,2028	0,0406
At1g55260	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,2019	0,0355

Entre los genes que presentan un valor de inducción mayor a 2,3 veces en respuesta a CFB, se encuentra un gran número de genes que codifican glutation-S-transferasas, UDP-glucosiltransferasas, oxidoreductasas y citocromos P-450 (tabla III). Estos resultados sugieren que el CFB actúa principalmente como un compuesto tóxico en *Arabidopsis* ya que la mayoría de genes inducidos por CFB codifican proteínas con función detoxificadora. Además, aparecen varios genes con función desconocida y cuatro genes que codifican FT (At5g18270, At2g47190, At2g46680 y At2g38340) (tabla III). Entre los genes con un valor de represión menor a 0,43 se encuentran genes que codifican proteínas con funciones más variadas, relacionadas mayoritariamente con defensa como defensinas e inhibidores de proteínasa, proteínas de defensa contra patógenos, proteínas de la familia de las jacalinas similares a las proteínas de unión a mirosinas, LTPs, proteínas similares a germinas, proteínas implicadas en la modificación de la pared celular como expansinas y xiloglucano endotransglucosilasas, otras con función desconocida y dos FTs (At4g36540 y At2g18300) (tabla IV). Este hecho sugiere que el tratamiento con CFB reprime genes implicados presumiblemente, en la activación de mecanismos de defensa basal e inducida contra patógenos e insectos.

5.2. Validación del análisis transcriptómico.

Con el propósito de comprobar los datos obtenidos en el análisis transcriptómico se seleccionaron dos genes de los 295 genes que presentaban un valor de inducción superior a 0,678 (en \log_2). Concretamente se comprobó mediante análisis Northern la expresión del gen *KAT2* (\log_2 inducción = 0,7405) y del gen *nitrilasa 2* (*NIT2*) (At3g44300) cuyo valor de inducción en \log_2 fue de 2,0692. Como se muestra en la figura 43.A, la expresión de los genes *KAT2* y *NIT2* en cada una de las réplicas analizadas por Northern blot dio un patrón de inducción similar al obtenido en el análisis transcriptómico, corroborando la validez de los datos obtenidos en éste. A pesar de que el CFB induce la expresión de los genes *PEX*, en este análisis transcriptómico no se seleccionó ningún gen codificante de peroxinas. El estudio de los valores de la señal original de cada gen *PEX* en la micromatriz reveló, para la mayoría de ellos, valores de señal débiles que en algunos casos resultó ser muy próxima al umbral de señal de fondo, valores de cambio en \log_2 entre 0 y 0,5 y p-valores (FDR) altos. Dado que se había detectado previamente en este trabajo un aumento de la expresión de *PEX1* en respuesta a CFB, se analizó la expresión del gen *PEX1* por RT-PCR cuantitativa en las distintas réplicas utilizadas para el análisis transcriptómicos. Se observó un aumento

de la expresión del gen *PEX1* en las tres réplicas, sugiriendo que a pesar de no aparecer expresados diferencialmente en el análisis transcriptómico, el CFB induce la expresión de algunos genes *PEX*.

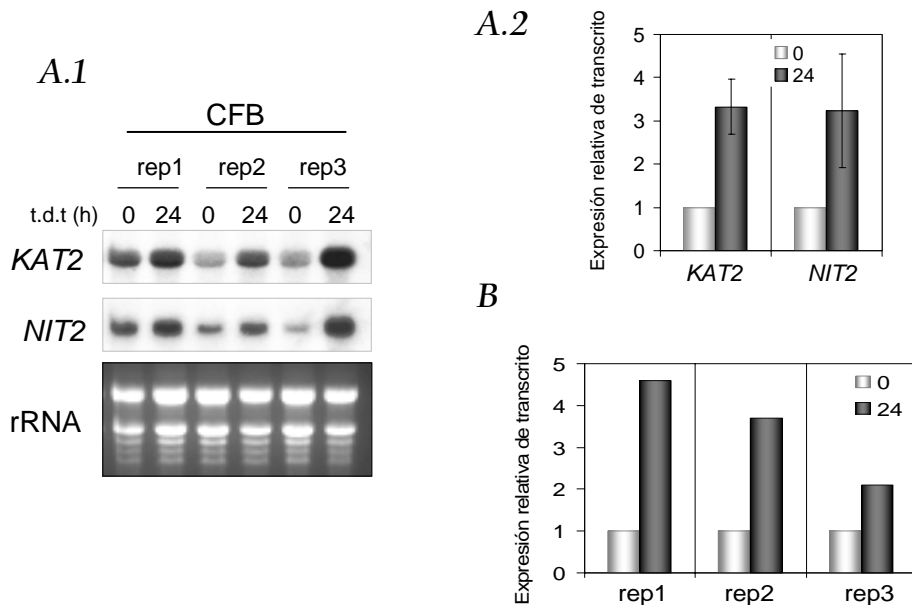


Figura 43. Nivel de expresión de los genes *KAT2*, *nitrilasa 2 (NIT2)* y *PEX1* en las réplicas del análisis de micromatrices en respuesta al CFB.

Plántulas de 11 días cultivadas en medio líquido MS con 0,5 % sacarosa (p/v) fueron tratadas con CFB 2 mM y se analizó la respuesta a las 24 horas post-tratamiento (t.d.t.). **A.** Análisis de la expresión de los genes *KAT2* y *NIT2*, incluidos en la selección de genes que presentan inducción en respuesta al CFB (1) Análisis Northern blot. Se han utilizado sondas radiactivas específicas para cada gen y se incluye la tinción del rRNA con bromuro de etidio como control de carga. (2) Representación gráfica que muestra los niveles relativos de transcrito cuantificados y normalizados al contenido de rRNA correspondiente en cada muestra. Cada barra representa la media \pm EE de los 3 experimentos independientes (rep) que se han utilizado en el análisis transcriptómico. **B.** Representación gráfica de los niveles de expresión obtenidos por RT-PCR cuantitativa del gen *PEX1* en los 3 experimentos independientes (rep) que se han utilizado en el análisis transcriptómico. Los valores se muestran normalizados según los niveles de *ACT2/8* determinados en las mismas muestras.

5.3. Ontologías génicas diferencialmente representadas en respuesta a CFB.

Finalmente, se investigaron las categorías funcionales que estaban diferencialmente expresadas en respuesta a CFB utilizando herramientas de ontología génica como FatiGO+ (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>; Al-Shahrour et al., 2004; 2007). El análisis fue realizado con los 295 genes cuya expresión aumentaba significativamente en respuesta a CFB y con los 309 cuya expresión disminuía (seleccionados en el apartado 5.1.). Las categorías biológicas sobrerrepresentadas en los genes inducidos en respuesta al CFB incluyen principalmente aquellas relacionadas con estrés, entre las que se incluyen las categorías de estrés oxidativo, catabolismo de toxinas y transporte electrónico (tabla V). Estas categorías biológicas incluyen una amplísima representación de genes relacionados con estrés oxidativo como NADP-oxidoreductasas, glutathion peroxidasas, glutathion-S-transferasas y citocromos P450. De manera concordante, entre las funciones moleculares sobrerrepresentadas en respuesta al CFB aparecen múltiples funciones relacionadas con estrés oxidativo y con las respuestas típicas de detoxificación de xenobióticos, entre las que se encuentran nuevamente el mismo tipo de enzimas con funciones antioxidantes (tabla V). Estos resultados sugieren que el efecto del CFB en *Arabidopsis* está más relacionado con las respuestas de detoxificación producidas por su función como xenobiótico (Coleman et al., 1997; Sheweita et al., 2000; Iyanagi et al., 2007) que como un proliferador de peroxisomas. De hecho, genes implicados en la biogénesis de peroxisomas no están representados entre las categorías sobrerrepresentadas en respuesta a CFB. Otras categorías biológicas sobrerrepresentadas entre los genes inducidos están relacionadas con las respuestas a otro tipo de factores de estrés como el déficit hídrico o respuesta al calor, en cuyo caso la categoría muestra una amplia representación de proteínas de choque térmico (HSP). Además, entre las categorías funcionales aparecen varias relacionadas con la unión a oxígeno, a DNA, a grupos hemo, a metales/iones y a ATP (tabla V). Por último, referente a la localización subcelular, hay una sobrerrepresentación entre los genes inducidos por CFB de aquellos que codifican proteínas localizadas en las membranas y en orgánulos con membrana, sugiriendo que las vías de señalización activadas por CFB o el efecto producido por este compuesto recae finalmente en proteínas de membrana o asociadas a ésta.

Tabla V. Ontologías génicas diferenciales en respuesta a CFB obtenidas por FatiGO+.

Se muestra la ontología génica (biológica, molecular y celular), el p-valor (FDR) y el nivel de la categoría según el Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

Categorías sobrerrepresentadas en los genes inducidos en respuesta a CFB

Procesos biológicos. Términos no redundantes	p-valor FDR	Nivel
Respuesta a estrés oxidativo	1,18e ⁻⁰⁴	4
Respuesta al calor	2,11e ⁻⁰²	4
Respuesta al déficit hídrico	4,94e ⁻⁰²	4
Transporte electrónico	2,10e ⁻⁰³	5
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	3,68e ⁻⁰³	5
Catabolismo de toxinas	1,13e ⁻⁰³	6
Oxidación de ácidos grasos	1,91e ⁻⁰²	8
Fosforilación de aminoácidos en proteínas	2,45e ⁻⁰²	8
Función molecular. Términos no redundantes	p-valor FDR	Nivel
Unión a oxígeno	4,66e ⁻⁰³	3
Unión a grupos hemo	3,98e ⁻⁰³	4
Actividad monooxigenasa	1,38e ⁻⁰²	4
Actividad glutatión peroxidasa	1,69e ⁻⁰²	4
Unión a DNA	4,12e ⁻⁰²	4
Actividad glutatión transferasa	4,39e ⁻⁰⁵	5
Actividad UDP-glucosiltransferasa	5,02e ⁻⁰⁵	5
Actividad oxidoreductasa	1,29e ⁻⁰²	5
Actividad hidrolasa IAA	2,11e ⁻⁰²	5
Unión a ATP	1,39e ⁻⁰⁴	6
Unión a metales/iones	1,85e ⁻⁰³	6
Actividad alcohol dehidrogenasa	2,44e ⁻⁰²	6
Auxina: Actividad simportador hidrógeno	4,96e ⁻⁰²	7
Actividad protein serina/treonina quinasa	6,15e ⁻⁰³	7
Componentes celulares. Términos no redundantes	p-valor FDR	Nivel
Órganulos con membrana intracelulares	8,68e ⁻⁰⁴	4
Integral de membrana	6,62e ⁻⁰³	5

Categorías sobrerrepresentadas en los genes reprimidos en respuesta a CFB

Procesos biológicos. Términos no redundantes	p-valor FDR	Nivel
Metabolismo de biopolímeros	1,01e ⁻⁰⁴	5
Transporte de lípidos	3,57e ⁻⁰⁴	5
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	2,39e ⁻⁰³	5
Metabolismo del fósforo	3,48e ⁻⁰²	5
Metabolismo de proteínas celulares	1,93e ⁻⁰²	6
Organización de la pared celular y organogénesis	2,11e ⁻⁰²	7
Biosíntesis y metabolismo de glucosinolatos	1,85e ⁻⁰³	9

Categorías sobrerrepresentadas en los genes reprimidos en respuesta a CFB (continuación)

Función molecular. Términos no redundantes	p-valor FDR	Nivel
Unión a lípidos	1,39e ⁰³	3
Unión a ácidos nucleicos	4,27e ⁰³	3
Actividad carbono-oxígeno liasa	8,27e ⁰³	4
Unión a ATP	2,42e ⁰²	6
Actividad quitinasa	3,17e ⁰²	6
Componentes celulares. Términos no redundantes	p-valor FDR	Nivel
Sistema endomembrana	1,06e ⁰⁷	4
Superficie celular (sensu Magnoliophyta)	5,14e ⁰³	4
Pared celular (sensu Magnoliophyta)	1,04e ⁰²	5
Anclado a membrana	2,29e ⁰²	5
Mitocondria	4,90e ⁰²	5

Tabla VI. Relación de genes incluidos en las categorías biológicas sobrerrepresentadas en los genes inducidos por CFB obtenidas por FatiGO+.

Se muestra para cada gen la anotación AGI, la descripción, el valor medio de la inducción en log₂ en las tres réplicas analizadas y el p-valor corregido por FDR.

AGI	Descripción	Inducción	p-valor (FDR)
Respuesta a estrés oxidativo			
At5g16980	NADP-dependent oxidoreductase	1,9999	0,0036
At5g16970	NADP-dependent oxidoreductase	1,7306	0,0048
At5g17000	NADP-dependent oxidoreductase	1,2224	0,0088
At2g29500	17,6 kDa class I small heat shock protein	1,1344	0,0127
At4g11600	glutathione peroxidase	0,9969	0,0096
At4g31870	glutathione peroxidase	0,9815	0,0295
At1g07400	17,8 kDa class I heat shock protein	0,9750	0,0159
At3g04120	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,9598	0,0322
At2g31570	glutathione peroxidase	0,8600	0,0170
At2g41480	peroxidase	0,7824	0,0199
At1g75280	isoflavone reductase	0,7153	0,0115
At4g33420	peroxidase	0,6916	0,0131
Respuesta al calor			
At1g53540	17,6 kDa class I small heat shock protein	1,2794	0,0110
At4g10250	22,0 kDa ER small heat shock protein	1,1402	0,0090
At2g29500	17,6 kDa class I small heat shock protein	1,1344	0,0127
At1g74310	heat shock protein 101 (HSP101)	1,0361	0,0415
At1g07400	17,8 kDa class I heat shock protein	0,9750	0,0159
At3g04120	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,9598	0,0322
Respuesta al déficit hídrico			
At2g33380	calcium-binding RD20 protein (RD20) i	1,5929	0,0054
At2g46680	homeobox-leucine zipper protein 7	1,2782	0,0113
At2g47190	myb family transcription factor (MYB2)	1,2737	0,0210
At3g50970	dehydrin xero2 (XERO2) / low-temperature-induced protein LTI30	0,8796	0,0314
At3g11410	protein phosphatase 2C	0,7040	0,0157

AGI	Descripción	Inducción	p-valor (FDR)
Transporte electrónico			
At3g28740	cytochrome P450 family protein	2,4745	0,0058
At1g69880	thioredoxin	2,2343	0,0041
At2g45570	cytochrome P450 76C2	1,7017	0,0110
At3g22370	alternative oxidase 1a	1,6618	0,0210
At4g37370	cytochrome P450	1,6539	0,0166
At3g48300	cytochrome P450 family protein s	1,5442	0,0033
At1g62570	flavin-containing monooxygenase family protein	1,2771	0,0087
At3g51840	short-chain acyl-CoA oxidase identical to Short-chain acyl CoA oxidase	1,2764	0,0136
At5g40370	glutaredoxin	1,2215	0,0054
At4g15760	monooxygenase	1,2207	0,0280
At5g22140	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	1,1437	0,0451
At4g20860	FAD-binding domain-containing protein	1,1309	0,0166
At4g19230	cytochrome P450 family protein	1,0901	0,0385
At1g64940	cytochrome P450	1,0500	0,0067
At2g15780	glycine-rich protein	1,0241	0,0355
At2g12190	cytochrome P450	0,9767	0,0104
At3g14640	cytochrome P450	0,9698	0,0088
At3g14690	cytochrome P450	0,9175	0,0187
At4g05020	NADH dehydrogenase-related similar to alternative NADH-dehydrogenase	0,8474	0,0110
At4g10040	cytochrome c	0,8153	0,0100
At1g64950	cytochrome P450	0,7689	0,0212
At3g14620	cytochrome P450	0,7586	0,0186
At5g61320	cytochrome P450	0,7351	0,0147
At4g37310	cytochrome P450	0,6830	0,0394
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos			
At1g10585	expressed protein	2,7340	0,0041
At2g38340	AP2 domain-containing transcription factor	1,7477	0,0415
At5g18270	no apical meristem (NAM) family protein	1,3601	0,0054
At2g46680	homeobox-leucine zipper protein 7	1,2782	0,0113
At1g52890	no apical meristem (NAM) family protein	1,1075	0,0220
At2g07671	H ⁺ -transporting two-sector ATPase	1,1059	0,0090
At3g04070	no apical meristem (NAM) family protein	1,0961	0,0088
At1g77450	no apical meristem (NAM) family protein	0,9855	0,0108
At3g56980	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	0,9511	0,0369
At1g35540	transcriptional factor B3 family protein/auxin-responsive factor AUX/IAA-related	0,8713	0,0170
At1g27000	bZIP family transcription factor	0,8695	0,0305
At2g40200	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	0,7860	0,0211
At3g61890	homeobox-leucine zipper protein 12	0,7596	0,0234
At3g48920	myb family transcription factor	0,7525	0,0144
At3g51960	bZIP family transcription factor	0,7081	0,0361
At3g56970	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	0,7024	0,0415
Catabolismo de toxinas			
At2g29490	glutathione S-transferase	2,4492	0,0026
At2g29420	glutathione S-transferase	1,8522	0,0054
At2g29460	glutathione S-transferase	1,6390	0,0182
At2g29480	glutathione S-transferase	1,5244	0,0105
At2g02390	glutathione S-transferase zeta 1	1,0095	0,0109
Oxidación de ácidos grasos			
At3g51840	short-chain acyl-CoA oxidase identical to Short-chain acyl CoA oxidase	1,2764	0,0136
At2g42790	citrate synthase, glyoxysomal	0,7990	0,0124
At2g33150	acetyl-CoA C-acyltransferase, putative / 3-ketoacyl-CoA thiolase	0,7405	0,0480

Tabla VII. Relación de genes incluidos en las categorías biológicas sobrerrepresentadas en los genes reprimidos por CFB obtenidas por FatiGO+.

Se muestra para cada gen la anotación AGI, la descripción, el valor medio de la inducción en log₂ en las tres réplicas analizadas y el p-valor corregido por FDR.

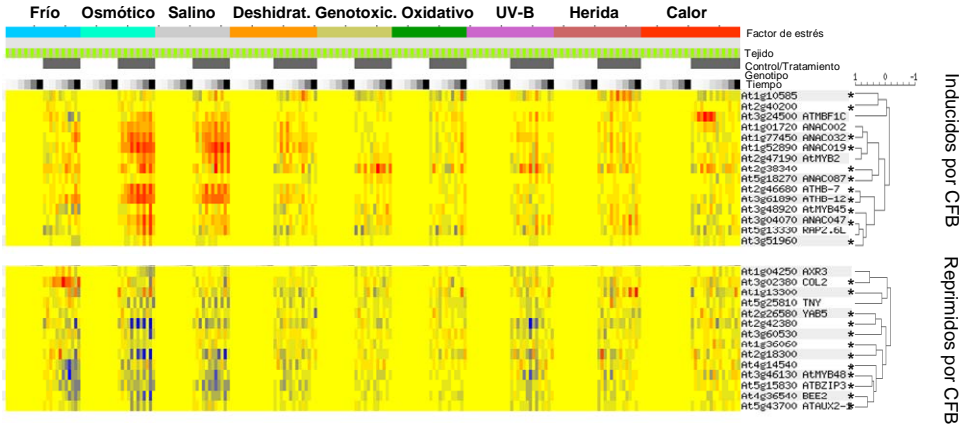
AGI	Descripción	Represión	p-valor (FDR)
Metabolismo de biopolímeros			
At4g15290	cellulose synthase family protein	-1,0913	0,0071
At1g47580	lipoyltransferase	-1,0325	0,0110
At3g12710	methyladenine glycosylase family protein	-0,8683	0,0110
At1g65190	protein kinase family protein	-0,8418	0,0355
At1g77870	expressed protein similar to geranylgeranylated protein ATGP4	-0,7709	0,0110
At4g00970	protein kinase family protein	-0,7022	0,0210
At2g41820	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	-0,7008	0,0127
Transporte de lípidos			
At5g05960	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,7078	0,0033
At2g10940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,5692	0,0365
At1g55260	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,2019	0,0355
At4g12550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1,0145	0,0488
At2g38540	nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1)	-0,9484	0,0088
At4g12510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,9036	0,0170
At4g00165	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,8974	0,0440
At3g51600	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)	-0,8512	0,0100
At3g43720	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,7939	0,0442
At4g15050	expressed protein	0,0323	0,8810
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos			
At4g36540	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1,3891	0,0148
At2g18300	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1,3605	0,0264
At5g63160	speckle-type POZ protein-related	-1,1930	0,0500
At3g46130	myb family transcription factor (MYB48)	-1,0543	0,0343
At5g15830	bZIP transcription factor family protein	-0,9286	0,0081
At3g12710	methyladenine glycosylase family protein	-0,8683	0,0110
At2g42380	bZIP transcription factor family protein	-0,8440	0,0127
At4g38970	fructose-bisphosphate aldolase	-0,8295	0,0199
At4g14540	CCAAT-box binding transcription factor subunit B	-0,8235	0,0288
At2g26580	plant-specific transcription factor YABBY family protein	-0,8223	0,0147
At1g13300	myb family transcription factor contains Pfam domain	-0,8121	0,0183
At3g60530	zinc finger (GATA type) family protein	-0,7755	0,0127
At1g36060	AP2 domain-containing transcription factor	-0,6856	0,0125
Metabolismo del fósforo			
At1g65190	protein kinase family protein	-0,8418	0,0355
At4g00970	protein kinase family protein	-0,7022	0,0210
At2g41820	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	-0,7008	0,0127
Metabolismo de proteínas celulares			
At2g27420	cysteine proteinase	-1,1623	0,0090
At1g62290	aspartyl protease family protein	-1,1399	0,0077
At1g47580	lipoyltransferase, putative similar to lipoyltransferase (LIP2p)	-1,0325	0,0110
At4g30610	serine carboxypeptidase S10 family protein	-1,0315	0,0186
At5g58260	expressed protein	-0,9481	0,0258
At5g43700	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 4 (IAA4)	-0,9319	0,0109
At3g43960	cysteine proteinase	-0,9174	0,0198
At1g65190	protein kinase family protein contains similarity to protein kinases	-0,8418	0,0355
At5g59090	subtilase family protein	-0,7841	0,0186
At1g77870	expressed protein similar to geranylgeranylated protein ATGP4	-0,7709	0,0110
At1g79720	aspartyl protease family protein	-0,7477	0,0248
At2g27920	serine carboxypeptidase S10 family protein	-0,7207	0,0241
At4g00970	protein kinase family protein	-0,7022	0,0210
At2g41820	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	-0,7008	0,0127

AGI	Descripción	Represión	p-valor (FDR)
Organización de la pared celular y organogénesis			
At1g26250	proline-rich extensin	-1,4791	0,0337
At1g21310	proline-rich extensin-like family protein	-0,8608	0,0166
At2g24980	proline-rich extensin-like family protein	-0,8269	0,0297
At1g20190	expansin	-0,8012	0,0102
At4g08410	proline-rich extensin-like family protein	-0,7308	0,0412
At2g21140	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-0,7079	0,0453
Biosíntesis y metabolismo de glucosinolatos			
At5g23010	2-isopropylmalate synthase 3 (IMS3)	-1,0737	0,0105
At4g13770	cytochrome P450 family protein	-0,9870	0,0073
At1g16410	cytochrome P450	-0,9652	0,0138
At4g03060	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	-0,7109	0,0295

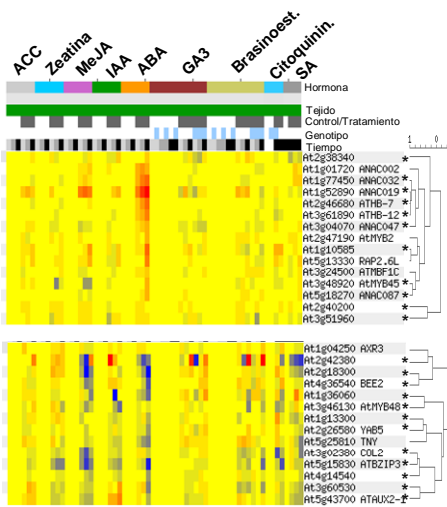
Entre las categorías sobrerrepresentadas en los genes reprimidos por CFB, se encuentran aquellas biológicamente relacionadas con varios aspectos del metabolismo primario que incluye el metabolismo de biopolímeros, de fósforo, de proteínas y de ácidos nucleicos, y otras potencialmente relacionadas con las respuestas de defensa contra patógenos que incluiría el metabolismo de glucosinolatos y organización de la pared celular (Narváez-Vásquez et al., 2005; Yan y Chen, 2007) (tabla V). La totalidad de genes que incluye la categoría de organización de la pared celular codifican extensinas ricas en prolina (tabla VII). Entre los genes incluidos en las categorías biológicas relacionadas con el metabolismo de biopolímeros, de fósforo y de glucosinolatos, se encuentra una amplia representación de genes que codifican proteína quinasa (tabla VII). Otra de las categorías biológicas sobrerrepresentadas entre los genes reprimidos se relaciona con el transporte de lípidos, y correlacionando con esta función, una de las categorías funcionales sobrerrepresentada se relaciona con la unión a lípidos (tabla V). Esta categoría está formada en su totalidad por proteínas LTP, que presentan funciones muy variadas en plantas (Carvalho y Gomes, 2008). Por otro lado, el CFB produce una represión diferencial en los genes que codifican proteínas localizadas en membranas o en orgánulos, ya que las categorías sobrerrepresentadas que indican la localización subcelular muestra una representación de proteínas asociadas a pared celular, membrana u orgánulos como mitocondrias.

La categoría biológica relacionada con el metabolismo de nucleótidos, nucleósidos y ácidos nucleicos aparece diferencialmente representada en respuesta al CFB tanto en el grupo de los genes inducidos como en el de genes reprimidos, sugiriendo que el CFB interviene activando y reprimiendo componentes reguladores de vías de señalización de manera diferencial (tablas VI y VII). Dentro de esta categoría biológica aparece un gran número de FT, con una alta representación de la familias NAC (At5g18270, At1g52890, At3g04070 y At1g77450), bHLH (At3g56980, At2g40200 y At3g56970, At4g36540 y At2g18300) y bZIP (At1g27000, At3g51960, At5g15830 y At2g42380). Los FT de la familia NAC intervienen en funciones muy variadas que incluyen múltiples aspectos del desarrollo y de la defensa de las plantas (Olsen et al., 2005). Curiosamente, ningún gen de la familia NAC se encuentra entre los genes reprimidos por CFB (tablas VI y VII). Con el propósito de analizar la posible correlación entre las vías de señalización activadas o reprimidas por CFB con las respuestas a estrés en *Arabidopsis*, se analizó el perfil de expresión de todos los FT diferencialmente expresados en respuesta a CFB utilizando la herramienta *Expression Browser* de la base de datos BAR (http://bbc.botany.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy_db_exprss_browser_in.cgi; Toufighi et al., 2005), que permite analizar los perfiles de expresión de un conjunto de genes que serán agrupados jerárquicamente en respuesta a diferentes factores de estrés, hormonas o patógenos. Como se observa en la figura 44, existe una amplia correlación entre las respuestas a CFB y las respuestas a diferentes factores de estrés, dándose la máxima correlación con las respuestas a estrés osmótico e hídrico, ya que la mayoría de *FT* que son diferencialmente inducidos o reprimidos por CFB también lo son en el mismo sentido por estos factores de estrés. Entre las hormonas, la máxima correlación se produjo con ABA entre los FT inducidos y con MeJA y ABA entre los FT reprimidos por CFB. Además, se observó una buena correlación entre los FTs regulados por CFB y las respuestas a patógenos biotrofos y necrotrofos, ya que prácticamente todos los FTs inducidos o reprimidos por CFB, lo hacen de igual manera en respuesta a *Pseudomonas* y *Botrytis* (figura 44). Estos resultados sugieren que las vías de señalización activadas por CFB actúan sobre los mismos reguladores transcripcionales que controlan las rutas de señalización activadas en respuesta a múltiples factores de estrés y en respuesta a hormonas implicadas en defensa, y por tanto, que la planta percibe al CFB como un factor de estrés.

A



B



C

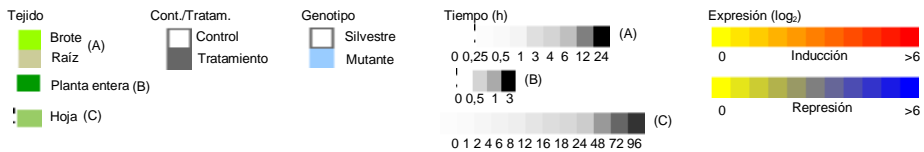
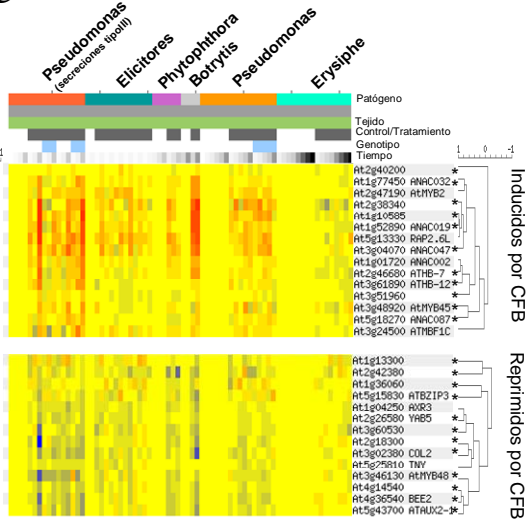


Figura 44. Perfiles de expresión de los factores de transcripción diferencialmente expresados por CFB en respuesta a diferentes factores de estrés y hormonas.

Los perfiles de expresión se han obtenido con la herramienta *Expression Browse* de la base de datos transcriptómicos BAR (http://bbc.botany.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy_db_exprss_browser_in.cgi; Toufighi et al., 2005). Se incluyen los perfiles de expresión de los FT inducidos por CFB (paneles superiores) y reprimidos por CFB (paneles inferiores) en respuesta a varios factores de estrés abióticos (A), tratamientos hormonales (B) o patógenos (C). Se muestra la representación gráfica de los datos normalizados en base logarítmica junto al código AGI y el nombre de cada gen. Se indican con un asterisco aquellos FT que están incluidos entre los genes de la categoría funcional “Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos” sobrerrepresentada en respuesta a CFB.

Discusión

1. Función del gen *KAT2* en defensa y desarrollo.

La β -oxidación es un proceso metabólico esencial para todos los organismos que ha sido estudiado principalmente en animales. Tradicionalmente, esta ruta catabólica ha sido considerada en plantas como la vía principal de degradación de ácidos grasos en las células, y asociada a esta actividad, los mutantes con pérdida de función en algún gen de β -oxidación muestran alteraciones en el desarrollo postgerminativo de las semillas. Sin embargo, la gran diversidad de substratos susceptibles de β -oxidación y otros fenotipos encontrados en los mutantes relacionados tanto con el desarrollo como con las respuestas a estrés, han otorgado a la β -oxidación un papel esencial en la embriogénesis, germinación, desarrollo vegetativo y reproductivo y en la defensa de las plantas (revisado por Baker et al., 2006; Poirier et al., 2006; Rottensteiner y Theodoulou, 2006; Goepfert y Poirier, 2007). De todos los pasos enzimáticos implicados, la familia de las KAT, catalizadoras del tercer paso de β -oxidación, son las enzimas y genes menos estudiados. El genoma de *Arabidopsis* contiene tres genes *KAT* con una gran similitud entre ellos. Los datos transcriptómicos depositados públicamente (Genevestigator, *Arabidopsis* eFP Browse) y los datos de ESTs (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>), indican que el gen *KAT2* presenta niveles de expresión muy superiores a sus otros dos ortólogos en todos los tejidos (figura 6.A y 7.A). Este hecho, junto con los fenotipos observados en el mutante *ped1/kat2* y la coexpresión de este gen con otros del metabolismo de β -oxidación, a diferencia de *KAT5* (Carrie et al., 2007), sugieren que *KAT2* codifica la proteína con la función KAT mayoritaria en β -oxidación en *Arabidopsis* (Footitt et al., 2007a). En estudios previos a este trabajo, se habían descrito varios fenotipos asociados a la deficiencia en el gen *KAT2* que incluían requerimiento de un aporte externo de sacarosa para el correcto desarrollo de la plántula, germinación disminuida, acumulación de ácidos grasos de cadena larga (C16-C20), peroxisomas morfológicamente alterados, acumulación de cuerpos lipídicos, resistencia a 2,4-DB y resistencia al IBA (Hayashi et al., 1998b; Zolman et al., 2000; Germain et al., 2001). Sin embargo, quedaba por determinar la posible implicación de los genes *KAT* en las respuestas de defensa y en otros procesos del desarrollo como la senescencia o el desarrollo floral. Por este motivo, este trabajo se ha centrado en la caracterización molecular y funcional de los distintos genes *KAT*, y concretamente del gen *KAT2*, en estos aspectos del desarrollo y la defensa. Para ello, se generaron una serie de plantas transgénicas que nos han permitido caracterizar en mayor profundidad el papel de este gen en *Arabidopsis*.

1.1. La expresión de los genes *KAT* es regulada espacial y temporalmente a lo largo del ciclo biológico de *Arabidopsis*.

1.1.1. La expresión del gen *KAT2* en plántulas correlaciona con la función esencial de *KAT2* durante el desarrollo postgerminativo de las semillas.

La β -oxidación de ácidos grasos derivados de la movilización de lípidos de reserva es la actividad predominante durante la germinación y desarrollo postgerminativo de las semillas (Baker et al., 2006). El acetil-CoA producido por β -oxidación es metabolizado a través del ciclo del glioxilato y de la gluconeogénesis para dar lugar finalmente a sacarosa que proporciona la energía que sustenta el crecimiento de la planta hasta que los cotiledones llegan a ser fotosintéticamente activos (Beevers, 1961; Trelease, 1984; Gerhardt, 1992; Graham y Eastmond, 2002). Esta degradación requiere de altos niveles de actividad de las enzimas correspondientes y correlaciona con un aumento de la expresión de los genes de β -oxidación en este tejido (Kato et al., 1996; Hayashi et al., 1998a; 1998b; Hooks et al., 1999; 2002; Eastmond y Graham, 2000; Eastmond et al., 2000b; Germain et al., 2001; Rylott et al., 2001). En este sentido, aunque se había descrito que la expresión de todos los genes de β -oxidación era regulada coordinadamente durante la germinación y desarrollo posterior (Rylott et al., 2001), los datos transcriptómicos mostrados indicaban que de todos los genes *KAT*, únicamente la expresión del gen *KAT2* aumentaba durante el desarrollo postgerminativo temprano (figura 9.A). Este dato coincide con el hecho de que, como se ha descrito previamente, el gen *KAT2* codifica la isoenzima KAT que participa en mayor medida en la germinación de las semillas y en el desarrollo postgerminativo temprano (Kato et al., 1996; Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001). El patrón de actividad GUS detectado en plántulas *KAT2::GUS* a lo largo del desarrollo postgerminativo indicaba que el gen *KAT2* se expresa en el hipocotilo y en los cotiledones principalmente (figura 9.B), órgano que junto al endospermo son el tejido de reserva de las semillas (Beevers, 1982). En el mutante *kat2* se observa un acortamiento severo en la longitud del hipocotilo en plántulas de 5 días cultivadas en oscuridad tanto en medios con sacarosa como sin fuente externa de azúcares (Lange et al., 2004), sugiriendo que la expresión del gen *KAT2* en el hipocotilo es esencial para un desarrollo correcto. Las plántulas de tres días mostraron diferencias en el patrón de tinción del hipocotilo, observándose plántulas con una zona central del hipocotilo sin tinción (figura 9.C). El mismo patrón de expresión discontinuo se ha observado también en plántulas *AIM1::GUS* (Richmond y Blecker,

1999) y en plántulas de 4 días *ACX1::GUS* y *ACX1::YFP-PTS1* (Schillmiller et al., 2007), sugiriendo una regulación similar de la expresión de los genes *ACX1*, *AIM1* y *KAT2* durante el desarrollo postgerminativo de las semillas. Sin embargo, este patrón no se observó en todas las plántulas, y por tanto, otro tipo de regulación más específica y más finamente controlada debe dar lugar a las diferencias observadas. Las plantas transgénicas *KAT2as* mostraron un fuerte retraso de la parte aérea y de la raíz durante el desarrollo postgerminativo en ausencia de una fuente de carbohidratos en el medio de cultivo (figura 10), fenotipo similar al descrito en el mutante *ped1/kat2* (Hayashi et al., 1998b), y que demuestra la esencialidad de la expresión del gen *KAT2* para el correcto establecimiento de la plántula. De hecho, se ha comprobado que la proteína KAT5 complementa sólo parcialmente el fenotipo del mutante *ped1/kat2* durante el desarrollo postgerminativo (Germain et al., 2001), sugiriendo que ambas enzimas no tienen funciones totalmente redundantes en el metabolismo de ácidos grasos de plantas. En algunos mutantes de β -oxidación, entre ellos *ped1/kat2*, se han descrito defectos en germinación independientes de la adición exógena de sacarosa (Russell et al., 2000; Footitt et al., 2002; Pinfield-Wells et al., 2005; Pracharoenwattana et al., 2005; Footitt et al., 2006). Sin embargo, las plantas transgénicas *KAT2as* no mostraron diferencias en el porcentaje de germinación con respecto a las plantas silvestres. Este resultado coincide con los mostrados originariamente para el mutante *ped1/kat2* (Hayashi et al., 1998b; Germain et al., 2001) pero contrasta con otro trabajo más reciente (Pinfield-Wells et al., 2005).

1.1.2. El gen *KAT2* se expresa a lo largo de todo el ciclo biológico de *Arabidopsis*.

Aunque los procesos de β -oxidación se han descrito principalmente asociados a tejidos de reserva como semillas, esta ruta es activa a lo largo del ciclo biológico de las plantas, y es operativa en una gran variedad de órganos que incluyen hojas jóvenes, hojas senescentes, inflorescencias y zonas meristemáticas de las raíces (Hooks, 2002; Charlton et al., 2005a; Goefert y Poirier, 2007). El análisis de expresión de los genes *KAT* mostró un patrón de acumulación específico del tejido y momento del desarrollo analizado. La expresión del gen *KAT2*, significativamente mayor que el resto de genes *KAT*, abarcaba tanto la fase vegetativa como reproductiva, mientras que la expresión del gen *KAT5* se restringió principalmente a los órganos florales (figura 7). El gen *KAT1*, homólogo de *KAT2*, mostró niveles de expresión muy bajos en todos los órganos, levemente superiores

en algunos órganos florales (figura 7.A). El patrón de luminiscencia emitido por plantas adultas *KAT2::LUC* en estado vegetativo, coincidente con el observado en plantas de otras líneas transgénicas *KAT2::LUC* generadas independientemente (Charlton et al., 2005a), mostraban un mayor nivel de expresión basal del gen *KAT2* en hojas jóvenes y en el centro de la roseta (figura 15, 29, 33). Concordantemente con los datos de expresión, la proteína *KAT2* se ha detectado en todos los órganos de la planta (Footitt et al., 2007a). El bajo nivel de expresión mostrado en órganos vegetativos coincide con la afirmación de que la β -oxidación de ácidos grasos no tiene una función prominente en el desarrollo vegetativo de plantas no estresadas, manteniendo únicamente en estos tejidos la tasa de recambio de los lípidos de membrana y participando en la síntesis de moléculas señalizadoras (Graham y Eastmond, 2002; Wasternack y Hause, 2002). De hecho, los mutantes de β -oxidación no tienen defectos morfológicos severos a lo largo de la fase vegetativa posterior al desarrollo postgerminativo, exceptuando el doble mutante *cts1/ped3/pxa1 ped1/kat2* que presenta graves alteraciones en el crecimiento vegetativo y en el desarrollo floral (Hayashi et al., 2002). Sin embargo, aunque en las plantas transgénicas *KAT2as* no se han detectado alteraciones en la morfología o tamaño de las distintas partes de la planta, recientemente se ha descrito que el mutante *kat2* presenta algunas anomalías morfológicas leves tanto en el desarrollo vegetativo como en el reproductivo, sugiriendo que *KAT2* regula de algún modo el desarrollo de la planta (Footitt et al., 2007a).

1.1.3. La expresión del gen *KAT2* en órganos florales presenta un patrón dinámico a lo largo del desarrollo y maduración de la flor y el fruto.

El patrón de expresión conjunto de los genes *KAT* en órganos reproductivos (figura 7) sugería una función conjunta de estos genes durante el desarrollo floral. El resto de genes de β -oxidación, *ACXs* y *MFPs*, se expresan principalmente en flores, sugiriendo que toda la β -oxidación es muy activa en órganos reproductores (Hooks et al., 1999; Richmond y Bleecker, 1999; Eastmond et al., 2000b; Eastmond y Graham, 2000; Froman et al., 2000; Rylott et al., 2001; Schmid et al., 2005; Schillmiller et al., 2007). De hecho, los peroxisomas son muy abundantes en prácticamente todos los órganos y tejidos florales (Footitt et al., 2007b; Schillmiller et al., 2007). La gran actividad de la β -oxidación en estos tejidos podría deberse a la mayor demanda energética de los órganos reproductores respecto a los órganos vegetativos, a la rápida senescencia de estos órganos o a la actividad biosintética de hormonas que actúan como marcadores moleculares de las diferentes fases

del desarrollo floral y de la senescencia, dehiscencia y abscisión de algunos órganos. Concretamente, el patrón de la actividad GUS observado en las plantas transgénicas *KAT2::GUS*, mostró una expresión elevada del gen *KAT2* en varios órganos florales, sugiriendo un patrón dinámico a lo largo del desarrollo y maduración de la flor y el fruto. La esencialidad de *KAT2* en el desarrollo floral queda patente en el fenotipo del doble mutante *cts1/ped3/pxa1 ped1/kat2*, el cual presenta flores enanas muy alteradas morfológicamente y esterilidad, patrón que no se observa en el parental *cts1/ped3/pxa1* (Hayashi et al., 2002). La falta de actividad GUS en fases tempranas del desarrollo floral previas a la antesis, parece indicar que la actividad *KAT2* no es necesaria durante la organogénesis floral, sin embargo, cuando los órganos ya están formados, la expresión de *KAT2* parecía correlacionar con el crecimiento de éstos y posterior senescencia y abscisión. En flores maduras, la expresión de *KAT2* se observó principalmente en granos de polen, filamentos de los estambres, estigma del carpelo, sépalos y nectarios (figura 8.C-F, K-N). Concordantemente, se ha detectado a la proteína *KAT2* en pétalos, sépalos, estambres y carpelos (Footit et al., 2007a) y en el proteoma específico de polen (Holmes-Davis et al., 2005; Noir et al., 2005). La fuerte expresión observada en el filamento del estambre de flores *KAT2::GUS* podría estar relacionada con la extensión de éste, ya que el mutante *kat2* presenta una reducción en la proporción de estambre extendido: pistilo en flores correspondientes al estadio 13 (Footit et al., 2007a). Sin embargo, *KAT2* no parece tener una función esencial durante el desarrollo floral en *Arabidopsis* ya que, a diferencia de las graves alteraciones detectadas en el mutante *aim1* (Richmond y Bleecker, 1999), las plantas *KAT2as* no presentan alteraciones evidentes en las flores. Alternativamente, la redundancia entre las distintas proteínas *KAT* podría suplir los defectos causados por la deficiencia en *KAT2* durante el desarrollo floral. Por otro lado, varios indicios relacionan la alta expresión del gen *KAT2* en flores con su función biosintética de JAs. En órganos reproductivos, se han encontrado niveles elevados de JA, OPDA y otros conjugados de JA en diferentes proporciones dependiendo del órgano floral y estadios ontogénicos (Yamane et al., 1982; Miersch et al., 1998; Hause et al., 2000; Wasternack y Hause, 2002), así como de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de JA (Rodríguez-Concepción y Beltrán, 1995; Hause et al., 2000; Sanders et al., 2000; Stintzi y Browse, 2000; Fukuchi-Mizutani et al., 2000; Hause et al., 2003a). El JA tiene una función esencial durante los últimos estadios del desarrollo floral, interviniendo en el desarrollo y dehiscencia de anteras, la elongación del filamento, la maduración del polen y la antesis (Turner et al., 2002; Delker et al., 2006; Wasternack, 2007, Balbi y Devoto, 2008). Los genes de biosíntesis de JA se expresan

diferencialmente en distintos órganos florales a lo largo del desarrollo floral. El patrón de expresión detectado en flores de plantas transgénicas *AOS::GUS* y *DADI::GUS* muestra una fuerte expresión de los genes *AOS* y *DADI* en los filamentos de los estambres (Kubigsteltig et al., 1999; Ishiguro et al., 2001), al igual que el gen *OPR3* (Sanders et al., 2000). Los fenotipos descritos en los mutantes deficientes en alguno de estos genes de biosíntesis, se relacionan con acortamiento de los filamentos de los estambres, un retraso en la dehiscencia de las anteras, en la maduración del polen y en la apertura de la flor, conducentes finalmente a androesterilidad, siendo estas alteraciones eliminadas por la aplicación exógena de JA (Sanders et al., 2000; Stintzi y Browse, 2000; Ishiguro et al., 2001; von Malek et al., 2002; Park et al., 2002). El gen *KAT2* se expresa fuertemente en anteras en desarrollo y en el filamento del estambre, siendo este patrón consistente con la presencia de JA en los órganos florales y con el requerimiento de JA en el desarrollo de la antera. Como se ha comentado anteriormente, el mutante *kat2* presenta una disminución en la elongación del filamento en flores del estadio 13 (Footit et al., 2007a), sin embargo, las plantas *KAT2as* o el mutante *ped1/kat2*, que presentan una menor producción de JA en respuesta a la herida (este trabajo; Castillo et al., 2004; Afithile et al., 2005), no presentan esterilidad masculina, a diferencia de otros mutantes de biosíntesis de JA. La explicación más coherente es que la deficiencia en *KAT2* no produce una eliminación total de los niveles de JAs, ya que el fenotipo de esterilidad masculina solo se ha descrito en aquellos casos donde no hay ninguna producción de JA. Por tanto, parece que otras enzimas KAT están interviniendo en la síntesis de JA en flores. En este sentido, el gen *KAT5* muestra un alto nivel de expresión en flores y podría tener, junto con *KAT2*, la función biosintética de JA necesaria para un correcto desarrollo floral. De igual forma, se ha descrito un comportamiento similar de los genes *ACX1* y *ACX5* durante el desarrollo floral. El mutante *acx1* tiene una reducción en los niveles de JA pero no presenta alteraciones en los órganos florales o en la producción de semillas, sin embargo, el doble mutante *acx1 acx5*, que tiene una eliminación total de los niveles de JA en respuesta a herida, presenta defectos en el desarrollo del polen y una menor viabilidad de las semillas que es restituida por la aplicación exógena de JA, lo que relaciona este fenotipo con la menor producción de JA de este mutante (Schillmiller et al., 2007). Concordantemente, el patrón de expresión del gen *ACX1* detectado en flores *ACX1::GUS* o *ACX1::YFP-PTS1* mostró muchas similitudes con el descrito en flores *KAT2::GUS*, incluyendo anteras, polen, estigma polinizado y en la elongación del tubo polínico (Schillmiller et al., 2007). Otra función del gen *KAT2* en el desarrollo floral podría estar relacionada con la función de la β -oxidación en la síntesis de

auxinas. Durante la morfogénesis floral, el transporte polar de auxinas controla la formación de las flores y la diferenciación (Reinhardt et al., 2003). La síntesis o acumulación de auxinas se relaciona con las anteras en desarrollo, la elongación del filamento del estambre y con el desarrollo del tubo polínico, estigma y embrión en desarrollo (Aloni et al., 2006; Feng et al., 2006). La función de las auxinas es esencial para un correcto desarrollo floral. De hecho, se han descrito fenotipos de acortamiento de los filamentos del estambre y granos de polen defectivos debidos al bloqueo del flujo de auxinas en los filamentos (Feng et al., 2006), o debido a la deficiencia en los factores de respuestas a auxinas ARF6/ARF8 (Nagpal et al., 2005). Estos fenotipos son similares a los descritos en los mutantes de biosíntesis de JA, ya que las auxinas son las inductoras de la síntesis de JA cuya función es promover la dehiscencia de las anteras (Nagpal et al., 2005). La tinción GUS detectada en las flores de plantas *KAT2::GUS* correlaciona con los órganos florales donde se ha descrito previamente tiene lugar la síntesis o acumulación de auxinas. De hecho, el patrón de expresión detectado en flores de plantas transgénicas donde el gen delator *GUS* está fusionado al promotor del elemento de respuesta a auxinas *DR5* (Aloni et al., 2006), es muy similar al descrito en plantas *KAT2::GUS*, sugiriendo que la expresión del gen *KAT2* en flores podría estar directamente relacionada con la síntesis de auxinas en estos tejidos. Esta hipótesis se apoya también en que el mutante *cts/pxa1/ped3* que presenta un acortamiento de los filamentos idéntico al descrito para el mutante *kat2*, rescata el fenotipo silvestre al aplicar exógenamente ácido naftalenacético (NAA) o IAA pero no con JA, sugiriendo que es la falta de auxinas la causante de la menor longitud del filamento del estambre (Footitt et al., 2007b). Por otro lado, tras la fertilización de las flores, el tubo polínico debe penetrar en la pared celular del estigma y desarrollarse dentro del estilo, crecimiento que conlleva una gran demanda de energía (Lord y Rusell, 2002). La tinción GUS de flores fecundadas *KAT2::GUS* parecía asociarse con el desarrollo del tubo polínico (figura 8.F-G,M). Recientemente se ha descrito que el mutante *kat2* y el mutante *cts/pxa1/ped3* muestran defectos en la germinación del polen y un acortamiento en la longitud del tubo polínico que no es rescatado por la aplicación exógena de JA o IAA, y que ocurre específicamente en medios sin sacarosa, asociando este fenotipo a un defecto en el catabolismo de lípidos de reserva (Footitt et al., 2007b). De hecho, las alteraciones en la germinación del polen y el acortamiento del tubo polínico se correlacionan con una menor fertilidad y silicuas más cortas con un mayor número de óvulos abortados, fenotipo que se observa en el mutante *kat2* y en el mutante *cts/pxa1/ped3* (Footitt et al., 2007a; 2007b). Por tanto, parece que la expresión del gen *KAT2* a lo largo del desarrollo floral, de la

fertilización y del desarrollo de las silicuas podría estar relacionado con la síntesis de JA, con la síntesis de IAA o con la provisión de energía vía catabolismo de lípidos, dependiendo del órgano o momento del desarrollo floral. Además, la función de KAT2 también podría estar relacionada con el procesamiento de otra señal distinta necesaria para un correcto desarrollo floral o con los procesos asociados a la senescencia de cada órgano. Recientemente, se ha descrito que en pétalos senescentes de varias especies de plantas se produce la activación de genes *KAT*, de otros genes de β -oxidación y del ciclo del glioxilato (Hoeberichts et al., 2007; van Doorn y Woltering, 2008). En este sentido, la función de KAT2 en los tejidos senescentes se relaciona con la función catabólica de ácidos grasos pero también podría establecer un punto de unión entre JA y auxinas en la regulación de la senescencia y la abscisión de los órganos, ya que ambas hormonas intervienen en estos procesos (Ellis et al., 2005; Nagpal et al., 2005).

1.1.4. El gen *KAT2* presenta altos niveles de expresión durante el desarrollo de las semillas.

La β -oxidación está activa en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis* que están sintetizando ácidos grasos y triacilglicéridos (Poirier et al., 1999). Esta función es esencial en los primeros estadios del desarrollo embrionario como lo demuestra la letalidad de los dobles mutantes *acx3 acx4* (Rylott et al., 2003) y *mfp2 aim1* (Rylott et al., 2006). Las silicuas de las plantas *KAT2::GUS* mostraron un patrón de tinción principalmente en los sacos embrionarios durante la maduración de las silicuas (figura 8.G-J). Concretamente, la tinción GUS fue detectada en el embrión de las semillas y en las semillas abortadas (figura 8.O-P). Correlacionando con este patrón de expresión, se han detectado niveles altos de la proteína KAT2 en silicuas en desarrollo, sugiriendo que la actividad desarrollada por KAT2 es importante durante el desarrollo de la semilla (Footitt et al., 2007a). Las silicuas de las plantas transgénicas *AIM1::GUS* muestran un patrón de tinción muy similar al detectado en las plantas *KAT2::GUS* y el mutante *aim1* presenta defectos en el desarrollo floral dando lugar a flores anormales y fertilidad muy reducida (Richmond y Bleecker, 1999). Aunque los patrones de expresión GUS fueron similares, no se observaron diferencias aparentes en las silicuas de plantas transgénicas *KAT2as*, aunque recientemente se ha descrito que el mutante *kat2* presenta una reducción en la gluconeogénesis, en el flujo de carbono hacia el ciclo del glioxilato y en la respiración durante el desarrollo del óvulo, dando lugar a una reducción del tamaño de las semillas, mayor número de óvulos abortados y menor

producción de semillas (Footitt et al., 2007a), lo que sugiere que la expresión de *KAT2* en óvulos debe estar relacionada con estas funciones. A pesar de estas diferencias, las plantas transgénicas *KAT2as* así como el mutante *ped1/kat2* (Hayashi et al., 1998b) no son letales, sugiriendo que las otras enzimas KAT están interviniendo en esta fase. De forma similar, ningún mutante simple *acx* o *mfp* muestra un fenotipo de letalidad, indicando que, durante la embriogénesis, existen funciones redundantes entre las diferentes isoenzimas participantes de cada paso de β -oxidación, y que, posiblemente, dobles o triples mutantes *kat* si presentan letalidad embrionaria debido a la esencialidad de la β -oxidación durante esta etapa.

1.2. Los genes *KAT* forman parte de las respuestas a herida en *Arabidopsis* y constituyen un punto esencial para la activación de las respuestas dependientes de JA.

1.2.1. Los genes *KAT* activan su expresión en respuesta a la herida por vías de señalización que difieren en la participación de JA.

La herida causada por insectos origina una cascada de señalización molecular conducente a la producción de compuestos implicados en la disuasión del insecto, reparación del daño y a la activación de resistencia. Este hecho implica la existencia de complejas redes de señalización molecular que son capaces de generar, transportar e interpretar las señales producidas por la interacción planta-insecto (Schilmiller y Howe, 2005). El JA es la molécula señalizadora más importante en la activación de las respuestas de defensa frente a herida causada por insectos o herbívoros (Howe, 2004; Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack et al., 2006), aunque también se han descrito otras vías de señalización independientes de JA (León et al., 2001; Howe, 2004). La regulación de la vía dependiente de JA en respuesta a la herida es diferente en *Arabidopsis* y en solanáceas. Mientras que en *Arabidopsis*, la vía dependiente de JA es reprimida a nivel local por la acción de Et y, en cambio, permanece totalmente activa a nivel sistémico (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1999; León et al., 2001), en solanáceas, ABA, Et, H₂O₂ y OGAs actúan induciendo la síntesis de JA y la expresión de genes dependientes de JA en respuesta a herida (Bishop et al., 1981; Peña-Cortes et al., 1989; 1995; Hildman et al., 1992; Doares et al., 1995b; O'Donnell et al., 1996; Carrera y Prat, 1998; Orozco-Cárdenas et al., 1999;

2001). En este trabajo, se ha analizado si los genes *KAT* y por tanto la β -oxidación intervienen en las respuestas a herida en *Arabidopsis*, y más concretamente, a través de que vías de señalización activan su expresión. Además, ya que previamente se había descrito mediante aproximaciones bioquímicas, que la β -oxidación intervenía en la síntesis de JA (revisado por Miersch y Wasternack, 2000; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002), se analizó la posible participación de *KAT2* en la biosíntesis de esta hormona. El análisis de la expresión de los distintos genes *KAT* mostró un comportamiento diferencial de cada gen en respuesta a la herida. Los genes *KAT2* y *KAT5* aumentaron su expresión en respuesta a la herida, aunque con patrones de inducibilidad distintos, mientras que *KAT1* no respondió a la herida ni localmente ni sistémicamente (figura 11). Además, la expresión del gen *KAT1* no se alteró en respuesta a tratamientos hormonales relacionados con estrés (datos no mostrados), sugiriendo que aunque este gen se exprese, no actúa como un homólogo funcional de *KAT2* en las respuestas a estrés en *Arabidopsis*. La activación del gen *KAT2* tanto a nivel local como sistémico sugiere una función principal de *KAT2* en las respuestas a herida. Por otro lado, la activación sistémica del gen *KAT5* en respuesta a herida sugiere que *KAT5* podría cumplir una función adicional a *KAT2* en las respuestas sistémicas. Referente a las vías de señalización implicadas en la activación de los genes *KAT2* y *KAT5*, los estudios de expresión de la respuesta local y sistémica en el mutante insensible a JA *coi1-1* y el análisis de la sensibilidad a JA permitieron diferenciar entre las vías de señalización implicadas en respuesta a la herida. La inducción del gen *KAT5* mayoritariamente a nivel sistémico y totalmente dependiente de COI1 (figura 11-12) junto con la sensibilidad de este gen a JA (figura 13.A), parecen indicar que la activación del gen *KAT5* en respuesta a herida mecánica ocurre exclusivamente a través de la vía dependiente de JA (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1999; León et al., 2001), similar al patrón encontrado en el gen *JR2*, marcador de las respuestas dependientes de la vía de señalización mediada por JA. Por el contrario, la acumulación similar del transcrito *KAT2* en el mutante *coi1-1* y en el ecotipo silvestre Col tanto en la respuesta local como sistémica (figura 12) y la insensibilidad de este gen a JA (figura 13.A-B), sugieren que la activación transcripcional del gen *KAT2* en respuesta a la herida mecánica procede a través de la vía independiente de JA (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1999; León et al., 2001). Sin embargo, otras vías de señalización pueden estar implicadas en la activación génica de *KAT2* en respuesta a la herida. En solanáceas, la activación de las respuestas a herida están ligadas con la acumulación local y sistémica de JA y ABA, de manera que la síntesis y percepción de ABA es necesaria para la activación de la ruta de biosíntesis y percepción de

JA (Hildman et al., 1992; Peña-Cortés et al., 1989; 1995; Carrera y Prat, 1998; León et al., 2001; Bodenhausen y Reymond, 2007). Sin embargo, aunque ABA participaría en la señalización relacionada con la herida, no funcionaría como una señal primaria (Birkenmeier y Ryan, 1998). En *Arabidopsis*, el ABA activa la expresión de MYC2 de manera dependiente de COI1, sugiriendo que ABA precede a JA en la activación de las respuestas mediadas por MYC2 (Lorenzo et al., 2004). Sin embargo, en cebada y patata se ha descrito que la activación de varios genes por JA es independiente de ABA, desacoplando las vías de señalización de ambas hormonas en respuesta a herida (Lee et al., 1996; Dammann et al., 1997). Por otro lado, el ABA se ha relacionado en múltiples ocasiones con la defensa contra insectos herbívoros (Walling, 2000; de Bruxelles y Roberts, 2001; Thaler y Bostock, 2004; Bodenhausen y Reymond, 2007), y se han encontrado genes regulados por ABA en respuesta a insectos tanto dependientes como independientes de COI1 (Bodenhausen y Reymond, 2007). Además, varios estudios han descrito que la deshidratación es uno de los componentes principales en las respuestas a herida regulando directamente la inducción de muchos genes de herida (Reymond et al., 2000; 2004). En este sentido, se ha descrito la acumulación de ABA en las zonas dañadas (Peña-Cortés, et al., 1991; Birkenmeier y Ryan, 1998) relacionando la función esencial del ABA en las respuestas a estrés hídrico con las respuestas a herida (Christmann et al., 2006) por una vía posiblemente independiente de JA. En solanáceas, se ha descrito que la acumulación de ABA en tejidos deshidratados es independiente de la síntesis de JA o de genes dependientes de JA (Creelman y Mullet, 1995; Birkenmeier y Ryan, 1998). La fuerte inducción del gen *KAT2* en respuesta a la deshidratación y a la aplicación exógena de ABA por una vía independiente de COI1 (figuras 15-16), sugiere que la activación local de *KAT2* en respuesta a la herida podría ser fundamentalmente el resultado de vías de señalización independientes de JA y mediadas posiblemente por ABA. En este sentido, la función de ABA podría estar relacionada con el componente de deshidratación asociado con la herida. Sin embargo, en la respuesta a la herida, la vía de señalización independiente de JA así como la señalización mediada por ABA es responsable de la activación génica en zonas próximas a la herida, siendo la señalización mediada por JA esencial para la activación de las respuestas sistémicas (Stratmann, 2003b; Schilmiller y Howe, 2005). En este contexto, prácticamente todos los genes inducidos sistémicamente en respuesta a la herida son dependientes de JA (Delessert et al., 2004). Sin embargo, debe existir otro tipo de señalización implicada en la activación sistémica de genes que son insensibles a JA, y que podría estar relacionada posiblemente con otra molécula móvil distinta a JA. Además, no se

puede descartar que las mismas señales estén operativas a nivel sistémico activando otras rutas de señalización. Entre estos genes se encuentra *KAT2*, cuya activación sistémica opera a través de un mecanismo independiente de COI1 y de JA (figura 12), y el gen que codifica la RNasa RNS1 (LeBrasseur et al., 2002). En este sentido, además del ABA, otra molécula señal que podría estar implicada en la activación sistémica de *KAT2* podría ser el OPDA, ya que se ha descrito un grupo de genes insensibles a JA que aumentan su expresión en respuesta a OPDA de manera independiente a COI1, entre los que se encuentra *KAT2* (Stinzi et al., 2001, Taki et al., 2005). Por otro lado, ya que en la herida se acumula Et, H₂O₂ y NO (Low y Mérida, 1996; O'Donnell et al., 1996; Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1999; Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999; Orozco-Cárdenas et al., 2001; Huang et al., 2004; Adie et al., 2007a), estos compuestos podrían estar relacionados con la activación génica de *KAT2* tanto a nivel local como sistémico. De hecho, se ha comprobado que la expresión de *KAT2* aumenta en respuesta a H₂O₂ (figura 25.D), y el H₂O₂ actúa como un segundo mensajero en la inducción de genes de defensa inducidos tardíamente a nivel sistémico (Orozco-Cárdenas et al., 2001), coincidiendo con la cinética de inducción de *KAT2*. En cambio, podemos descartar la participación de SA en la activación de *KAT2* en respuesta a la herida, ya que las plantas transgénicas nahG no mostraron diferencias de expresión con respecto a plantas silvestres (figura 12). Por otro lado, la acumulación de ABA y la ruta de señalización del ABA se relacionan con múltiples factores de estrés además de la herida y la deshidratación, que incluyen la respuesta al frío, estrés osmótico y estrés salino (Zhu, 2002; Gusta et al., 2005). Además de en respuesta a deshidratación (figura 15; Seki et al., 2002), se han detectado niveles elevados de transcrito de *KAT2* en plantas expuestas a frío o estrés salino (Seki et al., 2002), sugiriendo que *KAT2* forma parte de las respuestas generales desencadenadas frente a factores de estrés abióticos. Sin embargo, las plantas transgénicas con niveles de expresión de *KAT2* alterados (*KAT2as* y *35S::KAT2*), no mostraron alteraciones en los procesos de deshidratación tanto forzada como natural (figura 24), indicando que la activación de *KAT2* en respuesta a ABA o a deshidratación podría ser más una consecuencia que un componente en las correspondientes vías de señalización. En conclusión, la expresión no solapante de los genes *KAT* en respuesta a herida, deshidratación o tratamiento con ABA o JA, sugiere que diferentes vías de señalización desencadenadas por diferentes estímulos podrían confluir en la activación de la expresión de estos genes. Por otro lado, a pesar de la activación transcripcional de *KAT2* en respuesta a herida, las hojas heridas de plantas transgénicas *KAT2::GUS* no mostraron actividad GUS, indicando que la construcción generada no incluye todos los

elementos reguladores del promotor de *KAT2* necesarios para la activación por herida, lo que sugiere una posible regulación compleja de este gen en herida, quizás requiriendo la participación de elementos reguladores presentes en intrones o en regiones 5' ó 3' no codificantes. De hecho, los resultados obtenidos en este trabajo permiten suponer que la región promotora del gen *KAT2* debe ser lo suficientemente compleja para integrar la actividad de un amplio número de factores reguladores, que permitan explicar la inducibilidad de este gen por numerosos factores de estrés, moléculas relacionadas con defensa y en distintos procesos del desarrollo.

1.2.2. KAT2 interviene en la síntesis de JA en respuesta a la herida.

Los JAs son oxilipinas originadas a través de la ruta de los octadecanoides (Vick y Zimmerman, 1983; 1984) que comienza con la liberación del AαLe de las membranas del cloroplasto por acción de PLs y posteriormente es oxigenado por las 13-LOX para dar lugar al 13-HPOT. A continuación, la acción secuencial de la AOS y AOC convierte al 13-HPOT en OPDA, molécula con actividad señalizadora en defensa (Stintzi et al., 2001). En la síntesis de JA, todas las reacciones conducentes a la formación de OPDA ocurren en los cloroplastos, mientras que la reducción del OPDA por la acción de la OPR3 y las siguientes rondas de β-oxidación para producir finalmente JA tienen lugar dentro de los peroxisomas (revisado por Creelman y Mullet, 1997a; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002; Schaller et al., 2005; Delker et al., 2006; Liechti y Farmer, 2006; Wasternack, 2007). Respecto a la ruta de β-oxidación, experimentos de marcaje radiactivo en los que el ¹⁸O-OPDA era reducido en unidades de dos carbonos proporcionaron la primera evidencia de que la conversión del OPC:8 a JA implicaba tres rondas de β-oxidación (Vick y Zimmerman, 1984), relacionando directamente esta ruta con la síntesis de JA (revisado por Miersch y Wasternack, 2000; Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002). Sin embargo, la identidad de los genes que codifican las enzimas necesarias para la síntesis de JA ha permanecido desconocida durante muchas décadas. Este trabajo ha aportado la primera identificación de genes de β-oxidación implicados en la síntesis de JA en plantas (Castillo et al., 2004). En los últimos años, muchos genes de β-oxidación y relacionados con esta ruta están siendo caracterizados en términos de su participación en la síntesis de JA tanto en *Arabidopsis* como en tomate (Afitlhile et al., 2005; Li et al., 2005; Schneider et al., 2005; Koo et al., 2006; Schillmiller et al., 2007; Delker et al., 2007; Kienow et al., 2008). A pesar

de todo, aún no se conocen con exactitud la totalidad de los genes que participan ni la regulación de éstos durante la síntesis de JA.

La inducibilidad del gen *KAT2* en respuesta a herida tanto a nivel local como sistémico, junto con que la proteína *KAT2* parecía ser la proteína con actividad KAT mas importante en *Arabidopsis*, nos llevó a analizar su función en la biosíntesis de JA en respuesta a la herida. El gen *JR2*, marcador de las respuestas dependientes de JA en herida, presentó en las plantas con expresión reducida de *KAT2* (*KAT2as*), una activación transcripcional entre un 60 y 80 % menor en respuesta a la herida tanto a nivel local como a nivel sistémico (figura 17.A). Puesto que las plantas *KAT2as* no presentan alteraciones en la percepción y señalización de JA (figura 17.B), la deficiente activación de *JR2* por herida sugería que las plantas transgénicas *KAT2as* mostraban un defecto en la síntesis de JA. Este resultado fue confirmado posteriormente, ya que las plantas *KAT2as* mostraron en respuesta a herida, una acumulación reducida de JA, entre un 60 y 80 %, en comparación con las plantas silvestres (figura 18), indicando que *KAT2* es un componente esencial para la biosíntesis de JA en respuesta a la herida. Posteriormente, otro trabajo mostró que el mutante *ped1*, que presentaba las actividades enzimáticas que preceden a la β -oxidación en la síntesis de JA intactas, mostraba una reducción en los niveles de JA (Afitlhile et al., 2005), indicando nuevamente la funcionalidad de *KAT2* en la síntesis de JA. Por otro lado, no se observaron diferencias en el nivel basal de JA entre las plantas transgénicas *KAT2as* y las plantas silvestres, similar a lo descrito en el mutante *ped1* (Afitlhile et al., 2005) y en el mutante *acx1* (Schillmiller et al., 2007), pero no en otros mutantes de biosíntesis donde si se produce una menor acumulación de JA en condiciones basales. Aunque la acumulación máxima de JA ocurre a los 90 min tras la herida (Reymond et al., 2000; Stenzel et al., 2003a) y la expresión del gen *KAT2* tiene un máximo de expresión a las 6 h, los niveles basales de *KAT2* podrían ser suficiente para producir el JA necesario para iniciar la activación de la respuesta a la herida. Esta hipótesis explicaría que no se observen diferencias en los niveles basales de JAs en las plantas transgénicas *KAT2as* donde los niveles reminiscentes de *KAT2* podrían ser suficientes para la producción basal de JA. De hecho, la expresión de varios genes participantes en la biosíntesis de JA como *LOX*, *AOS* y la *AOC* también presentan un máximo de inducción posterior a la máxima acumulación del JA (Howe et al., 2000; Ziegler et al., 2001; Stenzel et al., 2003a; 2003b). El JA activa la expresión de los genes de su biosíntesis en *Arabidopsis* y otras plantas ejerciendo así un control de su propia síntesis por un mecanismo de retroalimentación positiva que refuerza y

amplifica la capacidad de la planta para sintetizar JA en respuesta al daño (Reymond et al., 2000; Ryan, 2000; Sasaki et al., 2001; Ziegler et al., 2001; Stenzel et al., 2003a; 2003b; Delker et al., 2006; Wasternack, 2007). Aunque se ha descrito que todos los genes implicados en la biosíntesis de JA son sensibles a JA (Wasternack, 2006), *KAT2* no se activa por JA (figura 13-14), lo que sugiere que *KAT2* podría ser un paso limitante en la síntesis de JA independiente al mecanismo de retroalimentación positiva. Sin embargo, las plantas transgénicas que presentan expresión constitutiva de *KAT2* (*35S::KAT2*) mostraron una acumulación transcripcional del gen *JR2* similar al ecotipo silvestre, tanto en condiciones basales como en respuesta a la herida a nivel local y sistémico (figura 20), indicando que la expresión aumentada de *KAT2* no es suficiente para incrementar los niveles basales de JA ni tampoco en respuesta a la herida. Por tanto, *KAT2* a pesar de ser necesario para la síntesis de JA en respuesta a la herida, no representa un paso limitante en la síntesis de esta hormona. El hecho de que la activación de *KAT2* no produzca una mayor acumulación de JA podría deberse a que existan cantidades limitantes de sus correspondientes precursores. De hecho, las enzimas implicadas en la biosíntesis de JA presentan altos niveles de actividad en hojas, y sin embargo, únicamente después de un estrés se observa la acumulación de JA, indicando que la disponibilidad de sustratos puede tener un papel decisivo en la regulación de la biosíntesis de JA en detrimento de la activación de la expresión de los genes de su biosíntesis (Laudert et al., 2000; Miersch y Wasternack, 2000; Ziegler et al., 2001; Stenzel et al., 2003b ; Howe, 2004; Beckers y Spoel, 2006; Wasternack, 2007). Por otro lado, el análisis de genes de herida en las plantas transgénicas *KAT2as* cuya expresión se activa total o parcialmente a través de la vía independiente de JA en respuesta a la herida (figura 19), determinó que *KAT2* no regula las respuestas de defensa independientes de la síntesis de JA, indicando que las alteraciones debidas a una menor expresión de *KAT2* sólo se relacionan con las respuestas dependientes de JA y que por tanto *KAT2* no constituye un nodo regulatorio entre las vías de señalización independientes y dependientes de JA en *Arabidopsis*. El análisis global de los cambios transcripcionales producidos por una menor expresión del gen *KAT2* mostró una reducción en muchos genes inducibles por JA (tabla I), entre los que se encontraban *MYC2* y *JAZ1*, componentes esenciales de la señalización de JA (Lorenzo et al., 2004; Lorenzo y Solano, 2005; Thines et al., 2007; Chung et al., 2008) y el FT NAI, relacionado con las respuestas de defensa frente a herida, herbívoros y patógenos (Matsushima et al., 2002, 2003a, 2003b; 2004). En este sentido, los datos transcriptómicos de las bases de datos (*Arabidopsis* eFP Browse, Genevestigator), indican que la mayoría de FT con expresión reducida

diferencialmente en las plantas *KAT2as* activan su expresión principalmente en respuesta a herida, *Botrytis*, *Pseudomonas* y en respuesta a JA, lo que sugiere nuevamente que la función de KAT2 está principalmente relacionada con las respuestas dependientes de JA. Además, una menor expresión de *KAT2* conlleva a una deficiencia en componentes implicados en las respuestas de defensa mediadas por JA tanto a nivel basal como inducido por la herida, sugiriendo que KAT2 es necesaria para la activación de ambas rutas de señalización. El bajo número de genes inducidos que aparecen en plantas *KAT2as* respecto al número de genes reprimidos, sugiere que la deficiencia en este gen no conduce a la activación de otras rutas alternativas.

La deficiencia en *KAT2* no produce una reducción total de los niveles de JA en respuesta a la herida ni en las plantas transgénicas *KAT2as* (este trabajo) ni en el mutante *ped1* (Afitlhile et al., 2005), presentando en ambos casos una reducción entre un 60 a 80 % (figura 18). Este hecho sugiere que otra/s isoforma/s KAT intervienen en la síntesis de JA. De hecho, aunque los mutantes simples de β -oxidación han permitido caracterizar algunas de las funciones de estos genes en la planta, son las combinaciones de mutaciones que eliminan funciones redundantes las que han mostrado fenotipos más severos. En este sentido, el doble mutante *acx1 acx5*, afectado en los genes *ACX5* y *ACX1* que codifica la isoenzima ACX más importante en *Arabidopsis*, presenta una reducción prácticamente total de los niveles de JA, mientras que el mutante simple *acx1* mantiene un 20 % de los niveles de JA inducidos en respuesta a la herida (Schilmiller et al., 2007). Al igual que el gen *KAT1*, *ACX5*, homólogo de *ACX1*, presenta niveles de expresión mucho menores que *ACX1* y no aumenta su expresión en respuesta a la herida (Schilmiller et al., 2007), lo que sugiere que KAT1 podría intervenir también en la síntesis de JA en respuesta a la herida junto con KAT2. Por tanto, posiblemente un doble mutante *kat1 kat2* presentaría niveles de JA tanto basales como inducidos más reducidos que el mutante *ped1*. Este hecho no se observa en las plantas transgénicas *KAT2as*, que presentan niveles de expresión muy reducidos tanto de *KAT1* como de *KAT2* (tabla I), debido posiblemente a que las plantas antisentido no son mutantes nulos de ambos genes. De igual manera, KAT5 podría intervenir en la síntesis de JA, de hecho, la activación del gen *KAT5* en las respuestas sistémicas a la herida junto con la inducibilidad por JA, sugieren que KAT5 podría estar interviniendo en la síntesis de JA en las zonas que activan la respuesta sistémica junto con KAT2. Sin embargo, tampoco se puede descartar que intervenga en la síntesis localizada en las zonas dañadas. De hecho, KAT5 es capaz de complementar parcialmente la función de KAT2 en el desarrollo

postgerminativo (Germain et al., 2001), sugiriendo especificidades de sustrato parcialmente solapantes entre ambas proteínas. Las posibles combinaciones entre las isoformas KAT en la síntesis de JA podría estar relacionada con tejidos o tipos celulares, y es más, la sobreexpresión de *KAT2* podría dar lugar a un aumento de JA en algunos tejidos concretos, a diferencia de lo observado en hojas. En este sentido, la sobreexpresión del gen *AOC* en tomate, produce un aumento de los niveles de JA únicamente en flores y no en hojas (Miersch et al., 2004). Anteriormente se ha relacionado el patrón de expresión del gen *KAT2* en flores con la función de biosíntesis de JA, por lo tanto, no podemos descartar que la acumulación de *KAT2* en flores produzca un aumento de los niveles de JA en estos órganos.

1.2.3. KAT2 participa en otros procesos funcionalmente relacionados con la síntesis de JA.

Varios estudios muestran que el daño mecánico y el ataque de insectos herbívoros producen cambios similares, aunque no idénticos, en la expresión génica (Reymond et al., 2000; Mithöfer et al., 2005; Major y Constabel, 2006; Ralph et al., 2006). Además, muchos de los mutantes de biosíntesis de JA presentan deficiencias en las respuestas de defensa contra insectos (Royo et al., 1999; Berger, 2002; Halitschke y Baldwin, 2003; 2004, Li et al., 2002b; 2003; 2005; Schilmiller et al., 2007). Entre éstos, el mutante *acx1* de tomate, presenta una menor síntesis de JA en respuesta a la herida y al ataque de la larva de *Manduca sexta*, lo que conlleva una respuesta de defensa atenuada y, consecuentemente, una mayor susceptibilidad (Li et al., 2005). Este fenotipo es similar al observado en el doble mutante *acx1 acx5* en su interacción con la larvas de *Trichoplusia ni* (Schilmiller et al., 2007). De igual manera, la deficiencia en la síntesis de JA y en la activación transcripcional del gen *JR2* en respuesta a herida en las plantas transgénicas *KAT2as*, sugiere que *KAT2* también podría intervenir en la síntesis de JA en respuesta a insectos herbívoros y por tanto ser esencial para la resistencia de la planta frente a éstos. Además, la vía de señalización dependiente de JA y Et tiene una función clave en la respuesta a patógenos necrotrofos, siendo los mutantes afectados en la síntesis o señalización de cualquiera de estas dos hormonas más susceptibles al ataque de patógenos necrotrofos (Knoester et al., 1998; Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998; 1999; Vijayan et al., 1998; Hoffmann et al., 1999; Berrocal-Lobo et al., 2002; Díaz et al., 2002; Rojo et al., 2003; Lorenzo et al., 2003; Lorenzo y Solano, 2005; Yang et al., 2007; Schilmiller et al.,

2007). Entre los patógenos necrotrofos se encuentran los pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Plectosphaerella*, *Septoria*, *Phytium*, *Erwinia*, y en este trabajo, se ha analizado la respuesta a *Plectosphaerella cucumerina*. La expresión del gen *KAT2* aumentó rápidamente en respuesta a *P. cucumerina* (figura 22), sugiriendo una posible función de *KAT2* en las respuestas defensivas frente a este patógeno. También se ha descrito la activación transcripcional de prácticamente todos los genes que codifican enzimas implicadas en β -oxidación, entre ellos *KAT2*, en respuesta a *Alternaria brassicicola* y con un patrón de expresión similar al observado en este trabajo (Schenk et al., 2003; Ferrari et al., 2007). Ya que el gen *KAT2* es insensible a JA, otras moléculas señalizadoras implicadas en la respuesta a *P. cucumerina* deben estar implicadas en la activación transcripcional de *KAT2*, al igual que se ha discutido previamente en respuesta a la herida. Como hemos descrito anteriormente, el Et tiene un papel crítico junto con JA en la defensa contra patógenos necrotrofos (Lorenzo y Solano, 2005; Adie et al., 2007a) y por tanto, podría estar interviniendo en la activación transcripcional de *KAT2* a través de ERF1 u otro factor ERF. Por otro lado, recientemente se ha descrito al ABA como un componente positivo de la ruta de señalización activada por patógenos necrotrofos, siendo necesario para la activación tanto de los genes de biosíntesis como de los genes dependientes de JA, y por tanto, para la resistencia contra estos patógenos (Adie et al., 2007b; Hernández-Blanco et al., 2007). Aunque este comportamiento solo se da en algunos patógenos necrotrofos, siendo el ABA en otros casos un regulador negativo, posiblemente en la infección con *P. cucumerina* actúe como un regulador positivo ya que la aplicación exógena de ABA protege a las plantas contra *P. cucumerina* (Ton y Mauch-Mani, 2004). El gen *KAT2* se induce por ABA (figura 15), y como se ha comentado, el ABA interviene en la activación transcripcional de los genes de biosíntesis de JA en respuesta a algunos patógenos necrotrofos, lo que sugiere que ABA podría estar implicado en la activación transcripcional de *KAT2* en respuesta a *P. cucumerina*. Sin embargo, otros componentes señalizadores podrían estar interviniendo en la activación transcripcional de *KAT2*. Los OGAs liberados desde las paredes celulares durante la infección con *Botrytis cinerea* u otros elicitores del patógeno inducen respuestas de defensa en la planta huésped independientemente de la señalización mediada por JA, SA y Et (Aziz et al., 2004; Ferrari et al., 2007). Ya que *KAT2* es insensible tanto a JA como a SA (figura 13-14), podrían ser los OGAs u otros elicitores del patógeno como flagelina los inductores de la activación de *KAT2* en respuesta a *P. cucumerina*. Para determinar si la función de *KAT2* es necesaria para la activación de las respuestas de defensa contra *P. cucumerina* dependientes de JA, se analizó la expresión del gen *PDF1.2*, marcador clásico

de las respuestas dependientes de JA/Et en las infecciones con hongos necrotrofos (Pennickx et al., 1996; 1998; Thomma et al., 1998; 1999). Las mutaciones que bloquean alguna de las dos rutas producen una eliminación total de la inducción del gen *PDF1.2* en respuesta a patógenos necrotrofos (Pennickx et al., 1998; Lorenzo et al., 2003). La menor expresión de *KAT2* estuvo asociada con una menor inducción de *PDF1.2* en la infección con *P. cucumerina*, y lo contrario se observó en plantas que sobreexpresaban *KAT2* (figura 22). Estos resultados sugieren que *KAT2*, al igual que en herida, podría estar interviniendo en la síntesis de JA asociada a la infección con patógenos necrotrofos. De forma contraria, el doble mutante *acx1 acx5* presenta una menor síntesis de JA en respuesta a insectos o herida pero acumula normalmente JA en respuesta a *Alternaria brassicicola*, indicando en este caso que los genes *ACXs* intervienen diferencialmente en la síntesis de JA dependiendo del factor de estrés (Schillmiller et al., 2007). En este trabajo, los datos obtenidos indicarían que *KAT2* participa en la síntesis de JA frente a un amplio rango de factores de estrés y a lo largo del desarrollo de la planta, ya que las plantas transgénicas *KAT2as* también mostraron un fenotipo de adelanto del tiempo de floración (figura 23), asociable a una menor síntesis de JA, similar al fenotipo obtenido en el mutante *coi1-1* (datos no mostrados). Además, la función de *KAT2* en herida o patógenos necrotrofos posiblemente no se asocie únicamente con la biosíntesis de JA, y participe en otras funciones relacionadas con el mantenimiento de las funciones básicas del metabolismo en respuesta a estrés. Existen múltiples estudios que indican que la herida, la infección con patógenos, el JA o el Et reprimen la expresión de los genes de fotosíntesis, algo similar a los procesos desencadenados en senescencia (Kays y Pallas, 1980; Weidhase et al., 1987; Reinbothe et al., 1994; Bunker et al., 1995; Cheong y Choi, 2003; Chang et al., 2004; Delessert et al., 2004; Zimmerli et al., 2004; Devoto y Turner, 2005; Giri et al., 2006; Ralph et al., 2006; Jung et al., 2007; Zhai et al., 2007), lo que explicaría que en situaciones de estrés como herida o infección con patógenos se produjera una activación de los genes de β -oxidación, entre ellos *KAT2*, o bien para degradar estructuras celulares dañadas o infectadas, o bien para obtener la energía necesaria mediante la degradación de lípidos. Otra posible función de *KAT2* podría estar relacionada con el metabolismo de compuestos con funciones relacionadas con la reparación del tejido dañado o antipatogénicas, e incluso con la síntesis de otras moléculas señalizadoras importantes en respuesta a herida o patógenos.

1.3. El gen *KAT2* activa su expresión en respuesta a patógenos biotrofos y luz UV-C, pero no interviene en la síntesis de SA en respuesta a estrés en Arabidopsis.

Los SAs cumplen funciones esenciales en la defensa frente a patógenos biotrofos y otros factores de estrés (revisado por Dempsey et al., 1999; Shah, 2003; Glazebrook, 2005; Beckers y Spoel, 2006; Halim et al., 2006; Loake y Grant, 2007). En plantas, se han descrito dos vías distintas de síntesis, que difieren, entre otros componentes, en la participación de reacciones de β -oxidación. Hasta la realización de este trabajo, la vía de señalización descrita en solanáceas era la única que implicaba un paso de β -oxidación para transformar el ácido *trans*-cinámico en ácido benzoico, precursor de SA (Raskin, 1992; Ribnicky et al., 1998; Jarvis et al., 2000; Hertweck et al., 2001). Recientemente, se ha descrito que la vía del isocorismato, la única ruta descrita en Arabidopsis, es también la que contribuye mayoritariamente a la síntesis de SA en tabaco, pudiendo tener la vía del ácido *trans*-cinámico, una participación residual en situaciones de estrés (Catinot et al., 2008). Además, las vías de señalización mediadas por JA y SA presentan múltiples interacciones que permiten a la planta jerarquizar las respuestas de defensa en cada caso (Reymond y Farmer, 1998; Kunkel y Brooks, 2002; Turner et al., 2002; Farmer et al., 2003; Glazebrook et al., 2003; Rojo et al., 2003; Devoto y Turner, 2003; Beckels y Spoel, 2006). En este sentido, la existencia de la vía de síntesis de SA dependiente de β -oxidación en Arabidopsis, determinaría un nuevo punto de regulación, previamente no descrito, a nivel de la síntesis de ambas hormonas. En este contexto, para determinar la posible implicación de *KAT2* en la síntesis de SA en Arabidopsis, se analizó la expresión del gen *PR1*, marcador de las respuestas dependientes de SA (Ryals et al., 1996), en aquellas situaciones que conllevan producción de SA por estrés, concretamente, en la infección con la bacteria fitopatogénica *Pseudomonas syringae* y en la irradiación con luz UV-C. En este caso, los niveles de expresión equiparables de *PR1* en las plantas *KAT2as* y silvestres tanto en respuesta a *Pseudomonas* (figura 25.A-B) como en la respuesta a luz UV-C (figura 26), indicaron que la síntesis de SA en respuesta a estrés estaba totalmente operativa en la plantas *KAT2as* y que *KAT2*, y probablemente la β -oxidación, no participan en esta ruta biosintética en Arabidopsis. Sin embargo, la detección de SA en el doble mutante *ics1 ics2* de Arabidopsis, sugiere que otra vía alternativa a la de isocorismato está activa en Arabidopsis y que contribuiría aproximadamente en un 4 % en respuesta a estrés y en un 20 % a nivel basal (Garcion et al., 2008). En este sentido, el análisis transcriptómico realizado

en las plantas *KAT2as* mostró una severa disminución del gen *PR1* en las tres réplicas correspondientes a la situación basal con respecto a Col (\log_2 medio de -1,4; datos no mostrados), sugiriendo que *KAT2*, y por tanto la β -oxidación, podría estar participando en la síntesis de SA a nivel basal. Curiosamente, la inducción del gen *JR2* en respuesta a luz UV-C no fue menor en las plantas transgénicas *KAT2as*, a diferencia de lo observado en la herida (figura 26). Este hecho podría deberse a una regulación más compleja del gen *JR2* en respuesta a luz UV-C que diera lugar a una activación completa independientemente de la síntesis de JA o que en respuesta a UV-C se produjera JA por otras vías de síntesis independientemente de *KAT2*. Por otro lado, la deficiencia en *KAT2* no afectaba a las vías de señalización que activan la expresión de *PR1* en respuesta a SA (figura 25.D) ni a la activación y mantenimiento de la resistencia basal en respuesta a *P. syringae* (tabla II), sugiriendo que *KAT2* es independiente de los eventos moleculares implicados en las respuestas a patógenos biotrofos. Sin embargo, la expresión del gen *KAT2* aumentó considerablemente en respuesta a *P. syringae*, tanto en un contexto de interacción compatible como incompatible, pero no en respuesta a la aplicación exógena de SA o JA (figura 13, 14, 25.D), lo que sugiere que la activación de *KAT2* por *Pseudomonas* es independiente de SA y de JA. De igual manera, la expresión de *KAT2* en respuesta a luz UV-C fue también independiente de la percepción de JA y SA como indica la inducción completa observada en el mutante *coi1-1* y en plantas *nahG* (figura 26). Por el contrario, *KAT2* aumentó su expresión en respuesta a H_2O_2 (figura 25.C) y por tanto, la inducción transcripcional de *KAT2* en respuesta a patógenos biotrofos avirulentos y en respuesta a luz UV-C podría estar mediada por H_2O_2 . El reconocimiento del patógeno avirulento por la planta produce una explosión oxidativa que genera H_2O_2 , regulador de la muerte celular que ocurre durante la respuesta defensiva HR (Lamb y Dixon, 1997; Bolwell, 1999; Mittler et al., 1999; Grant y Loake, 2000). La activación de la HR activa a su vez la respuesta SAR en zonas distales de la planta cuya función es aumentar la capacidad defensiva contra subsiguientes infecciones por patógenos. En la respuesta sistémica ocasionada por la infección con *P. syringae avrRpm1* también se observó un aumento de la expresión de *KAT2*, que podría estar relacionado con la respuesta SAR. Aunque SA no es la molécula móvil que desencadena SAR, es necesario que SA se acumule en las zonas distales para activar la respuesta (Vernooij et al., 1994). Ya que *KAT2* presenta insensibilidad a SA, posiblemente otra molécula esté implicada en su activación génica en la respuesta sistémica. En este sentido, recientemente se ha descrito que los JAs participan en la activación de la respuesta SAR precediendo a la acumulación de SA, produciéndose tanto

la activación transcripcional de los genes de biosíntesis de JA como un aumento de los niveles de la hormona en las zonas que activan SAR (Truman et al., 2007). Por tanto, la activación de la expresión de *KAT2* en la respuesta a *P. syringae DC3000 avrRpm1* podría estar relacionado con su función biosintética de JA o con el metabolismo de otras moléculas lipídicas con función señalizadora en SAR y en otras respuestas defensivas (Maldonado et al., 2002; Nandi et al., 2004; Shah, 2005). Los mutantes de biosíntesis de JA presentan una respuesta SAR defectiva, que es restablecida por la aplicación exógena de JA (Truman et al., 2007). En este sentido, si *KAT2* participa en la síntesis de JA necesaria para la activación de SAR, las plantas transgénicas *KAT2as* podrían presentar alteraciones en la resistencia inducida, a diferencia de la resistencia basal que no es defectiva en las plantas *KAT2as* (tabla II). Otra posible molécula señalizadora que podría intervenir en la activación de *KAT2* en respuesta a patógenos biotrofos es el ABA. Recientemente se ha descrito que en respuesta a *P. syringae* se produce un aumento de los niveles de ABA debido a los efectores secretados por la bacteria (de Torres-Zabala et al., 2007), y por tanto, podría ser el ABA el que mediaría en la activación del gen *KAT2* en respuesta a *Pseudomonas*.

En todos los análisis realizados con plantas *nahG* se detectó un nivel de expresión de *KAT2* superior con respecto a Col. Aunque se ha descrito que algunos fenotipos observados en las plantas *nahG* no se deben a la disminución de SA (Heck et al., 2003; van Wees et al., 2003; Glazebrook, 2005), el aumento de la expresión de *KAT2* también se ha observado en otros mutantes deficientes en SA como *sid1/eds16* y *sid2/eds5* (datos no mostrados), lo que sugiere que el SA ejerce un papel represor de las vías de señalización que activan la expresión de *KAT2* al menos en herida (figura 12) y en respuesta a luz UV-C (figura 26). Curiosamente, a pesar de los efectos antagonistas del SA sobre la vía de señalización activada por JA, no se observó ningún efecto negativo del SA sobre la expresión de *KAT5*, a diferencia de lo observado en el gen *JR2* (figura 12, 14).

1.4. La expresión de *KAT2* es necesaria para la activación de la senescencia natural o inducida por oscuridad en *Arabidopsis*.

El inicio del programa de senescencia implica una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y de expresión génica que están regulados por una red que integra tanto factores endógenos como exógenos y que determina el final de la vida funcional de los

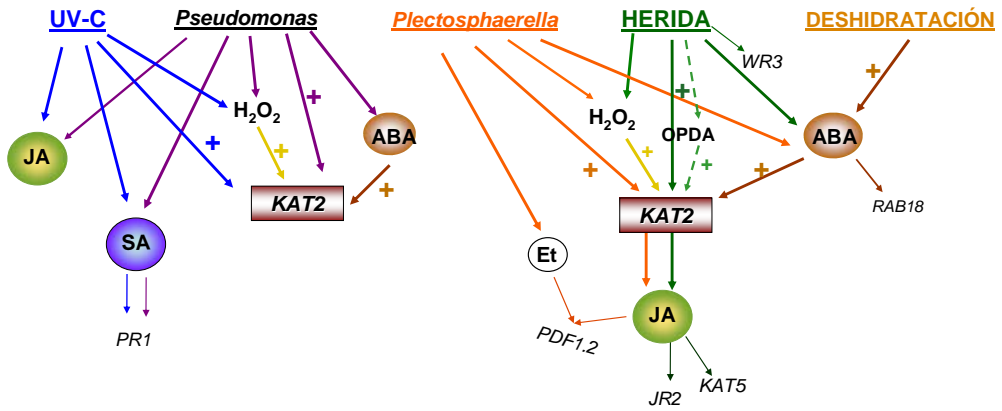
órganos y la entrada en una fase catabólica de degradación de éstos. La planta moviliza nutrientes y metabolitos desde los órganos senescentes hasta el resto de órganos de la planta, maximizando así las fuentes de energía y material y optimizando el crecimiento (Lim y Nam, 2005; Lim et al., 2007). La senescencia y la germinación comparten algunos procesos metabólicos, como la β -oxidación, que juega un papel esencial en la movilización de nutrientes y en la consiguiente generación de energía. Esta ruta interviene en el procesamiento de lípidos derivados de los metabolitos durante la degradación de membranas de las estructuras senescentes (Graham y Eastmond, 2002; Hopkins et al., 2007) y, en este sentido, la activación de la β -oxidación puede ser el resultado de la necesidad celular de activar maquinarias catabólicas con capacidad para degradar moléculas complejas. En este trabajo se ha analizado si la β -oxidación, y concretamente *KAT2*, interviene en la activación de la senescencia en las hojas. De los diferentes genes *KAT*, únicamente *KAT2* aumentó su expresión en hojas senescentes (figura 27), coincidiendo con resultados obtenidos en otros trabajos (He et al., 2002; Charlton et al., 2005a; Van der Graaff et al., 2006). La expresión de *KAT2* aumentó en hojas sometidas a senescencia forzada por oscuridad a partir de un día y persistió con niveles inducidos hasta el día 8 (figura 28, 31). La actividad GUS detectada en hojas senescentes de plantas *KAT2::GUS* indicó que la expresión del gen *KAT2* se induce en las zonas cloróticas (figura 28.B), sugiriendo que la activación de la expresión de *KAT2* está directamente relacionada con el proceso de la senescencia. El hecho de que la expresión de *KAT2* precediera a la aparición de los síntomas de clorosis y a la activación de genes asociados a senescencia como *SAG12* en las hojas incubadas en oscuridad (figura 28), sugería que la activación temprana de *KAT2* podría estar relacionada con los eventos moleculares que desencadenan la senescencia y no ser únicamente una consecuencia del proceso. Por otro lado, la persistencia de la expresión del gen *KAT2* más allá del comienzo de la senescencia sugiere que *KAT2* también interviene en los procesos desencadenados en las hojas cuando la senescencia ya está progresando. Se había descrito previamente que la senescencia inducida por oscuridad únicamente tenía lugar en hojas individuales cortadas y que era inhibida en plantas enteras en oscuridad (Weaver y Amasino, 2001). Sin embargo, el aumento de la luminiscencia emitida por plantas transgénicas *KAT2::LUC* sometidas a oscuridad (figura 29), sugería que la expresión activada de *KAT2* en plantas mantenidas en oscuridad precedía al comienzo de la senescencia foliar inducida por oscuridad en plantas no defoliadas. Por otro lado, la activación de *KAT2* en la senescencia podría estar relacionada con su función biosintética de hormonas, tanto de JA como de IAA. En este sentido, se ha

descrito que la síntesis, percepción y señalización de JA tiene una función esencial en senescencia (He et al., 2002; Buchanan-Wollaston et al., 2005). Las plantas transgénicas *KAT2as* que producen una menor cantidad de JA en respuesta a la herida, mostraron un fenotipo de retraso de senescencia tanto en condiciones naturales como inducidas por oscuridad (figura 30 y 32), que correlacionaba con una fuerte disminución de la inducción del gen *SAG12* en hojas senescentes (figura 31). Además, el retraso en la senescencia observado en las plantas transgénicas *KAT2as* fue superior al observado en el mutante insensible a JA *coi1-1* (figura 30.B), que ha sido caracterizado como un mutante defectivo en la senescencia de hojas mediada por JA (He et al., 2002). Ya que las plantas *KAT2as* no presentan alteraciones en la percepción de JA, tanto en la activación de genes dependientes de JA (figura 17) como en los procesos de senescencia desencadenados por JA (figura 30.A), una posible explicación de la senescencia retrasada en hojas *KAT2as* podría ser un defecto en la síntesis de JA. Las plantas *KAT2as* presentan menores niveles de JA en respuesta a la herida pero tienen niveles basales de JA similares al ecotipo silvestre (figura 18), sugiriendo que el JA tiene que ser acumulado a partir de un umbral para desencadenar senescencia. Sin embargo, la expresión del gen *JR2* que es estrictamente dependiente de la síntesis y percepción de JA y que se activa rápidamente por la aplicación exógena de JA (Titarenko et al., 1997; Rojo et al., 1998, figura 12 y 13), no aumenta durante los cuatro días posteriores a la incubación en la oscuridad (Castillo y León, 2008). Por otro lado, los análisis de los transcriptomas de plantas mostrando senescencia foliar inducida por oscuridad, no muestran alteraciones en la expresión de los genes de biosíntesis de JA ni en genes dependientes de esta hormona como *JR2*, *PDF1.2* o *VSP1*, a excepción de los genes *LOX1* y los de β -oxidación (*ACX1*, *AIM1*, *MFP2* y *KAT2*) que si están inducidos (Lin y Wu, 2004). Además, no se ha descrito ningún fenotipo alterado de senescencia en ningún mutante de biosíntesis o señalización de JA a excepción de *coi1* (He et al., 2002; Guo y Gan, 2005). Estos datos sugieren que en condiciones de senescencia inducida por oscuridad no se produce un aumento de los niveles de JA, al menos en los primeros cuatro días posteriores a la incubación, como ya se había descrito en otros trabajos (van der Graaf et al., 2006). Por tanto, la función de *KAT2* podría estar relacionada con la participación de la β -oxidación en la síntesis o metabolismo de otra molécula señalizadora diferente a JA e implicada en la regulación de la senescencia inducida por oscuridad. Alternativamente, el fenotipo de senescencia observado en plantas *KAT2as* podría deberse a que para la iniciación de la senescencia se necesite una localización subcelular correcta de *KAT2*. El mutante *ped1/kat2* presenta glioxisomas morfológicamente alterados (Hayashi et al., 1998b;

Germain et al., 2001) que podrían ser el motivo del retraso de senescencia observado en las hojas *KAT2as*. Estos datos serían concordantes con el retraso en los síntomas de senescencia forzada por oscuridad mostrado por el mutante *pex14* (datos no mostrados) similar en términos de pérdida de clorofila al observado en las plantas transgénicas *KAT2as*. El mutante *ped2/pex14* muestra un defecto parcial en el transporte de proteínas peroxisomales, entre ellas KAT2, al interior del peroxisoma y alteraciones en la morfología del orgánulo (Hayashi et al., 1998b; 2000a). Estos datos podrían indicar que la función de KAT2 en el inicio de la senescencia requiere tanto de la expresión del gen como de la correcta localización subcelular de la proteína en peroxisomas. Por otra parte, se ha descrito que la β -oxidación debe estar coordinada con el metabolismo citosólico, cloroplástico y mitocondrial para el desarrollo y la señalización activada por estrés en plantas (Baker et al., 2006). La función reducida de KAT2 puede conducir a la acumulación de algunos precursores citoplasmáticos, y estos metabolitos podrían ejercer un efecto de retroalimentación negativa inhibiendo la actividad fotosintética cloroplástica, causando entonces un menor metabolismo oxidativo y, como consecuencia, un retraso en la senescencia. En este sentido se han descrito fenotipos de retraso de senescencia en mutantes de la maquinaria fotosintética como *ore4-1* de Arabidopsis (Woo et al., 2002) y en plantas transgénicas de tabaco con expresión reducida de la rubisco (Miller et al., 2000). Es también posible que la acumulación de ácidos grasos o de un intermediario en la ruta biosintética de JA pueda actuar como un bucle inhibitorio de los componentes de la ruta. Se han descrito varios genes que codifican enzimas que participan en el metabolismo de lípidos como la fosfolipasa D, una lipasa y una acil hidrolasa que son inducidos durante la senescencia y cuya deficiencia produce un retraso de ésta (Fan et al., 1997; Thompson et al., 2000; He y Gan, 2002). Por otro lado, la función de KAT2 en senescencia también podría estar relacionada con la síntesis de auxinas. Múltiples hechos relacionan las auxinas con la senescencia, aunque nunca se ha descrito si la participación de la β -oxidación en la conversión de IBA a IAA está funcionalmente conectada con la regulación de la senescencia. Mutantes en la síntesis o percepción de auxinas muestran un retraso en la senescencia y en la abscisión de órganos (Vandenbussche et al., 2003; Ellis et al., 2005, Pineau et al., 2005), y en las hojas senescentes se ha detectado un aumento en los niveles de IAA (Quirino et al., 1999). Sin embargo, el IAA no induce la expresión del gen marcador de senescencia *SAG12* (Noh y Amasino, 1999). En este sentido, la senescencia inducida por oscuridad activa la expresión de algunos genes implicados en la biosíntesis de auxinas dependientes de la ruta de L-triptófano pero no altera la expresión de múltiples genes de

respuesta a auxinas (Lin y Wu, 2004). Entre estos genes se encuentra el gen *MSG2/IAA19* que se activa intensa y rápidamente por IAA (Zhao, 2002). El análisis de la expresión de este gen durante los cuatro días posteriores a la incubación en oscuridad no mostró cambios en su expresión (Castillo y León, 2008), sugiriendo que no existen variaciones en los niveles de IAA en la senescencia temprana inducida por oscuridad y que, por tanto, la función de KAT2 no parece estar relacionada con una producción alterada de IAA. Por lo tanto KAT2, y la β -oxidación en general, podrían tener un papel dual como un regulador temprano del inicio de la senescencia, posiblemente a través de su participación en la síntesis de otras moléculas derivadas del metabolismo de β -oxidación diferentes a JA y IAA, que podría cumplir una función reguladora en los eventos tempranos de la senescencia, y también, como un componente de la maquinaria metabólica dedicada a la degradación de componentes lipídicos de células y tejidos que tiene lugar durante la senescencia. No se puede descartar que KAT2 pueda participar también en estadios tardíos de la senescencia a través de la síntesis balanceada de JAs y auxinas. De hecho, se ha descrito que existe una coregulación entre los genes biosintéticos de JA e IAA en hojas senescentes (van der Graaf et al., 2006), sugiriendo que la progresión de la senescencia foliar puede requerir de cambios en los niveles de ambas hormonas. Si JA y auxinas regulan la senescencia de hojas como agonistas, se esperaría que plantas con una actividad KAT2 reducida y presumiblemente, con niveles reducidos de JA e IAA mostrasen un fenotipo aditivo de senescencia. Esto sería concordante con el mayor retraso en la senescencia obtenido en las plantas *KAT2as* respecto al mutante *coi1-1* en hojas sometidas a senescencia forzada por oscuridad. No obstante, de producirse esta cooperación no sería en los eventos tempranos del proceso de senescencia, sino, probablemente, en los eventos tardíos fundamentalmente catabólicos (Castillo y León, 2008). En conclusión, los datos de este trabajo indican que KAT2 es un importante factor regulador del desarrollo de la senescencia de hojas, participando tanto en su activación como en la posterior progresión. Esta función reguladora de KAT2 podría estar relacionada tanto con la producción de moléculas de naturaleza lipídica inductoras de la senescencia como con la actividad catabólica de estructuras lipídicas. Sin embargo, KAT2 no actuaría como paso limitante en la biosíntesis de JA, auxinas o cualquier molécula de naturaleza lipídica con función reguladora de la senescencia forzada en oscuridad, como indica la falta de fenotipo en las plantas sobreexpresoras de KAT2 con respecto al ecotipo silvestre (figura 30), de nuevo un comportamiento similar a lo observado en la respuesta a herida.

A



B

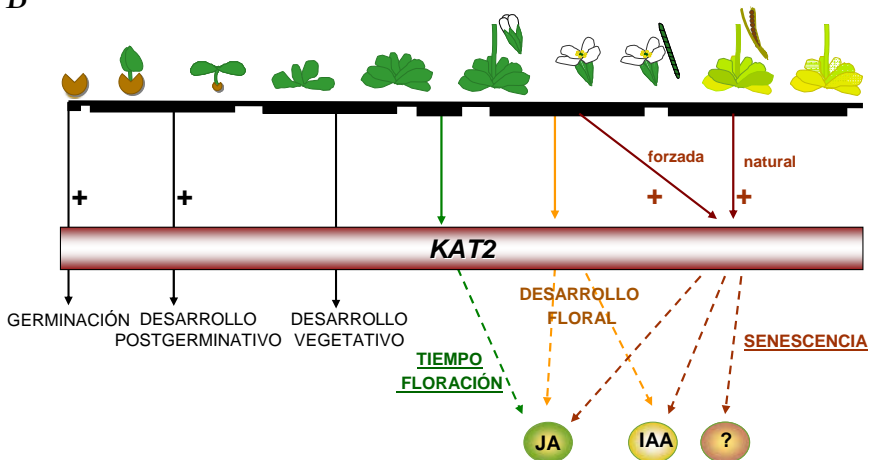


Figura 45. Esquema representativo del patrón de inducción de KAT2 en defensa y desarrollo.

A. La expresión del gen *KAT2* se activa en respuesta a múltiples factores de estrés abióticos y bióticos (indicado con +). De las distintas moléculas señalizadoras implicadas en estrés, ABA y H_2O_2 inducen la expresión de *KAT2*, a diferencia de JA y SA. B. La expresión del gen *KAT2* muestra un patrón de acumulación específico del tejido y momento del desarrollo, siendo esencial durante la germinación, desarrollo postgerminativo y senescencia (indicado con un +). Posiblemente su función biosintética de JA e IAA podría intervenir en los procesos relacionados con el tiempo de floración, el desarrollo floral y la senescencia. Se han subrayado aquellos factores de estrés o momentos del desarrollo que han sido relacionados por primera vez con el gen *KAT2* durante este trabajo.

Finalmente, el análisis de expresión del gen *KAT2* junto con los fenotipos encontrados en las plantas transgénicas *KAT2as*, sugieren que *KAT2* está implicada en múltiples procesos a lo largo del ciclo vital de la planta así como en las respuestas a estrés. Las defensas de las plantas y la senescencia tienen múltiples similitudes y muchos genes son coregulados durante ambas respuestas. La expresión del gen *KAT2* está regulada en respuesta a herida, patógenos necrotrofos, patógenos biotrofos, UV, deshidratación y en múltiples procesos del desarrollo de las plantas como el desarrollo postgerminativo, el desarrollo floral y la senescencia (figura 45). Por lo tanto, *KAT2* podría constituir un nodo entre las señales que activan defensa y desarrollo, y podría representar una interesante diana para estudiar el solapamiento entre procesos fisiológicos del desarrollo y las respuestas a estrés en plantas.

2. La proliferación de peroxisomas, las respuestas activadas por herida y la expresión de genes *PEX* están coregulados pero desacoplados en *Arabidopsis*.

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares ubicuos en todas las células eucariotas que presentan una alta plasticidad en respuesta a condiciones celulares, estados del desarrollo y cambios ambientales (Yan et al., 2005; Hayashi y Nishimura, 2006). La maquinaria celular y las rutas de señalización que regulan el número y tamaño de los peroxisomas han sido investigadas principalmente en levadura y mamíferos (Schrader y Fahimi, 2006a). Sin embargo, en los últimos años el estudio de la biogénesis y función de los peroxisomas de plantas se está convirtiendo en un campo de creciente interés. Los fibratos, caracterizados como proliferadores de peroxisomas e inductores de la β -oxidación en animales (Beier et al., 1988; Reddy y Chu, 1996, Corton et al., 2000) pueden tener funciones similares en células de plantas ya que se han descrito como inductores de la actividad acil-CoA oxidasa y del número de peroxisomas en guisante y tabaco (Palma et al., 1991; Nila et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo describen la existencia de una regulación cruzada entre la señalización activada en herida y la proliferación de peroxisomas en *Arabidopsis*, sugiriendo que ambos procesos parecen compartir elementos de señalización. El tratamiento con CFB produce en *Arabidopsis* un aumento del número de peroxisomas por célula (figuras 33-34), la activación de genes *PEX*, relacionados con la

biogénesis del orgánulo (figura 36) y la activación de genes de herida pertenecientes tanto a la vía independiente como dependientes de JA (figura 34). Además, la expresión del gen *PRI*, marcador de las respuestas frente a patógenos biotrofos, no se altera en respuesta a CFB (figura 34.A) o en cultivos celulares de soja tratados con otros compuestos PP como flufenamato o WY14,643 (Tenhaken et al., 2001), sugiriendo que compuestos PP producen una activación específica de las vías de señalización implicadas en la respuesta a la herida y no una activación generalizada de respuesta a estrés. De hecho, en este trabajo comprobaron que estos PP podían mimetizar al SA en alguna de las respuestas activadas durante la HR pero no durante SAR, indicando que de algún modo los PP pueden activar alguna de las vías de señalización activadas por SA durante la HR, pero no otras como la que da lugar a la inducción de *PRI* (Tenhaken et al., 2001). En Arabidopsis, hemos observado un aumento significativo del número de peroxisomas en respuesta a CFB únicamente en células del parénquima en empalizada (figura 38). Estas diferencias podrían deberse al modo de aplicación del tratamiento, porque el CFB solo penetrase en las capas de células más superficiales de las hojas, o podría deberse a que la respuesta a CFB se produjese de forma diferencial según el tipo celular. La proliferación de peroxisomas en respuesta a CFB que se ha observado en Arabidopsis es menor que la descrita en guisante o en animales, donde el número de peroxisomas varía ampliamente dependiendo del sistema biológico o del órgano analizado. En este trabajo se ha descrito un incremento, estadísticamente significativo, de 1,7 veces en el número de peroxisomas por sección de célula. Este valor corresponde a un gran incremento en el número de peroxisomas por volumen celular. Si se realiza un cálculo estimativo en el que se presupone una forma celular y peroxisomal esférica y se tiene en cuenta que las cuantificaciones se han realizado en secciones semifinas de 0,7 μM , se obtendrían valores entre 30 a 90 peroxisomas por célula en plantas control y entre 50 y 150 en plantas tratadas con CFB 2 mM, dependiendo de si la distribución del orgánulo en la célula es principalmente en las zonas periféricas o es en todo el volumen celular. En este sentido, se ha descrito que células procedentes de hígado animal tratadas con fibratos contiene un número comparable de peroxisomas al determinado en este trabajo (Colton et al., 2004). Por el contrario, el número de peroxisomas descrito en fibroblastos es aproximadamente 500 por célula (Chang et al., 1999), siendo notablemente más alto que el encontrado en células de Arabidopsis. Aunque se observaron agrupaciones de peroxisomas en las plantas *MFP2:YFP-MFP2* tratadas con CFB (figura 37), en las imágenes de la citoquímica con DAB obtenidas con microscopía óptica y electrónica no se observaron conexiones físicas entre los peroxisomas (figura 38-

39), indicando que el CFB no produce agregación de peroxisomas, y que podría ser el solapamiento de planos Z el causante de las agrupaciones observadas en las imágenes de microscopia confocal. La aparición de cadenas también puede deberse al movimiento de peroxisomas (revisado por Muench y Mullen, 2003; Wada y Suetsugu, 2004), aunque no se observaron en respuesta a herida o JA. En Arabidopsis se han descrito varios factores de estrés que inducen genes de la biogénesis de peroxisomas a través de mecanismos dependientes de H₂O₂ (López-Huertas et al., 2000). Entre ellos, la herida producía un aumento de la actividad luciferasa en plantas transgénicas *PEX1::LUC*, lo que fue interpretado como indicativo de la proliferación de peroxisomas en respuesta a herida (López-Huertas et al., 2000). Sin embargo, en este trabajo se han presentado datos experimentales basados en dos herramientas y metodologías independientes, que no apoyan la activación de la proliferación de peroxisomas en respuesta a herida en Arabidopsis (figura 37 y 38). De hecho, la herida producida en hojas de Arabidopsis, dio lugar al aumento de la expresión de varios genes de herida pero solo activó levemente la expresión de los genes *PEX1* y *PEX14* (figura 40), posiblemente a través de una vía independiente de JA ya que la aplicación exógena de JA no produjo ningún cambio en la expresión de los genes *PEX* (figura 40). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que la herida y el CFB operan a través de diferentes rutas de señalización, ya que aunque ambas situaciones producen la activación génica de *PEXs* y genes de herida, difieren en la capacidad de promover la proliferación de peroxisomas (figura 46). De hecho, se pone de manifiesto el desacoplamiento existente entre la activación de genes *PEX* en respuesta a herida y la proliferación de este orgánulo, como ya se había descrito previamente en respuesta a estrés osmótico (Charlton et al., 2005b). Otra de las diferencias observadas entre las vías de señalización activadas por CFB o por herida se relaciona con la vía de señalización que activa la expresión de genes dependientes de JA como *JR2*, ya que en respuesta a CFB parece ser independiente de la síntesis de JA y de la función de MYC2/JIN1/JAI1 pero dependiente de COI1 (figura 35-36), sugiriendo que COI1 es el componente en el que convergen ambas vías de señalización. Sin embargo, ya que las plantas *KAT2as* no tienen completamente bloqueada la síntesis de JA (figura 18), podría ser que la activación de *JR2* en respuesta a CFB se produjera a través de JA. Curiosamente, la activación de la expresión de los genes de herida como *JR2* o *KAT2* en respuesta a CFB o a herida no parecía requerir del transporte de proteínas peroxisomales mediado por *PEX14* al interior del peroxisoma, como se demuestra por la acumulación inalterada de los transcritos de *KAT2* y *JR2* en el mutante *pex14* (figura 42), sugiriendo que las vías de señalización activadas en respuesta a

herida permanecían intactas en este mutante. Entre otras, el importe de la proteína KAT2 es defectivo en el mutante *ped2/pex14* (Hayashi et al., 1998b; 2000a), sin embargo, se ha descrito que la localización peroxisomal de KAT2 es esencial para ser funcional en la síntesis de moléculas como JA (Afitlhile et al., 2005; Carrie et al., 2007), sugiriendo un desacoplamiento entre las respuestas a herida dependientes de la síntesis de JA y la funcionalidad de los peroxisomas. Una posible explicación para la inducción del gen *JR2* en respuesta a herida en las plantas *pex14* podría ser que la activación de este gen se produjera por otro precursor de la ruta biosintética. Está descrito que el OPDA puede activar la expresión del gen *JR2* así como otros genes dependientes de JA en ausencia de la síntesis de JA en el mutante *opr3* (Stintzi et al., 2001). Esta hipótesis también se apoya en los resultados obtenidos recientemente en el mutante *pex6*, que presenta defectos en la biogénesis de peroxisomas y en el importe de proteínas al interior del orgánulo, y que acumula una gran cantidad de OPDA en respuesta a herida, pero presenta niveles muy reducidos de JA (Delker et al., 2007). Estos resultados confirman que para la síntesis de JA es necesario tener peroxisomas funcionales (Delker et al., 2007) y, por tanto, las respuestas normales frente a herida en el mutante *pex14* se deberían posiblemente al efecto regulador del OPDA. Sin embargo, la expresión del gen *PEX1* tanto basal como inducida por la herida fue menor en las plantas *pex14* (figura 42.C.), sugiriendo que en el caso del gen *PEX1* y posiblemente de otros genes *PEX*, si se requieran peroxisomas íntegros para una completa activación de estos genes por herida. La activación del gen *JR2* en repuesta al CFB también podría deberse a OPDA, lo que explicaría la expresión inducida detectada en las plantas transgénicas *KAT2as*, deficientes en la síntesis de JA (figura 35.B). De igual manera, la expresión del gen *KAT2* por CFB también podría tener como intermediario al OPDA, ya que se ha descrito que este compuesto activa la expresión de *KAT2* en el mutante *opr3* (Stintzi et al., 2001). A pesar de estas posibles explicaciones, no se puede descartar que las plantas *pex14* puedan sintetizar JA ya que como se ha descrito en el mutante *ped2/pex14*, estas plantas son sólo defectivas parcialmente en el transporte de proteínas al interior de los peroxisomas (Hayashi et al., 2000a). Sin embargo, en el experimento de micromatrices realizado no aparece ningún gen de la biosíntesis de JA, excepto *KAT2*, que active su expresión en respuesta a CFB, lo que sugiere que la activación de genes que en respuesta a la herida se activan por OPDA o JA, en respuesta a CFB, lo harían a través de la síntesis de otra molécula distinta a JA y OPDA. Por último, la activación de genes como *JR2* en respuesta a CFB podría tener lugar por una vía totalmente desconocida en plantas, ya que en el análisis transcriptómico se han identificado varios FT del mismo tipo que

MYC2/JIN1/JAI1 (familia bHLH), cuya expresión varía en respuesta a CFB y que podrían estar regulando las respuestas a CFB por debajo de COI1.

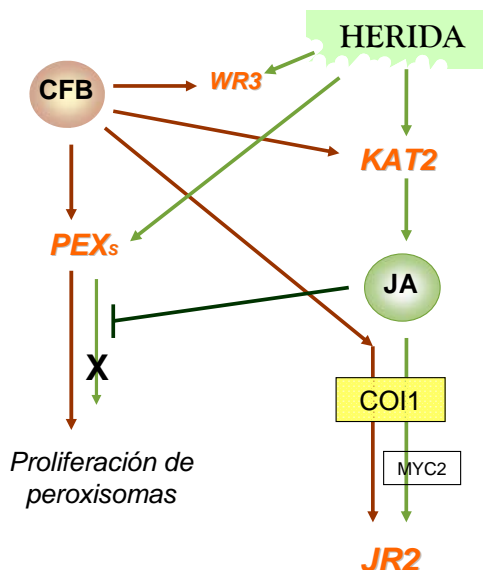


Figura 46. Esquema representativo de las conexiones entre las vías de señalización activadas por CFB y herida en *A. thaliana*.

En hojas heridas o tratadas con CFB, se produce un aumento de la expresión de genes *PEX* y de genes de respuesta a herida como *KAT2* y *JR2*. Sin embargo, existe un desacoplamiento en las vías de señalización activadas y en la proliferación de peroxisomas en ambos casos.

Además de las vías de señalización, en este trabajo se ha intentado relacionar las respuestas a herida o JA con cambios en el número de peroxisomas. El tratamiento de las hojas con JA produjo una disminución en el número de peroxisomas y un aumento del tamaño de éstos (figura 37-38), sugiriendo una regulación negativa del JA en la proliferación de peroxisomas. Sin embargo en patata se han descrito tanto incrementos en el tamaño como en el número de peroxisomas en respuesta a JA (Ulloa et al., 2002). Similar al fenotipo producido por JA, la deficiencia en algún gen de β -oxidación en *Arabidopsis* produce un aumento del tamaño y reducción del número de peroxisomas por acumulación

de ácidos grasos de cadena larga (Hayashi et al., 1998b; 2001; Germain et al., 2001; Pinfield-Wells et al., 2005; Funato et al., 2006). Ya que mutantes de β -oxidación presentan una menor acumulación de JA, este fenotipo se podría relacionar con una menor síntesis de JA, contrariamente a lo observado en este trabajo. Se ha descrito también una regulación negativa por JA en la expresión de algunos genes *PEX* (Charlton et al., 2005b), sugiriendo que el JA podría disminuir el número de peroxisomas alterando la expresión de estos genes. Por otra parte, el incremento en el número y tamaño de los peroxisomas puede ser debido a una función específica de esos orgánulos en procesos de detoxificación. De hecho, en el análisis con micromatrices del tratamiento con CFB se ha encontrado un incremento de la expresión de genes que codifican enzimas de detoxificación correlacionando con un mayor número de peroxisomas por célula. Como se ha comentado, los resultados obtenidos indican que el CFB causa un incremento en el número de peroxisomas pero no en el tamaño mientras que el JA produce un incremento en el tamaño y un menor número de estos orgánulos. En *Arabidopsis*, la proliferación, elongación y agregación de los peroxisomas está controlada por algunos componentes de la familia génica *PEX11* (Lingard y Trelease, 2006; Orth et al., 2007) y por la proteína *DRP3A* que controla la división peroxisomal (Mano et al., 2004). Los datos transcriptómicos publicados en las bases de datos (*Arabidopsis* eFP Browse) indican que en respuesta a la herida ni los genes *PEX11* ni el gen *DRP3A* alteran su expresión significativamente, mientras que el tratamiento con JA reprime la expresión de los genes *PEX11b* y *PEX11d* (Castillo et al., 2008). La sobreexpresión de los genes *PEX11* provoca que las proteínas correspondientes se dirijan a la membrana peroxisomal donde individualmente producen duplicación (*PEX11a*, -e), agregación (*PEX11b*) o elongación sin fisión (*PEX11c*, -d) de los peroxisomas (Lingard y Trelease 2006; Orth et al., 2007). En el tratamiento con JA, donde se reprime la expresión de los genes *PEX11b* y *PEX11e* según los datos transcriptómicos, se esperaría una pérdida en la agregación y elongación de los peroxisomas, pero no un incremento en el tamaño peroxisomal. Recientemente se ha publicado que la expresión heteróloga de *AtPEX11e* en el mutante nulo *pex11* de *Saccharomyces cerevisiae* incrementa el número y reduce el tamaño de los peroxisomas (Orth et al., 2007). Aunque los datos transcriptómicos parecen indicar que el JA no está regulando directamente la expresión de los genes *PEX11* o *DRP3A* (Castillo et al., 2008), se necesitaría un análisis más detallado para determinar las posibles interacciones entre la ruta de señalización activada por JA y la proliferación de peroxisomas que explicase las modificaciones en el tamaño y número de peroxisomas. Además, ya que las aproximaciones experimentales para analizar el número de peroxisomas

en los tratamientos se realizaron en un tiempo determinado, no se puede descartar que aunque no se observe incremento en el número de orgánulos por célula, no haya un balance entre proliferación y degradación, que conduzca finalmente a una situación estable del número de peroxisomas. Serían necesarios estudios *in vivo* a lo largo del tiempo para discriminar estos procesos.

3. Arabidopsis presenta múltiples respuestas frente al proliferador de peroxisomas CFB.

3.1. El CFB produce una respuesta de detoxificación general en Arabidopsis.

En los últimos años, se han identificado y caracterizado parte de los componentes implicados en la biogénesis y función de los peroxisomas en plantas, sin embargo, no se conocen las señales y las vías de percepción y transducción que participan en la proliferación de estos orgánulos (Hu, 2007). En levaduras y mamíferos, la cascada de señalización que conduce a la proliferación de peroxisomas comienza con la unión de los PP, tanto endógenos como artificiales, a los PPARs, que a su vez inducen la transcripción de los genes que codifican a las proteínas PEX11, que actúan desencadenando finalmente la proliferación de peroxisomas junto a las proteínas DRP (Brown y Plutzky, 2007; Grimaldi, 2007). Esta cascada de señalización no está conservada en plantas, de hecho, no existe ningún gen que codifique una proteína con similitud a las PPARs de animales en ningún genoma de plantas. Sin embargo, evidencias previas y resultados incluidos en este trabajo sugieren que las plantas tienen moléculas que actúan como ligandos de las PPARs y que PP artificiales como el CFB son capaces de producir proliferación de peroxisomas en plantas (Palma et al., 1991; Nila et al., 2006). Por tanto, las plantas parecen compartir al menos, algunos componentes de las rutas de señalización que conducen a la biogénesis y proliferación de peroxisomas. Sin embargo, no existe ninguna información del modo de acción del CFB en plantas, lo que ha motivado la necesidad de llevar a cabo un análisis transcriptómico que permita analizar los efectos del CFB como un regulador de la expresión génica y las posibles interacciones con las vías de señalización activadas en respuesta a estrés en plantas. Además de actuar como proliferador de peroxisomas, el CFB

es un compuesto xenobiótico tóxico que induce múltiples procesos de detoxificación en animales (Bock et al., 1990). En los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios transcriptómicos en animales para analizar las respuestas a xenobióticos (Kiyosawa et al., 2003; Reichert y Menzel, 2005), a proliferadores de peroxisomas (Tamura et al., 2006) y a otras moléculas relacionadas con PPARs (Bünger et al., 2007). Sin embargo, este tipo de estudios no se ha llevado a cabo en plantas. Las comparaciones entre los transcriptomas de plantas tratadas con CFB a las 24 h con plantas no tratadas revelaron que aproximadamente el 2 % de los genes representados en las micromatrices modificaban diferencialmente su expresión de manera estadísticamente significativa y con cambios superiores a 1,6 veces en respuesta a CFB, tanto activando su expresión (48,9 %) como disminuyéndola (51,2 %). El análisis de las categorías funcionales diferencialmente representadas empleando herramientas de Ontología Génica incluidas en el paquete de aplicaciones FatiGO+ (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es>; Al-Shahrour et al., 2004; 2007) mostró que el CFB producía una sobrerrepresentación de categorías funcionales relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo, respuesta al calor, respuesta a la pérdida de agua y al catabolismo de toxinas (tabla III) en los genes inducidos, sugiriendo que el CFB provocaba una respuesta relacionada mayoritariamente con estrés. La categoría de respuesta al calor estaba compuesta principalmente por proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP). En animales, se ha descrito que un miembro de la familia de proteínas de choque térmico HSP70 de mamíferos une CFB específicamente (Alvares et al., 1990), y también que esta unión conlleva la participación de PPARs en ratones (Huang et al., 1994). En este sentido, las HSP se han relacionado con la activación de las PPARs para producir la proliferación de peroxisomas (Latruffe y Vamecq, 1997; Sumanasekera et al., 2003). Estos resultados sugieren que en plantas las sHSP se podrían unir a CFB, siendo por tanto potenciales componentes del sistema de percepción o de la transducción de la ruta de señalización de CFB. Apoyando esta hipótesis, entre los genes diferencialmente expresados en respuesta a CFB aparece uno que codifica una proteína similar a HSP70. Una función alternativa para la HSP70 sería la de actuar como regulador de la interacción entre PEX5 y los péptidos señal PTS1 de las proteínas peroxisomales (Harano et al., 2001). Por otro lado, recientemente se han descrito varias proteínas sHSP de localización proxisomal en *Arabidopsis* que aumentan su expresión en respuesta a estrés oxidativo (Reumann et al., 2004; Ma et al., 2006), lo que podría indicar que la inducción de las proteínas sHSP podría deberse al estrés oxidativo causado por el CFB. Curiosamente, varias de las sHSP diferencialmente expresadas en respuesta a CFB, aumentan su expresión en respuesta a

OPDA (Taki et al., 2005) o en respuesta a herida independiente de JA (Devoto et al., 2005). Por otro lado, prácticamente la totalidad de genes inducidos incluidos en las categorías sobrerrepresentadas en respuesta a CFB referentes a estrés oxidativo, transporte electrónico y catabolismo de toxinas, codifican oxidoreductasas, peroxidasas, glutatión peroxidasas, citocromos P450 y glutatión-S-transferasas (tabla V-VII). Estos grupos de proteínas están implicados principalmente en las fases I y II de las respuestas de detoxificación a xenobióticos (Coleman et al., 1997; Sheweita et al., 2000; Iyanagi et al., 2007). Los procesos de detoxificación de xenobióticos normalmente implican una fase III que requiere la función de transportadores específicos de membrana tipo ABC (Martinoia et al., 2002; Rea, 2007), que movilizan los xenobióticos al interior de las vacuolas o al espacio apoplástico vía exocitosis. Aunque no se ha encontrado una sobrerrepresentación diferencial de los genes que codifican estos transportadores en respuesta al CFB, en el conjunto de genes inducidos significativamente por CFB aparecen varios genes que codifican transportadores ABC y proteínas de la familia MATE (datos no mostrados), que recientemente se han descrito como componentes esenciales de la fase III de detoxificación de xenobióticos (Omote et al., 2006). Estos resultados indican que el CFB desencadena una respuesta típica de detoxificación en *Arabidopsis*, actuando principalmente como un xenobiótico. De hecho, entre los 50 genes con mayor valor de inducción en respuesta a CFB, aproximadamente el 25 % codifican glutatión-S-transferasas, UDP-glucosiltransferasas, citocromos P-450 y reductasas (tabla III). De estos genes, un tercio también aumentan su expresión en respuesta al compuesto aleloquímico benzoxazolin-2(3H)-one en *Arabidopsis* (Baerson et al., 2005), sugiriendo que ambos compuestos activan la expresión de genes que codifican componentes comunes en las respectivas rutas de señalización.

La aplicación de las herramientas de Ontología Génica al grupo de genes significativamente reprimidos por CFB indicó que las categorías funcionales que aparecen sobrerrepresentadas están relacionadas con el metabolismo, el transporte de lípidos y la pared celular. Las categorías relacionadas con el metabolismo de biopolímeros, de fósforo y de glucosinolatos, contienen en todos los casos, un gran número de genes que codifican proteínas quinasas. Los glucosinolatos son un grupo de metabolitos secundarios de plantas relacionados con las respuestas de defensa frente a herbívoros. En tejidos dañados, los glucosinolatos son hidrolizados por mirosinas dando lugar a una gran variedad de productos tóxicos con diferentes actividades biológicas relacionadas con la interacción con

patógenos e insectos herbívoros (Rask et al., 2000; Barth y Jander, 2006, Yan y Chen, 2007; Beekwilder et al., 2008). Las rutas de señalización implicadas en la activación de glucosinolatos están reguladas, al menos parcialmente, por JA, SA y Et (Grubb y Abel, 2006; Yan y Chen, 2007), sugiriendo que el CFB podría interaccionar de alguna manera con las rutas de señalización de estas hormonas para reprimir los genes relacionados con el metabolismo de glucosinolatos. De acuerdo con estos resultados, entre los 50 genes que presentan una mayor represión en respuesta al CFB, aproximadamente el 30 % codifican genes relacionados con proteínas de defensa, incluyendo inhibidores de proteasas, defensinas, proteínas relacionadas con patogénesis, proteínas de la familia de las jacalinas similares a mirosinasas y otras proteínas relacionadas con alteraciones de la pared celular como expansinas y xiloglucano endotransglucosilasas (tabla IV). Además, otra categoría funcional diferencialmente representada entre los genes reprimidos en respuesta a CFB está relacionada con la organización de la pared celular, incluyendo genes relacionados con el metabolismo de la prolina e hidroxiprolina. Varios péptidos ricos en hidroxiprolina derivados de la pared celular están relacionados con las respuestas a herida y patógenos en plantas (Pearce et al., 2001, Pearce y Ryan, 2003; Ryan y Pearce, 2003; Narváez-Vásquez et al., 2005; 2007; Deepak et al., 2007). También se encuentran entre los genes reprimidos por CFB un grupo que codifica proteínas relacionadas con el transporte de lípidos (LTP). Estas proteínas de pequeño tamaño son muy abundantes en plantas y en *Arabidopsis* existen más de 15 genes que codifican LTPs que se expresan diferencialmente en el desarrollo, tejidos de las plantas y distintas situaciones fisiológicas (Thomma et al., 1994; Vignols et al., 1997; Arondel et al., 2000). Las LTPs tienen un péptido señal de secreción extracelular y pueden estar presentes en la pared celular (Thomma et al., 1993; Kader, 1996). Aunque las funciones fisiológicas reales de las LTPs todavía no se han determinado, éstas se han relacionado con la síntesis de cutina, con β -oxidación, con embriogénesis, funciones alergénicas, señalización y defensa (Carvalho y Gomes, 2008). Existen múltiples evidencias que relacionan las LTPs con funciones antipatogénicas y antimicrobianas (Molina et al., 1993; Segura et al., 1993; Cammue et al., 1995; Molina y García-Olmedo, 1997; Kristensen et al., 2000; Velazhahan et al., 2001; Ge et al., 2003; Wang et al., 2004). También está bien documentada la inducción de los genes que codifican LTPs en respuesta a estrés hídrico, frío, estrés salino y a la infección con patógenos (Jung et al., 2003; Jang et al., 2004) a través de rutas de señalización en las que participan el ABA, SA, Et y JA (García-Garrido et al., 1998; Jung et al., 2003; 2006). En conclusión, las categorías significativamente sobrerrepresentadas entre los genes reprimidos en respuesta a CFB

sugieren que esta droga hipolipidémica reprime de forma generalizada genes relacionados con los mecanismos de defensa inducidos contra patógenos y plagas, lo que podría deberse a un efecto colateral debido a la respuesta de detoxificación que se produce en respuesta a CFB y que detraería energía y recursos de otros procesos inducibles. Sin embargo, en respuesta a CFB también se produce una disminución de una categoría funcional relacionada con el metabolismo de biopolímeros, entre los que se encuentra un gen de la familia de las celulosa sintasa (tabla VII). La celulosa es el polímero mayoritario en las plantas (Taylor, 2008) y en algunos casos, defectos en celulosas sintasas se han relacionado con un aumento de la resistencia a varios patógenos tanto asociada a la activación de las vías de señalización dependientes de JA/Et (Ellis y Turner, 2001; Ellis et al., 2002a; 2002b), como independiente de la señalización de SA, Et y JA (Hernández-Blanco et al., 2007). También se ha descrito un aumento de la resistencia a estrés hídrico y osmótico en esos mutantes asociado a un incremento de los niveles de ABA (Chen et al., 2005). Estos datos sugieren que en general el CFB podría deprimir las defensas de la planta, pero que algunos de sus efectos relacionados con la alteración de la pared celular podría conducir de forma colateral a un incremento de la resistencia frente a algunos patógenos concretos.

3.2. El CFB y diferentes factores de estrés coregulan un amplio grupo de factores de transcripción en Arabidopsis.

Finalmente, en las categorías diferencialmente expresadas en respuesta a CFB, tanto correspondientes a genes activados como reprimidos, aparece una relacionada con el metabolismo de ácidos nucleicos que incluye un gran número de FTs (tablas V-VII), posiblemente relacionados con las vías de señalización desencadenadas desde la percepción de CFB hasta la activación de las respuestas. Concretamente, se han identificado 16 y 14 genes que codifican FTs que aumentan o disminuyen, respectivamente, su expresión en respuesta a CFB y que pertenecen a 13 familias diferentes (The Database of Arabidopsis Transcription Factors, <http://datf.cbi.pku.edu.cn/>). Entre los FTs inducidos, existe una sobrerrepresentación de aquellos pertenecientes a la familia NAC. Esta familia está formada por un grupo de FTs específicos de plantas y comprende más de 100 miembros implicados en la regulación del desarrollo embrionario, floral y vegetativo así como en defensa contra factores de estrés tanto abióticos como bióticos (Olsen et al., 2005). Entre ellos se encuentra ANAC019, que se ha relacionado con la resistencia a estrés hídrico (Tran et al., 2004) y

que, se ha descrito recientemente como integrante de la vía de señalización dependiente de JA situado por debajo de COI1 y MYC2 (Bu et al., 2008). Los FTs negativamente modulados por CFB pertenecen mayoritariamente a las familias bHLH, bZIP, MYC y C2C2 implicados en funciones muy variadas relacionadas con la señalización hormonal, crecimiento celular y diferenciación, fotomorfogénesis y respuestas a estrés (Qu y Zhu, 2006). El análisis de la expresión génica de los diferentes FTs en respuesta a un amplio rango de factores de estrés tanto bióticos como abióticos, así como en respuesta a diferentes moléculas señalizadoras, mostró una gran correlación entre los efectos producidos por el CFB y las respuestas a estrés en *Arabidopsis* (figura 44). De hecho, los FTs que son inducidos o reprimidos por CFB también son en gran medida inducidos o reprimidos igualmente en las diferentes situaciones de estrés analizadas, siendo en estrés osmótico y salino donde se produce la máxima correlación (figura 44). Entre las hormonas, la máxima correlación se produjo con ABA entre los FT inducidos y con MeJA y ABA entre los FT reprimidos por CFB (figura 44). Además, se observó una buena correlación entre los FTs regulados por CFB y las respuestas a patógenos biotrofos y necrotrofos, ya que prácticamente todos los FTs inducidos o reprimidos por CFB, lo hacen de igual manera en respuesta a patógenos (figura 44). Todos estos resultados sugieren que las vías de señalización activadas por CFB comparten múltiples elementos de las vías de señalización activadas por estrés y por moléculas señalizadoras relacionadas, siendo la regulación similar en ambos casos. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el CFB produce una disminución de los genes relacionados con defensa, lo que implica que el CFB y las respuestas a estrés, aunque comparten los mismos componentes reguladores, regulan finalmente la expresión de genes de defensa de forma contraria, sugiriendo una gran divergencia en los pasos finales de las rutas de señalización activadas en respuesta a CFB y en respuesta a los factores de estrés analizados. Este hecho apunta de nuevo a la función principal del CFB como xenobiótico que desencadena respuestas de detoxificación en *Arabidopsis* y que, como hemos descrito previamente, produce proliferación de peroxisomas. Sin embargo, no se han detectado cambios significativos en la expresión de genes *PEX* en respuesta a CFB, sugiriendo que el CFB puede ejercer su función proliferadora de peroxisomas modulando la expresión de genes *PEX* en un nivel postranscripcional e incluso en niveles post-transduccionales. Por otro lado, varios estudios relacionan la proliferación de peroxisomas con el estrés oxidativo (Palma et al., 1991; Romero-Puertas et al., 1999). En este sentido, la proliferación de peroxisomas causada por CFB en *Arabidopsis* podría ser sólo un efecto colateral de las respuestas de detoxificación

producidas por este xenobiótico. Los peroxisomas contienen moléculas antioxidantes como el ascorbato y el glutatión y también una batería de enzimas antioxidantes, y por tanto, la biogénesis de peroxisomas en respuesta al CFB podría ser requerida para una rápida disponibilidad de nuevas moléculas antioxidantes. Además, cambios en la actividad de estas enzimas antioxidantes se correlacionan con situaciones de estrés en plantas (Corpas et al., 2001) y hemos comprobado que el CFB desencadena respuestas muy similares a otros factores de estrés. Por otro lado, la función de CFB como agente inductor de la proliferación de peroxisomas o como xenobiótico están fuertemente ligadas y la prevalencia de una u otra función podría ser dependiente de la dosis, tal como se ha descrito previamente en animales (Kramel et al., 2003).

Conclusiones

1. Los genes *KAT* de *Arabidopsis* muestran un patrón de expresión específico de tejido y momento del desarrollo. El gen *KAT2* presenta una activación transcripcional durante el desarrollo postgerminativo y la senescencia, y un patrón de expresión dinámico a lo largo del desarrollo y maduración de la flor y el fruto.
2. La herida activa transcripcionalmente genes que codifican enzimas de la β -oxidación. Los genes *KAT* presentan patrones de inducción específicos en respuesta a herida que difieren en la participación de JA. La activación de *KAT2* es independiente de la señalización mediada por JA pero ésta es necesaria para la activación del gen *KAT5*.
3. Este trabajo ha aportado la primera evidencia de un enzima de β -oxidación implicada en la biosíntesis de JA en plantas. La expresión reducida del gen *KAT2* conlleva una disminución de los niveles de JA en respuesta a la herida, que correlaciona con una disminución de las respuestas de defensa dependientes de esta hormona.
4. La activación de respuestas dependientes de SA no está alterada en plantas con expresión reducida de *KAT2*, indicando que la vía de síntesis de SA dependiente de β -oxidación no es activa en respuesta a estrés en *Arabidopsis*.
5. La expresión reducida del gen *KAT2* produce un retraso de la senescencia natural o inducida por oscuridad, demostrando que *KAT2* es un factor regulador necesario para la correcta activación del programa de senescencia foliar.
6. La expresión del gen *KAT2* se activa por un amplio rango de factores de estrés y durante diferentes etapas del desarrollo. La convergencia de las diferentes vías de señalización en *KAT2* le confiere la potencialidad de actuar como un nodo y, por tanto, representa una interesante diana para estudiar el solapamiento entre desarrollo y respuestas a estrés en plantas.
7. La aplicación de CFB, droga hipolipidémica que induce proliferación de peroxisomas en células animales, da lugar a un mayor número de estos orgánulos por célula en el parénquima en empalizada de hojas. El JA actúa como un regulador negativo de la proliferación de peroxisomas y provoca, además, un aumento del tamaño de estos

orgánulos. La herida, en cambio, no altera ni el tamaño ni el número de peroxisomas por célula.

8. La herida y el CFB producen la activación transcripcional de genes relacionados con la biogénesis de peroxisomas, de genes de β -oxidación y de genes marcadores de herida tanto de la vía independiente como dependiente de JA. Aunque las correspondientes vías de señalización tienen elementos comunes como COII, se trata de procesos desacoplados que difieren en la capacidad de promover proliferación de peroxisomas.

9. La activación transcripcional de genes de β -oxidación y de genes de herida no está vinculada con la integridad de los peroxisomas, ya que plantas con peroxisomas morfológicamente alterados y defectos en el importe de proteínas peroxisomales, no presentan alteraciones en la inducción de estos genes en respuesta a herida, JA ó CFB.

10. En *Arabidopsis*, el CFB se percibe fundamentalmente como un compuesto xenobiótico activando mayoritariamente la expresión de genes que codifican componentes característicos de la respuesta de detoxificación de xenobióticos. Paralelamente, el CFB produce la represión de numerosos genes que codifican componentes de defensa de la planta frente a patógenos y plagas.

Materialles y Métodos

1. Material biológico y condiciones de cultivo.

1.1. Plantas: *Arabidopsis thaliana*.

Se utilizó como sistema experimental el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* por su utilidad para el análisis genético y molecular (Pang y Meyerowitz, 1987; Goodman et al., 1995; Meinke et al., 1998; Somerville y Koornneef, 2002). Los ecotipos silvestres empleados fueron Columbia-0 (Nottingham Arabidopsis Stock Center) y Columbia (Lehle Seed, Tucson, Arizona). Para los análisis comparativos se utilizó la línea transgénica nahG cedida por el Dr. John Ryals (Corporación Ciba-Geigy, USA), incapaz de acumular SA porque lo degrada rápidamente a catecol (Delaney et al., 1994; Lawton et al., 1995), el mutante hipersensible a la infección con patógenos virulentos *dth9* (Mayda et al., 2000) cedido por el Dr. Pablo Vera (IBMCP, Valencia) y los mutantes insensibles a JA *coi1-1* (Feys et al., 1994) y *jail-1/jin1-1* (Lorenzo et al., 2004), cuyo fondo genético es en todos los casos Col-0. Los mutantes *coi1-1* y *jail-1/jin1-1* fueron cedidos por el Dr. John Turner (University of East Anglia, Norwich) y por el Dr. Roberto Solano (CNB, Madrid) respectivamente. El mutante *coi1-1* presenta androesterilidad, y por tanto, las plántulas homocigotas *coi1-1* fueron seleccionadas por diferencias en la longitud de la raíz de una población segregante F2 procedente del cruce *coi1-1* x Col-0. La mutación *coi1-1* en homocigosis produce un crecimiento normal de la raíz en plántulas cultivadas en presencia de JA, a diferencia de las plántulas silvestres y heterocigotas que sufren un acortamiento por el efecto inhibitorio del JA sobre el crecimiento de la raíz (Staswick et al., 1992; Creelman y Mullet, 1997b).

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* se llevó a cabo en placas Petri con 4,4 gr·L⁻¹ de medio MS estéril (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 10 gr·L⁻¹ de sacarosa y con pH 5,7 ajustado previamente a la adición del agar (8 gr·L⁻¹). Para la selección de plantas transgénicas por resistencia a un antibiótico se añadió al medio kanamicina 50 mg·L⁻¹ o gentamicina 75 mg·L⁻¹, dependiendo de la resistencia incluida en el plásmido binario utilizado. Para la selección de plántulas homocigotas *coi1-1* se añadió al medio JA 20 µM (Duchefa). Para el análisis de la longitud de la raíz de plántulas, las semillas se cultivaron en placas Petri cuadradas 12x12 cm en posición vertical. En el caso de cultivo *in vitro* en medio líquido, se utilizaron placas de 24 pocillos (Costar) conteniendo 1 ml de medio MS estéril (4,4 gr·L⁻¹) suplementado con 5 gr·L⁻¹ sacarosa. En cada pocillo se colocaron entre 6

y 8 semillas y el cultivo se llevó a cabo en agitación suave (50 r.p.m.) añadiendo 0,5 ml de medio fresco al octavo día. Finalmente, los tratamientos se realizaron tres días después, cuando las plántulas tenían 11 días. En todos los experimentos realizados con cultivo *in vitro* las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito sódico al 30 % (v/v) y el surfactante Tween-20 al 0,02 % (v/v), manteniendo agitación constante durante 10 min. y realizando a continuación cinco lavados con agua miliQ estéril. Con el fin de favorecer y sincronizar la germinación, las semillas se estratificaron entre 3 y 4 días a 4 °C previamente a la colocación en las cámaras de cultivo *in vitro* que tenían un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (día largo, DL) y 21-23 °C de temperatura. Por último, las plántulas de entre 11 a 14 días cultivadas en condiciones *in vitro* fueron utilizadas para realizar los experimentos oportunos o transferidas a tierra y cultivadas en las condiciones descritas a continuación. El cultivo en tierra tanto de semillas, estratificadas previamente, como de plántulas se realizó sobre un sustrato compuesto por turba, vermiculita y perlita (2:1:1) y se llevó a cabo en cámaras con un fotoperiodo de DL o con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad (día corto, DC). En todos los casos las plantas se iluminaron con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes con una intensidad de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura osciló entre 20 y 22 °C a lo largo del día manteniendo una humedad relativa en torno al 60 %.

1.2. Bacterias.

1.2.1. *Escherichia coli*.

Para la propagación y purificación de plásmidos se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α cultivada en medio Luria-Bertani (LB) estéril tanto en medio líquido como en placa Petri (20 gr·L⁻¹), suplementado en este caso con agar (15 gr·L⁻¹). Para la selección de bacterias transformadas con el plásmido de interés se añadió al medio el antibiótico correspondiente según el caso, concretamente, ampicilina 50 mg·L⁻¹, kanamicina 100 mg·L⁻¹ o espectinomicina 50 mg·L⁻¹, manteniendo el cultivo en agitación constante (200 r.p.m.) a 37 °C durante una noche.

1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*.

Para llevar a cabo las transformaciones estables de plantas de *A. thaliana* se utilizó la cepa C58PMP90 de *A. tumefaciens* cultivada en medio LB estéril de forma similar a los

cultivos de *E. coli*, pero manteniendo en este caso el cultivo en agitación constante (200 r.p.m.) a 28 °C durante dos días. La cepa C58PMP90 posee resistencia a rifampicina (Deblaere et al., 1985) que se adicionó al medio en todos los casos (50 mg·L⁻¹). Además, en cada transformación, se añadió el antibiótico correspondiente según el plásmido binario utilizado, kanamicina 100 mg·L⁻¹ o espectinomicina 50 mg·L⁻¹.

1.2.3. *Pseudomonas syringae*.

La bacteria fitopatogénica *P. syringae* pv. tomato DC3000 conteniendo el plásmido de avirulencia *AvrRpm1* (cepa avirulenta) (Grant et al., 1995) o sin éste (cepa virulenta) fueron cedidas por el Dr. Pablo Tornero (IBMCP, Valencia). *P. syringae* se cultivó en medio King's B sólido suplementado con rifampicina 50 mg·L⁻¹ en todos los casos y con kanamicina 50 mg·L⁻¹ en el cultivo de la cepa avirulenta debido a la resistencia incluida en el plásmido *avrRpm1*. Los cultivos se mantuvieron durante dos días a una temperatura de 28 °C .

1.3. Hongos: *Plectosphaerella cucumerina*.

En el estudio realizado con patógenos necrotrofos se utilizó el hongo fitopatógeno *P. cucumerina* que se aisló de su hospedador natural *A. thaliana* ecotipo Lansberg erecta y se cultivó en medio sólido Potato Dextrose Agar (Difco) (19 g·L⁻¹) durante dos semanas a temperatura ambiente.

2. Tratamientos aplicados a las plantas.

Para llevar a cabo este trabajo, las plantas de *A. thaliana* fueron sometidas a diferentes factores de estrés tanto de tipo biótico como abiótico y a distintos tratamientos exógenos con compuestos químicos como se detalla a continuación. Las muestras compuestas por tejido (hojas, flores, etc.) procedentes de al menos tres plantas, se recogieron a los tiempos o concentraciones indicadas en cada experimento, congelándolas en N₂ líquido y siendo almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis, excepto en los casos en que se indica otro tipo de análisis de las muestras.

2.1. Herida.

Los estudios de herida se realizaron normalmente en plantas de tres semanas cultivadas en tierra en condiciones de DL y ocasionalmente en plántulas cultivadas *in vitro*. Para cada planta, se dañaba mediante pinzas con extremos estriados la mitad de las hojas de la roseta con tres pinzamientos transversales al eje de la hoja dañando la nervadura principal. Las hojas heridas se emplearon para el análisis de la respuesta local y las hojas no heridas para analizar la respuesta sistémica.

2.2. Aplicación exógena de fitohormonas (JA, SA y ABA) y de CFB.

El CFB (Sigma-Aldrich) y el JA (Duchefa) son líquidos no solubles en agua y las disoluciones utilizadas se prepararon a partir de soluciones stock preparadas en etanol absoluto con la correspondiente dilución en agua y agitadas vigorosamente. La emulsión resultante, con la concentración equivalente indicada en cada caso, se empleó para realizar los tratamientos. Las aplicaciones exógenas de JA, ABA (Sigma-Aldrich-Aldrich Química), SA (Merck) o CFB fueron realizadas por pulverización en las plantas cultivadas en tierra o cultivadas *in vitro* hasta la completa humidificación de las hojas. En plántulas cultivadas *in vitro* en placas multipocillo, los distintos compuestos se añadieron al medio MS líquido. Concretamente, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con la concentración de hormona o CFB correspondiente cuando las plántulas tenían 11 días. En el caso de plantas cultivadas en tierra, tras la pulverización de los compuestos, cada conjunto de plantas tratadas se mantuvo aislado del resto para evitar contaminaciones entre tratamientos.

2.3. Deshidratación.

Los experimentos de deshidratación se llevaron a cabo en plántulas cultivadas *in vitro*, en hojas de roseta cortadas de plantas adultas o en plantas enteras cultivadas en tierra. En el primer caso, las plántulas de 10 días de edad cultivadas en medio líquido se colocaron sobre papel Whatman 3MM en cabinas de flujo controlado eliminando suavemente el medio de cultivo remanente en las plántulas y analizando a continuación los porcentajes de deshidratación progresivos a lo largo del tiempo. Este porcentaje se calculó como el cociente entre el peso fresco posterior a la deshidratación y el peso fresco inicial de cada plántula. En plantas adultas, los experimentos de deshidratación se realizaron en hojas de

roseta cortadas analizando el porcentaje de deshidratación a lo largo del tiempo de manera similar a la descrita anteriormente. Además, se llevaron a cabo estudios de deshidratación en plantas adultas sometidas a la falta de riego durante un periodo prolongado. Para ello plantas de los genotipos de interés se cultivaron en tierra empleando bandejas de 15x20 cm situando 12 ó 13 plantas de los distintos genotipos por bandeja de forma aleatoria pero con una localización conocida dentro de cada una para evitar resultados sesgados por localización de las plantas. Cuando las plantas tenían aproximadamente un mes de edad se dejaron de regar y se analizó *de visu* el estado de deshidratación en los días siguientes. Finalmente, a las plantas que presentaban un alto grado de deshidratación, donde únicamente las hojas más nuevas permanecían turgentes, se les añadió de nuevo riego para analizar posibles diferencias en los procesos de rehidratación.

2.4. Inoculación con el hongo fitopatógeno *Plectosphaerella cucumerina*.

Para el análisis con patógenos necrotrofos, se inocularon plantas adultas cultivadas en tierra mediante aspersión con una suspensión de *P. cucumerina* de $5 \cdot 10^6$ esporas·ml⁻¹ resuspendidas en MgSO₄ 10 mM estéril hasta completa humidificación de las hojas. Las plantas se mantuvieron aisladas con una humedad relativa del 100 % durante tres días.

2.5. Inoculación con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000.

Los estudios con los patógenos de tipo biotrofo se llevaron a cabo empleando la bacteria fitopatógena *P. syringae* pv tomato DC3000, tanto la cepa virulenta como la cepa avirulenta que contiene el plásmido de avirulencia *avrRpm1* (Glazebrook et al., 1997). En ambos casos las bacterias se cultivaron como se indica en el apartado 1.2.3.

2.5.1. Inoculación por infiltración.

Los cultivos bacterianos procedentes de la cepa avirulenta y virulenta se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 10 min. lavando luego el sedimento bacteriano con 20 ml de MgSO₄ 10 mM en dos ocasiones. A continuación, según el valor de la absorbancia medida en el cultivo resuspendido en 10 ml de MgSO₄ 10 mM, se realizó una dilución para

obtener finalmente un cultivo bacteriano con una $DO_{600} = 0,1$ (equivalente a $5 \cdot 10^7$ unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por ml) en el caso de la cepa avirulenta y una $DO_{600} = 0,05$ (equivalente a 10^4 u.f.c./ml) en el caso de la cepa virulenta. Estas suspensiones bacterianas disueltas en $MgSO_4$ fueron infiltradas con jeringa de 5 ml sin aguja por la cara abaxial de las hojas de roseta comprobando su entrada en el apoplasto en aproximadamente el 50 % de la superficie foliar. Se infiltraron de igual manera plantas con una solución de $MgSO_4$ 10 mM utilizadas como control negativo de los experimentos. En estos estudios se emplearon plantas cultivadas en tierra en condiciones de DC durante dos meses que disponen de una mayor superficie foliar y se inocularon en cada planta la mitad de las hojas de la roseta, analizando la respuesta local en las hojas infiltradas y la respuesta sistémica en el resto de hojas de roseta no inoculadas.

2.5.2. Inoculación por inmersión.

Los cultivos bacterianos procedentes de las dos cepas se resuspendieron en Cl_2Mg 10 mM, se midió la absorbancia y se realizó la dilución necesaria para obtener nuevamente un cultivo bacteriano con una $DO_{600} = 0,1$ en el caso de la cepa avirulenta y una $DO_{600} = 0,05$ en el caso de la cepa virulenta. Estos análisis se llevaron a cabo en plántulas de 14 días cultivadas en tierra en condiciones de DC en las que la inoculación se realizó mediante la inmersión de las plántulas durante 20 segundos en la solución bacteriana manteniendo durante la hora siguiente a las plántulas en condiciones de alta humedad. Las plántulas inoculadas se emplearon para la medición del crecimiento de bacterias descrita a continuación.

2.5.3. Curvas de crecimiento de bacterias.

El crecimiento bacteriano en las plántulas inoculadas por inmersión tanto con la bacteria virulenta como con la avirulenta se evaluó a la hora postinoculación (considerado el inóculo a tiempo 0) y a las 72 horas posteriores siguiendo el método previamente descrito (Tornero y Dangl, 2001) con ligeras modificaciones que se describen brevemente a continuación. En primer lugar, grupos formados por cuatro plántulas pesadas previamente, se agitaron vigorosamente durante 1 hora a 28 °C en un tubo Eppendorf® con 1 ml de Cl_2Mg 10 mM y el surfactante Silwet L-77 ($200 \mu l \cdot L^{-1}$). En placas de microtitulación de 96 pocillos se introdujo en cada pocillo 180 μl de Cl_2Mg 10 mM y a continuación, 20 μl de las

suspensiones bacterianas resultantes de cada grupo se añadieron a la primera columna de las placas de microtitulación, dando lugar a la dilución 10^{-1} . A partir de ésta, con una pipeta multicanal se realizaron diluciones seriadas en los siguientes pocillos, llegando a diluciones de 10^{-6} para cada muestra. Las diluciones obtenidas en cada placa de microtitulación fueron replicadas en placas Petri de 15 cm de diámetro con medio LB suplementado con los antibióticos necesarios según la cepa de *Pseudomonas* empleada (ver apartado 1.2.3). empleando un replicador de 96 puntas que depositaba gotas de 10 μ l sobre el medio sólido. Las placas Petri se incubaron dos días a una temperatura entre 20 y 28 °C previamente al conteo de las u.f.c., eligiendo para cada muestra aquella dilución que mostrara un número de colonias entre 1 y 20. Para el cálculo del valor total de u.f.c. se tuvo en cuenta las diluciones realizadas y el peso fresco de las plántulas, representando cada dato final la media y la desviación estándar del logaritmo de u.f.c. por peso fresco de cuatro réplicas independientes en cada caso con cuatro plántulas por réplica.

2.6. Irradiación con luz UV-C.

Para estudiar el efecto de la luz UV-C (254 nm) se irradiaron plántulas de 14 días de edad cultivadas *in vitro* aplicando una dosis de 200 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ mediante una cámara de irradiación con luz UV-C de Amersham Pharmacia Biotech.

2.7. Senescencia.

Para el análisis de la senescencia se realizaron mayoritariamente experimentos de senescencia forzada por oscuridad. Éstos se llevaron a cabo cortando por el peciolo las hojas jóvenes de la roseta de plantas adultas cultivadas en tierra tanto en condiciones de DL como de DC (según el experimento). Las hojas cortadas se colocaron sobre papel Whatman 3 MM humedecido en agua dentro de placas Petri y se mantuvieron en oscuridad durante distinto número de días con el fin de analizar el proceso de senescencia forzada en varios estadios. Por último, en los tiempos posteriores a la incubación indicados, las hojas fueron fotografiadas, utilizadas para analizar el contenido de clorofila a+b, teñidas para determinar la actividad GUS o procesadas para obtener RNA. De manera similar, los experimentos de senescencia forzada por oscuridad en planta entera se realizaron en las líneas transgénicas *KAT2::LUC* (ver apartado 4.2), colocando las plantas en una cámara oscura durante varios días donde se llevaron a cabo los análisis. Por último, para analizar diferencias en los

procesos de senescencia natural en plantas, se cortaron las hojas de roseta de plantas adultas que habían sido cultivadas en tierra en condiciones de DL, situándolas desde la posición 1, hoja más antigua de la roseta, hasta la posición 9, hoja más joven de la roseta, en el momento que las plantas del ecotipo silvestre presentaban unas 4 ó 5 hojas senescentes. Para cada uno de los genotipos se llevó a cabo la medición de la clorofila a+b en cuatro réplicas que incluían tres hojas de la misma posición por réplica, así como el registro mediante fotografía de las hojas analizadas.

3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.

3.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

3.1.1. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis.

Las extracciones de DNA genómico de hojas se llevaron a cabo con el método descrito por Edwards (Edwards et al., 1991) que se basa en la extracción con el tampón TNES (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 % (p/v)), precipitación con isopropanol y finalmente resuspensión del DNA en 50 a 100 µl de agua. El material vegetal se homogeneizó con un politrón Heidolph RZR 2051 Control.

3.1.2. Extracción de RNA de Arabidopsis.

Para la manipulación del RNA se tomaron en todos los casos las precauciones recomendadas por Sambrook y col. (1989). Las extracciones de RNA total a partir de diferentes tejidos de Arabidopsis, generalmente de hojas de roseta, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Logemann y col. (1987), que consiste en la homogeneización del tejido congelado previamente en N₂ líquido en el tampón Z6 (cloruro de guanidinio 8 M, MES 20 mM, EDTA 20 mM pH 7) seguido de una extracción con fenol/cloroformo. Los tampones con agentes caotrópicos como las sales de guanidinio, protegen al RNA de las RNasas endógenas y actúan como potentes desnaturalizantes de proteínas. A continuación se realiza una precipitación ácida (0,7 v de etanol absoluto y 0,05 v de ácido acético 1 M) de la fase acuosa recuperada durante al menos 30 min. y lavados del sedimento con acetato sódico 3 M pH 5,2 y etanol 70 % (v/v), resuspendiendo finalmente el RNA en agua libre de RNasa obtenida mediante tratamiento con dietil pirocarbonato (DEPC) y posterior

autoclavado. En todas las extracciones el material vegetal se homogeneizó con un politron Heidolph RZR 2051 Control. El RNA total aislado mediante este procedimiento se utilizó tanto para los análisis Northern como para realizar retrotranscripción y posterior PCR semicuantitativa o cuantitativa. Por otro lado, para la realización de las hibridaciones con micromatrices de oligonucleótidos donde se requería RNA de alta pureza se utilizó el sistema comercial *Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema consiste en la homogenización del material vegetal en un tampón con isotiocianato de guanidinio y posterior adsorción selectiva del RNA a una membrana con partículas de sílice, siendo eliminadas las impurezas a través de la columna en sucesivos lavados con etanol. Finalmente, el RNA es eluido en agua siendo apto para realizar múltiples análisis moleculares.

3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Para la cuantificación de DNA y RNA se aplicó la ecuación de la Ley de Lambert-Beer que expresa que la concentración de ácidos nucleicos ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) es la absorbancia neta a 260 nm por el coeficiente de extinción molar que en el caso del DNA en solución acuosa es 50 y para el RNA es 40. Además se analizó la calidad de los ácidos nucleicos con la relación A_{260}/A_{280} indicando valores entre 1,7 y 2 un nivel de pureza alto. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron mediante un espectrofotómetro UV/VIS SP8001 (Dinko) en cubetas de cuarzo o mediante el espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies) que permite la medida directa de la concentración de una muestra sin diluir utilizando volúmenes de un microlitro.

3.3. Manipulación de ácidos nucleicos.

3.3.1. Retrotranscripción (RT) del RNA.

En primer lugar, las muestras de RNA se sometieron a un tratamiento con DNAsa utilizando el kit Turbo DNA-free™ (Ambion) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Este kit se basa en el tratamiento con Turbo DNAsa I, versión mejorada de la enzima DNAsa I, que elimina con una altísima eficiencia las contaminaciones de DNA de las muestras de RNA, y posterior eliminación del enzima y otros componentes de las

muestras. La síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó usando la enzima *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (MBI Fermentas) o la *M-MLV Reverse Transcriptase* (USB) y partiendo, según el experimento, de entre 1-3 µg de RNA total purificado. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl añadiendo al RNA 1 µl de oligo(dT)₁₅ 80 µM (Roche), incubando a 70 °C durante 5 min. y enfriando rápidamente en hielo para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA. A continuación, se añadieron los otros componentes de la reacción incluyendo el tampón de la RT 5x (composición según fabricante), los dNTPs a una concentración final de 1 mM y 20 U del inhibidor de RNasa (MBI Fermentas), incubando toda la mezcla de reacción a 37 °C durante 5 min.. Finalmente se añadió la retrotranscriptasa en la cantidad óptima indicada por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en los termocicladores nombrados a continuación durante una hora a 42 °C y se inactivaron durante 10 min. a 70 °C.

3.3.2. Amplificación del DNA mediante PCR.

En las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como molde DNA de diversa naturaleza incluyendo DNA genómico, fragmentos obtenidos por PCR o por digestión, plásmidos recombinantes purificados o cDNA obtenido a partir de RT del RNA. Para llevar a cabo la amplificación del DNA por PCR se añadió la pareja de cebadores correspondientes en cada caso dependiendo del fragmento que se quisiera amplificar. En general, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo tampón de reacción a 1X (composición según fabricante), dNTPs 200 µM (Fermentas), 0,6 µM de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, 1 U de la polimerasa de DNA *Netzyme* (Fermentas) y finalmente 2 µl de DNA molde (~ 200 ng), aunque en muchas de las reacciones realizadas se varió esta cantidad para optimizar la reacción de amplificación. En aquellos casos donde se requería la obtención de fragmentos con alta fidelidad de copia se utilizaron las enzimas *Pwo DNA Polymerase* (Roche) o la *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). Los programas de amplificación estándar constaron de una desnaturalización inicial a 94 °C de 1 min. seguido de 30-35 ciclos de amplificación y finalmente una extensión final de 7 min. a 72 °C. Concretamente cada ciclo estaba constituido por tres etapas, 45 s a 94 °C (desnaturalización), 45 s a la temperatura de hibridación óptima de los cebadores utilizados en cada caso (entre 50 y 64 °C) y por último 1 min./kpb a 72 °C (extensión). Para todos los casos, las reacciones de PCR se realizaron indistintamente en los termocicladores *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer) y

Mastercycler®Personal (Eppendorf®). El diseño de los oligonucleótidos específicos para cada gen se realizó de forma manual teniendo en cuenta los parámetros de longitud (entre 16 y 30 nucleótidos), contenido en GC superior al 40 %, extremos 3' ricos en GC y temperatura de fusión (T^m) similar en cada pareja de cebadores. El cálculo de la T^m teórica se calculó con la fórmula $[4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)]$, siendo la T^m de hibridación utilizada en la reacción de amplificación menor que la T^m estimada. A continuación se muestra una tabla con las parejas de oligonucleótidos utilizados en este trabajo para los análisis de expresión génica, los genes que amplifican y la utilidad de los amplicones generados.

Tabla VIII. Oligonucleótidos específicos utilizados para los análisis de la expresión génica.

Se muestra el nombre del gen, el código AGI, las parejas de oligonucleótidos utilizados como cebadores en cada caso (F, directo; R, reverso) y su secuencia nucleotídica en sentido 5' → 3', el tamaño del amplicón generado y el uso de éste.

GEN	CODIGO AGI	OLIGONUCLEOTIDOS		TAMAÑO (pb)	USO
		NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'		
KAT2	At2g33150	KAT-1F	CCGGA AAAAATGGAGAAAGCGATCGAGA	1419	Sonda radiactiva KAT2e+, PCR semicuantitativa, Generación de pl. transgénicas
		KAT-1R	CGGTTTTGGTGCATGGTCCTCTAGCG		
KAT2	At2g33150	PED1-1F	GAGAGGACCATGCACC	241	Sonda radiactiva KAT2e (ó KAT2)
		PED1-1R	CTAGAAGCAACAACTGATG		
KAT5	At5g48880	PKT2.1F	TGAGGACCCTGAAGCTC	241	Sonda radiactiva KAT5.2
		PKT2.1R	CAGAAGAGAAGGTTTCATG		
KAT1	At1g04710	TIOL1F	CCTGGATCTCAGAGAGC	1048	PCR semicuantitativa
		KAT3-1R	GGCCTTATTGTCATTAGAC		
RAB18	At5g66400	RAB18A	CCCCTGCAGTCCATATCCGAAACCGGACT	498	Sonda radiactiva RAB18
	RAB18D	GGGGAATTCACGTACCGAGCTAGA GCTGG			
ACX1	At4g16760	ACX1-1F	AAAGCAGAGTTTCGACGTTGAGGATATGA	2135	Sonda radiactiva ACX1
		ACX1-1R	TAAAATTCCGCCATATGACGATCGTACA		
NIT2	At3g44300	NIT2.1F	CGGTTTAATGGCGTTGCCTC	679	Sonda radiactiva NIT2
		NIT2.1R	GGTTCGAAGGCAGAACTGGCAAGC		
UBQ10	At4g05320	JH1011	GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGATGGT	483	PCR semicuantitativa, Sonda radiactiva UBIQ10
		JH1012	CGACTTGTCTAGAAAAGAAAGATAACAGG		

3.3.3. Determinación de los niveles de transcrito.

3.3.3.1. Análisis Northern blot y Southern blot.

3.3.3.1.1. Electroforesis de RNA y DNA para transferencia a membrana.

Para los análisis Northern, la separación de los RNAs según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa 2% (p/v) en agua junto con 10 % (v/v) del tampón MEN 10x (MOPS 200 mM, NaAc 50 mM y EDTA 20 mM, pH

7.0) y 16 % (v/v) de formaldehido según se describe en Sambrook y col. (1989). Cada muestra estaba formada por 10 µg de RNA total a una concentración de 1 µg·µl⁻¹ (volumen 10 µl) a las que se le añadía formamida 40 % (v/v), tampón 10x MEN 10 % (v/v), formaldehido 12 % (v/v) y bromuro de etidio (1µg/muestra). El RNA se desnaturizó a 60 °C durante 10 min. antes de la carga en el gel, el cual se mantuvo durante toda la electroforesis sumergido en el tampón 1x MEN. El voltaje empleado para la electroforesis estándar fue de 100 V. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales en cada carril se utilizó como control de carga. Por otra parte, la separación del DNA en función de su tamaño se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa, normalmente al 1% (p/v) en tampón 1x TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 66 mM y EDTA 2 mM pH 8.0) y 8·10⁻⁵ % (p/v) de bromuro de etidio según se indica en Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa se modificó entre 0,8 y 4 % (p/v) dependiendo del tamaño del fragmento esperado y la electroforesis se desarrolló a un voltaje de 100 V. Previamente a la carga en el gel, se les añadió a las muestras el tampón de carga *6x Loading Dye Solution* (MBI Fermentas) a una concentración final de 1x y se emplearon los marcadores de peso molecular *GeneRulerTM DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas) y el *Lambda DNA/HindIII Marker 2* (MBI Fermentas), que permite estimar una cuantificación de los fragmentos del gel por comparación de las intensidades de las bandas correspondientes. Por último, para observar la integridad de los RNAs se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % (p/v) en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,5) y 8·10⁻⁵ % (p/v) de bromuro de etidio.

3.3.3.1.2. Transferencia y fijación de RNA y DNA a membrana.

En los análisis Southern, antes de la transferencia a membrana, se realizó la desnaturización del DNA sumergiendo el gel en un tampón de desnaturización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durante 20 min. en agitación. Tras varios lavados con agua el gel se incubó en un tampón de neutralización (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1 M) durante 20 min. en agitación, y finalmente, se equilibró en SSC 20x (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7). Tanto el RNA como el DNA se transfirieron por capilaridad a membranas de nailon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) sumergidas previamente en SSC 20x siguiendo las indicaciones de Sambrook et al (1989). Las transferencias se realizaron durante una noche y finalmente los ácidos nucleicos se fijaron covalentemente a la membrana mediante entrecruzamiento con luz UV-C (200 mJ·cm⁻²) utilizando una cámara de irradiación UV-C de Amersham Pharmacia Biotech.

3.3.3.1.3. Marcaje de sondas radiactivas.

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas fueron marcados radiactivamente con el kit de marcaje *RediprimeTM II Random Prime Labelling System* (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Este sistema se basa en la reamplificación del DNA molde a partir de cebadores al azar e incorporando en los fragmentos creados dCTPs marcados con ³²P. Las reacciones se llevaron a cabo durante 30 min. utilizando 25 ng de DNA molde desnaturalizado durante 5 min. a 95 °C, 50 µCi de [α -³²P] dCTP (3000 Ci·mmol⁻¹) y finalmente se inactivaron por calor (95 °C, 5 min.). De las diferentes sondas radiactivas empleadas en este trabajo, *KAT2e*, *KAT2e+t*, *KAT5*, *ACX1*, *NIT2* y *UBIQ10* fueron obtenidas mediante RT-PCR a partir de hojas Col (cDNA) y la sonda *RAB18* es un producto de PCR obtenido a partir de DNAg. Los oligonucleótidos específicos utilizados para cada gen se muestran en la tabla VIII. La secuencia nucleotídica de las sondas obtenidas por PCR se comprobó mediante análisis de restricción y secuenciación. De éstas, la sonda *KAT2e* corresponde a un fragmento de 241 pb de la región 3' no codificante del mRNA y la sonda *KAT2e+t* corresponde a la región codificante completa del gen *KAT2*. Los cDNA correspondientes a las sondas *JR2* (1,2 kB) y *WR3* (0,5 kB) (Titarenko et al., 1997) fueron cedidas por el Dr. Juan José Sánchez-Serrano (CNB, Madrid) clonados originariamente en los vectores pUC19 (*NotI/EcoRI*) y pZL1 (*Sall/NotI*). Por último, la sonda *PRI* (0,75 kB) clonada en pBL fue cedida por la Dra. Leslie Friedrich (Corporación Ciba-Geigy, EEUU).

3.3.3.1.4. Prehibridación e hibridación.

Previamente a la incubación con la sonda radiactiva, la membrana se prehibridó durante un tiempo mínimo de 3 horas a 42 °C con la solución de prehibridación (tampón fosfato 0.25 M pH 7.2, SDS 7% (p/v), EDTA 1 mM pH 8.0, PEG 6000 8 % (p/v), DNA desnaturalizado de esperma de salmón 0,02 % (p/v), NaCl 0,25 M y formamida 40% (v/v)). Posteriormente, las sondas marcadas radiactivamente se desnaturalizaron durante 5 min. a 95 °C y se enfriaron rápidamente en hielo previamente a la incorporación de ésta en la solución de prehibridación descrita anteriormente. Las membranas se hibridaron a 42 °C durante una noche en un horno de hibridación Amersham Pharmacia Biotech tanto en cajas como en tubos de hibridación, según el tamaño de las membranas, siendo el volumen de hibridación empleado entre 5 a 50 ml según el caso concreto. Tras la hibridación, las membranas se lavaron con 3x SSC y 0,5% (p/v) de SDS y con temperaturas crecientes de

42 °C a 55 °C y utilizando en el caso de lavados más astringentes, 1x SSC y 0,1% de SDS y temperaturas hasta los 62 °C. Una vez lavadas, las membranas selladas en plástico transparente se colocaron en casetes *Hipercassette*TM (Amersham Biosciences) junto con películas sensibles a rayos X Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). Durante el tiempo de exposición se mantuvieron a -80 °C y finalmente fueron reveladas en una procesadora automática M-35-X-OMAT (Kodak). Para la cuantificación de las señales radiactivas, las membranas se colocaron en casetes junto con la placa lectora Bas-IP, MP 2040S (20x40cm) (Fujifilm) analizándose con los equipos “Bio-imaging analyzer BAS-1500 y FLA 5100” (Fujifilm) y los programas informáticos Image Reader v 1.3, Image Reader FLA-5100 e Image Gauge 4.0 (Fuji). En los análisis Northern, los valores obtenidos se normalizaron posteriormente al contenido endógeno del RNA ribosómico 18S y se expresaron como valores relativos. Por último, para la hibridación de la membrana con otra sonda, se realizaron lavados con agua caliente conteniendo 0,1 % SDS hasta la comprobación de la pérdida de la señal radiactiva en la membrana.

3.3.3.2. PCR semicuantitativa.

Para analizar los niveles de transcrito mediante RT-PCR semicuantitativa se realizaron PCRs con oligonucleótidos específicos para cada gen de interés incluyendo en todos los casos la amplificación del gen endógeno *UBQ10* como control de la reacción (ver tabla VIII), siendo el DNA molde empleado cDNA obtenido a partir de RT de RNA total. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un número de ciclos bajo con el fin de establecer una relación lineal entre la cantidad de producto amplificado y la cantidad de transcrito inicial en la reacción. En este sentido, las PCRs para analizar la cantidad de transcritos *KAT2* y *KAT1* se llevaron a cabo con 20 ciclos de amplificación [(94 °C 40 s; 50 °C 40 s; 72 °C 2 min.)x ciclo], incorporando los oligonucleótidos específicos para el gen *UBQ10* a partir del ciclo 5, siendo por tanto 15 los ciclos realizados para este gen. A continuación, cada PCR se dividió en dos partes que se resolvieron electroforéticamente en un gel de agarosa 1 % (p/v) y se analizaron de forma paralela mediante Southern blot (descrito previamente). Concretamente, una parte fue empleada para la detección de los fragmentos correspondientes a *KAT2* y *KAT1* utilizando la sonda radiactiva *KAT2e+t* y la otra parte se utilizó para detectar los fragmentos correspondientes al transcrito *UBQ10* con la sonda *UBQ10*, descritas ambas en el apartado 3.3.3.1.C y tabla VIII. Los niveles relativos de los transcritos *KAT1* y *KAT2* se cuantificaron como se describe en el apartado

3.3.3.1.4. y se normalizaron según el contenido del gen endógeno *UBQ10* detectado en las mismas muestras.

3.3.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos para cada gen en las reacciones de PCR cuantitativa fueron diseñados a partir de las regiones de cDNA de interés con el programa Primer Express 2.0 utilizando los parámetros por defecto que incluye entre otros, T^m entre 58-60 °C, contenido en GC 30-80 % y amplicones entre 50-150 pb. En la tabla IX se muestra la relación de genes analizados mediante PCR cuantitativa, así como los oligonucleótidos empleados en cada caso. De éstos, la pareja qP-KAT2-2F/ qP-KAT2-2F amplifica una región 3' no codificante del mRNA del gen *KAT2* y la pareja qP-KAT2-F/ qP-KAT2-F amplifica una región localizada dentro de la secuencia codificante del mismo gen. En primer lugar, se realizaron pruebas para cada pareja de cebadores modificando la concentración de éstos (300, 600 ó 900 nM) con el fin de encontrar la combinación más óptima. Al final de cada PCR, se realizó una cinética de T^m (curva de disociación) aplicando un gradiente de temperaturas creciente para analizar la especificidad del producto y la presencia de dímeros de los cebadores. Además, se añadieron en cada experimento los controles pertinentes de contaminación de DNAg y controles negativos de la reacción. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20 µl empleando 10 µl de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de RT y una concentración de 300 ó 900 nM de cada oligonucleótido (según el oligonucleótido). La mezcla de reacción SYBR[®] Green PCR Master Mix incluye el compuesto fluoróforo SYBR[®] Green I que emite fluorescencia cuando se intercala en las moléculas de DNA de doble cadena y permite por tanto cuantificar la cantidad de producto a lo largo de los ciclos de amplificación, el fluoróforo ROX que permite ajustar las posibles variaciones entre las muestras debidas a errores en el pipeteo, tampón de la reacción, dNTPs con dUTP y la enzima AmpliTaq Gold[®] DNA Polimerasa. Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas empleando placas *MicroAmpTM Optical 96-well reaction plate* (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo en los instrumentos *7000 Real-Time PCR System* y *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), termocicladores con cámaras CDD que registran fluorescencia, acoplados a los programas informáticos *7000 System Software* y *7500 System Software* (Applied Biosystems). Se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial para los oligos diseñados

con Primer Express (2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciclos de 15 s 95 °C, 1 min., 60 °C). Los valores de expresión génica se calcularon mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial de la reacción de amplificación (umbral) asociado a un número de ciclos concreto para cada gen (Ct). A partir del parámetro Ct se calcularon para cada experimento los valores de expresión relativa de los genes de interés en las distintas muestras respecto a la muestra control, normalizados con el nivel de expresión obtenido para el gen constitutivo *ACT2/8* en las mismas muestras, según la fórmula:

$$2^{-\left(\frac{\text{Ct gen A} - \text{Ct ACT2/8}}{\text{(muestra problema)}} - \frac{\text{Ct gen A} - \text{Ct ACT2/8}}{\text{(muestra control)}} \right)}$$

Tabla IX. Oligonucleótidos específicos utilizados para PCR cuantitativa.

Se muestra el nombre del gen, el código AGI y las parejas de oligonucleótidos utilizados como cebadores en cada caso (F, directo; R, reverso). Todos los oligonucleótidos fueron diseñados con el programa Primer Express 2.0

GEN	CODIGO AGI	OLIGONUCLEÓTIDOS			
		NOMBRE (F)	SECUENCIA 5'→ 3' (F)	NOMBRE (R)	SECUENCIA 5'→ 3' (R)
<i>KAT2</i>	At2g33150	qKAT2-F	TTGATGAGCTTCGCAACGC	qKAT2-R	TGGACAAAAGACCTTGCGCT
<i>KAT2</i>	At2g33150	qKAT2-2F	TCGAATAAAGCACACAACCAATG	qKAT2-2R	CCCCTTCACTTAAAAAATACTAAACAC
<i>JR2</i>	At4g23600	qJR2-F	TGCGATCCTCATGGCAAAC	qJR2-R	CTCCAGGATCTCATTTCGTGG
<i>PDF1.2a</i>	At5g44420	qPDF1.2a-2F	CACCCATTATCTTCGCTGCTCTT	qPDF1.2a-2R	TTCTGTGCTCCACCATTGC
<i>SAG12</i>	At5g45890	qSAG12-2F	GGAAAACAATCGCTACGTTGTG	qSAG12-2R	TCCGGCAGGAATGCTATTTAA
<i>CAB</i>	At3g54890	qCAB-F	TCAGAAATGGCTGCTCACTGG	qCAB-R	CAAGGTAAGTGGTCGTGGC
<i>PEX1</i>	At5g08470	qPEX1-F	ACCGTCTGGCTTGAGCACC	qPEX1-R	TCGTGCACAGACCAGTCGAC
<i>PEX14</i>	At5g62810	qPEX14-F	TGCTCCTGCTCCACTCATTGT	qPEX14-R	AACCGAGAGAGAAAAGCTGCC
<i>ACT2/8</i>	At3g18780	qACT2-F	TTGTTCCAGCCCTCGTTTGT	qACT2-R	TGCTCGTGGATTCCAGCAG

3.3.4. Manipulación de fragmentos de DNA necesarios para sondas o para generación de construcciones.

3.3.4.1. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa o de productos de PCR.

Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de amplificación por PCR o de restricción de plásmidos recombinantes se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa con bromuro de etidio como se describe en el apartado 3.3.3.1.1. En cada caso, las

bandas correspondientes a los fragmentos de interés visualizadas con iluminación UV fueron recortadas de los geles y el DNA fue purificado utilizando los sistemas comerciales *Qiaex II Gel Extraction Kit* (Qiagen) y *CONCERT™ Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Para aquellos casos donde el DNA amplificado en reacciones de PCR fue directamente purificado se utilizó el sistema comercial *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos sistemas se basan en la disolución de la agarosa (en los dos primeros kits), posterior absorción selectiva del DNA disuelto a partículas de gel de sílice o a una resina en presencia de una alta concentración de sales y la elución posterior del DNA con una solución baja en sales como tampón Tris o agua.

3.3.4.2. Digestiones de fragmentos de DNA o de vectores plasmídicos.

La digestión de fragmentos de DNA o de vectores recombinantes con enzimas de restricción se realizó normalmente en un volumen final de 20 µl, añadiendo el tampón 1x correspondiente en cada caso (composición según fabricante), 2 U del enzima/s de restricción (MBI Fermentas) y una cantidad variable de DNA según los requerimientos concretos. Las digestiones se incubaron en un termobloque *Termomixer compact* (Eppendorf®) durante un tiempo mínimo de 2 horas y máximo de 24 horas a la temperatura óptima para cada enzima y se detuvieron mediante inactivación térmica a 70 °C durante 10 min.. En el caso de digestiones dobles, se utilizaron aquellos tampones compatibles para la actividad de ambas enzimas, siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la obtención de vectores linealizados con extremos romos se empleó la enzima *SmaI* en todos los casos.

3.3.4.3. Generación de extremos romos, fosforilación de fragmentos de DNA y desfosforilación de vectores plasmídicos.

La generación de extremos romos en fragmentos procedentes de la amplificación por PCR o de restricción se llevó a cabo en reacciones con un volumen final de 20µl. En cada reacción se añadió 1 µg de DNA, tampón de la reacción 1x (composición según fabricante), dNTPs 0,1 mM y 1 U del enzima T₄ DNA polimerasa (MBI Fermentas) incubándose la reacción 5 min. a temperatura ambiente y posteriormente 10 min. a 70 °C para detener la reacción mediante la inactivación del enzima. A continuación, se realizó la

fosforilación de los fragmentos romos mediante adición a la mezcla de reacción anterior de tampón de la fosforilación 1x (composición según fabricante), ATP 0,75 mM y 7,5 U de la enzima T₄ polinucleótido quinasa (MBI Fermentas) en un volumen final de 30 µl. La reacciones de fosforilación se incubaron a 37 °C durante 30 min. y se detuvieron mediante inactivación a 70 °C durante 10 min.. Finalmente la precipitación de los fragmentos romos y fosforilados se realizó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico pH 5,2 y resuspendiendo en 10 a 20 µl de tampón TE (Tris 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM) o agua. Por otra parte, para la desfosforilación de los vectores plasmídicos digeridos previamente con enzimas de restricción, se llevaron a cabo reacciones en las que se añadía junto con la cantidad de plásmido requerida, tampón de la reacción 1x (composición según fabricante) y 2 U del enzima fosfatasa alcalina (MBI Fermentas) en un volumen final de 100 µl. Las reacciones se mantuvieron a 37 °C durante 1 hora y se inactivaron mediante la adición de 4 % (v/v) de EDTA 0,5 M. A continuación se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), agitando vigorosamente y seleccionando la fase acuosa. Este paso se repitió dos veces y finalmente se realizó la precipitación del DNA desfosforilado de forma similar a la descrita anteriormente.

3.3.5. Reacciones de ligación entre fragmentos y vectores plasmídicos.

Para llevar a cabo la clonación de los fragmentos de interés en los distintos vectores plasmídicos se llevaron a cabo reacciones de ligación con una relación estequiométrica vector:inserto de entre 1:5 a 1:10 con el fin de optimizar la reacción. Para calcular la relación molar existente (1:1) entre un fragmento y vector concreto se aplicó la ecuación cantidad de inserto (ng) = [cantidad de vector (ng) · tamaño del inserto (kB) / tamaño del vector (Kb)]. Las reacciones de ligación se realizaron normalmente en un volumen final de 20 µl conteniendo la cantidad recomendada de vector linealizado (romo y desfosforilado según el caso concreto) y de fragmento (romo y fosforilado según el caso), tampón de ligación 1 x (composición según fabricante que incluye ATP 0,5 mM), PEG 4000 5 % (v/v) para las ligaciones de extremos romos y 5 U de la T₄ DNA ligasa (MBI Fermentas). Las reacciones se mantuvieron a 22 °C durante una noche inactivándolas posteriormente a 65 °C durante 10 min.. Los productos de las reacciones de ligación se emplearon directamente para la transformación bacteriana.

3.3.6. Manipulación de microorganismos para transformación de los productos de ligación y de vectores plasmídicos.

3.3.6.1. Obtención de células competentes para transformación por choque térmico.

E. coli

Una colonia de *E. coli* DH5 α aislada por triple estría se cultivó en 1 ml de medio LB estéril a 37 °C en agitación (200 r.p.m.) durante una noche. Se utilizó un volumen de 0,5 ml de este cultivo para inocular 200 ml de medio LB estéril en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se incubó a 37 °C en agitación (200 r.p.m.) hasta que el cultivo bacteriano alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-0,6, indicativa del estado de fase exponencial de las bacterias. A continuación, el cultivo, previamente enfriado en hielo durante 10 min., se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 min. a 4 °C manteniendo las condiciones de esterilidad. El sedimento se lavó con 20 ml de CaCl₂ 50 mM estéril y frío, manteniendo esta suspensión durante 3 horas en hielo, y se centrifugó posteriormente durante 10 min. a 5000 r.p.m. a 4 °C. Por último, el sedimento bacteriano se resuspendió en 10 ml de una solución CaCl₂ 50 mM y 15% (v/v) de glicerol estéril y frío, se fraccionó en alícuotas de 200 μ l por tubo Eppendorf® que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido durante 5 min. y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Además, en cada tanda se realizaron las pruebas pertinentes de eficiencia de transformación y de control de posibles contaminaciones que validaban el uso de estas células para transformar.

A. tumefaciens

Una colonia de *A. tumefaciens* C58PMP90 aislada por triple estría se cultivó en 5 ml de medio LB estéril y rifampicina (50 mg·L⁻¹) en un matraz Erlenmeyer de 100 ml a 28 °C en agitación constante (200 r.p.m.) durante una noche. El cultivo resultante se añadió a 200 ml de LB estéril y rifampicina (50 mg·L⁻¹) en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se mantuvo a 28 °C en agitación constante (200 r.p.m.) durante 5-6 horas hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 1. A continuación, el cultivo previamente enfriado en hielo durante 10 min., se centrifugó a 5000 r.p.m. a 4 °C durante 10 min. manteniendo las condiciones de esterilidad. El sedimento bacteriano se resuspendió en 100 ml de tampón TE (Tris 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM) frío y estéril centrifugando nuevamente. Por último, el sedimento se resuspendió en 10 ml de LB estéril y se fraccionó en alícuotas de 500 μ l por tubo Eppendorf® que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido durante 5 min. y se

conservaron a -80 °C hasta su uso. En cada tanda se realizaron las pruebas pertinentes de eficiencia de transformación y de control de posibles contaminaciones que validaban el uso de estas células para transformar.

3.3.6.2. Transformación de células competentes por choque térmico.

E. coli

La transformación de células competentes *E. coli* DH5 α se llevó a cabo mediante choque térmico según se describe en Sambrook y col. (1989). En primer lugar, cada alicuota de células competentes (200 μ l) se descongelaron en hielo durante aproximadamente 20 min., y se les añadió entre 0,1-1 μ g de DNA del plásmido o el producto de ligación de interés en un volumen de 50 μ l incubando la mezcla durante 30 min. en hielo. A continuación, las células se sometieron a choque térmico permaneciendo a 42 °C durante 30 segundos y añadiendo entonces 0,8 ml de medio LB estéril suplementado con 2% (v/v) de glucosa 1 M estéril y 1% (v/v) de Cl₂Mg 1 M estéril, e incubándolo durante 1 hora a 37 °C en agitación (250 r.p.m.). Posteriormente, el sedimento bacteriano procedente del cultivo transformado se sembró en una placa Petri conteniendo medio LB y los antibióticos adecuados según el tipo de plásmido utilizado. Cuando el vector empleado permitió seleccionar las células transformadas por α -complementación, se añadió al medio 0,8 mg por placa del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) (Duchefa) y 0,8 mg por placa del inductor isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

A. tumefaciens

La transformación de células competentes de *Agrobacterium* se llevó a cabo mediante choque térmico según se describe en Sambrook y col. (1989). Para ello, a cada alicuota de células competentes (500 μ l) descongeladas previamente en hielo durante 30 min., se le añadió entre 0,1-1 μ g de DNA del plásmido con la construcción de interés en un volumen entre 50 y 100 μ l. A continuación las células se mantuvieron 5 min. en hielo seguido de 5 min. en N₂ líquido y a continuación se incubaron a 37 °C durante otros 5 min.. Después, y tras añadir 1 ml de medio LB estéril, las células se incubaron a 28 °C durante una hora en agitación constante (200 r.p.m.), sembrándolas finalmente en medio LB estéril suplementado con rifampicina (50 mg·L⁻¹) y con el antibiótico de selección adecuado en cada transformación. Finalmente, las placas se incubaron a 28 °C durante dos días.

3.3.7. Purificación de plásmidos bacterianos.

3.3.7.1. Procedentes de *E.coli* DH5 α .

Las colonias potencialmente transformadas se seleccionaron por resistencia a antibiótico y por ausencia de color (según el vector empleado) en cada transformación bacteriana. Las colonias elegidas, normalmente 10 por transformación, se cultivaron en tubos estériles con 4 ml de medio LB líquido estéril incubándolas a 37 °C en agitación (250 r.p.m.) durante una noche. Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron mediante el procedimiento de lisis alcalina rápida según Sambrook y col. (1989) o mediante los sistemas comerciales *CONCERT™ High Purity Plasmid Purification System* (Life Technologies) y *Rapid Plasmid Miniprep System* (Marligen Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El procedimiento de lisis alcalina consiste en una incubación de 5 min. de los sedimentos bacterianos con 100 μ l del tampón P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa 100 μ g·ml⁻¹), seguido de 200 μ l del tampón de lisis P2 (NaOH 200 mM, SDS 1 % (p/v) agitando por inversión y mantenido en hielo durante 5 min. y consecutiva adición de 150 μ l acetato potásico 3 M pH 5,2 agitando nuevamente. Tras la centrifugación de la mezcla y recuperación de la fase acuosa, se realiza una extracción con cloroformo:isoamílico (24:1) y se precipita el DNA plasmídico de la fase acuosa por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa recuperada. Posteriormente, el precipitado se lava con etanol 70 % (v/v) y se resuspende en 20 μ l del tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) o agua. Por otra parte, los sistemas comerciales utilizados se basan en un procedimiento de lisis alcalino modificado seguido de la unión del DNA plasmídico a una resina de exclusión aniónica bajo unas condiciones salinas y de pH apropiadas que eliminan el RNA, proteínas y otras impurezas de bajo peso molecular en los sucesivos lavados realizados, siendo finalmente el DNA plasmídico recuperado en un tampón TE o agua. Para las preparaciones de plásmidos a media escala se partió de un volumen de cultivo bacteriano de 100 ml y se utilizó el sistema de Midiprep de Qiagen, basado en los mismos principios que los descritos anteriormente.

3.3.7.2. Procedentes de *A. tumefaciens*.

Por cada transformación de *A. tumefaciens* se seleccionaron 5 colonias resistentes a los antibióticos de selección en cada caso (ver apartado 1.2.2.). Las colonias se cultivaron en tubos Falcon™ de 50 ml con 5 ml de medio LB estéril suplementado con los antibióticos adecuados y se incubaron a 28 °C en agitación constante (200 r.p.m.) durante una noche. El aislamiento de DNA plasmídico de dichos cultivos se llevó a cabo manteniendo los

sedimentos bacterianos durante 10 min. en 100 μ l del tampón 1 frío (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0, sacarosa 20% (p/v), 4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de lisozima), seguido de la adición de 200 μ l del tampón de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1 % (p/v)) agitando por inversión y manteniendo la mezcla durante otros 10 min. en hielo. A continuación, se añadieron 150 μ l de acetato sódico 3 M pH 5,2, agitando nuevamente e incubando la mezcla 30 min. en hielo. Transcurrido ese tiempo y centrifugada la mezcla, se recuperó el sobrenadante y se le añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) agitándolo vigorosamente. Tras repetir la extracción fenólica dos veces más, se llevó a cabo la precipitación del DNA plasmídico de la fase acuosa con la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 manteniendo la mezcla a -20 °C durante 30 min.. Finalmente se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v) y se resuspendió en 20 μ l de agua. Debido a la suciedad existente en las preparaciones de plásmidos de *Agrobacterium*, las transformaciones se comprobaron por retransformación en *E. coli* analizando la presencia del plásmido de interés en las colonias retransformadas.

3.4. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

3.4.1. Transformación genética de plantas de *A. thaliana*.

Las transformaciones estables de plantas de *Arabidopsis* con las construcciones genéticas de interés se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de transformación por infiltración a vacío de las inflorescencias descrito por Bechtold y Pelletier (1998). Para ello, 0,5 ml de los cultivos de *A. tumefaciens* transformados previamente con los plásmido binarios recombinantes de interés se utilizaron para inocular 200 ml de LB estéril en un matraz Erlenmeyer de 1 L con los antibióticos requeridos según el caso concreto (ver apartado 1.2.2.) y se mantuvo a 28 °C en agitación constante (200 r.p.m.) hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0,8 a 1,2. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 min. a 4 °C y se resuspendieron en 200 ml del medio de infiltración (medio MS 2,2 $\text{gr}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa 5% (p/v), el surfactante Tween-20 al 0,005 % (v/v) y BAP 10^{-5} $\text{gr}\cdot\text{L}^{-1}$). Para cada transformación, se sembraron en tierra semillas de los ecotipos silvestres Col y Col-0 (según el caso concreto) en macetas de 12 cm de diámetro en condiciones de DL y se cultivaron hasta que los tallos alcanzaron aproximadamente 10 cm de altura y presentaban abundantes yemas florales. En ese estado, las plantas se

transformaron por inmersión en la solución descrita anteriormente manteniendo las yemas florales totalmente sumergidas durante 15 min. aplicando vacío. A continuación las plantas se mantuvieron en condiciones de humedad cercanas al 100 % durante 24-48 horas cultivándolas en las mismas condiciones que antes de la transformación hasta la recolección de las semillas.

3.4.2. Selección y análisis genético de los transformantes.

Las semillas obtenidas de las plantas infiltradas con *Agrobacterium* (T1) se sembraron en alta densidad en placas Petri de 15 cm conteniendo medio MS y el antibiótico de selección en planta según la resistencia incorporada. Se seleccionaron aquellas plántulas resistentes al antibiótico a los diez días y se transfirieron a tierra para su cultivo hasta la obtención de semillas por autofecundación. Cada planta (ó línea) dentro de un mismo evento de transformación se denominó con números correlativos (1, 2, 3, etc.). Aproximadamente 100 semillas T2 procedentes de cada planta individual T1 se sembraron nuevamente en medio MS suplementado con el antibiótico de selección. En esta generación se seleccionaron aquellas líneas transgénicas que segregasen dando porcentajes de resistencia al antibiótico próximos a 3:1 (resistentes:susceptibles) indicativo de líneas con una única inserción de la construcción o transgén según las leyes mendelianas de la herencia para un único gen dominante (como es la resistencia a antibiótico). A continuación, se transfirieron a tierra para su cultivo 10 plántulas T2 de cada una de las líneas independientes seleccionadas por la segregación 3:1 hasta la obtención de semillas por autofecundación. En la generación T3, las semillas procedentes de cada planta T2 seleccionada se denominaron con el número según línea de procedencia más una letra (por ejemplo 2A, 2B, 3A, 3B, 3C, etc.) y se sembraron nuevamente en placas con MS más antibiótico, seleccionando aquellas líneas transgénicas que presentasen un porcentaje de resistencia al antibiótico de 100 %, indicativo de líneas que presentan una única inserción del transgén en homocigosis. En este momento, las diferentes líneas T3 homocigotas e independientes fueron sometidas a análisis moleculares para seleccionar de entre todas, aquellas dos o tres líneas independientes con las cuales llevar a cabo los estudios de interés. Esta selección se comenta a continuación para cada caso concreto.

4. Plantas transgénicas generadas para el análisis de la función del gen *KAT2*.

4.1. Plantas con niveles reducidos y aumentados de transcrito *KAT2*.

Las plantas transgénicas con pérdida o ganancia de función son útiles para analizar la función de un gen. En este caso se pretendía estudiar la función del gen *KAT2* y para ello, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban de forma constitutiva la secuencia codificante del gen *KAT2* en orientación antisentido y sentido.

4.1.1. Generación y transformación de las construcciones.

La secuencia de la región codificante completa del gen *KAT2* se obtuvo mediante retrotranscripción de RNA total de hojas Col seguido de PCR usando los oligonucleótidos KAT-1F y KAT-1R (ver tabla VIII) y ciclos de amplificación formados por 94 °C 30 s; 52 °C 30 s y 72 °C 2 min. (figura 47.A). La secuencia obtenida de 1419 pb fue comprobada por análisis de restricción y secuenciación. Para su transformación en planta, el cDNA de *KAT2* subclonado previamente en el vector pUC19, fue digerido con *Sma*I y se fosforilaron los extremos del fragmento para su posterior clonaje en el vector binario BinA7 linealizado mediante corte con *Sma*I. El cDNA de *KAT2* clonado en BinA7 está bajo el control de la secuencia promotora 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al, 1995) y el terminador en 3' de la octopina sintasa que incluye el vector (Hofgen y Willmitzer, 1990) (figura 1.B). Las colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido BinA7 recombinante fueron seleccionadas por la resistencia a kanamicina que incorpora el plásmido. En las preparaciones de plásmidos obtenidas de diferentes colonias se comprobó mediante análisis de restricción empleando la enzima *Hind*III la orientación del fragmento clonado (figura 47.B). Finalmente, los dos clones seleccionados tanto en orientación sentido como antisentido se emplearon para transformar *A. tumefaciens* y posterior transformación en plantas Col.

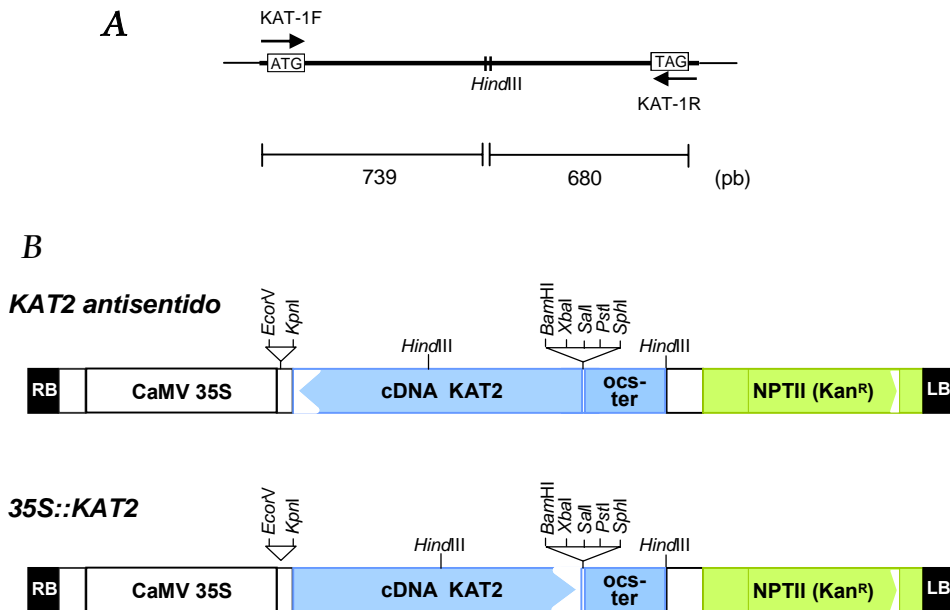


Figura 47. Esquema de la generación de plantas transgénicas con la región codificante completa del gen *KAT2* expresada en orientación antisentido (*KAT2as*) y sentido (*35S::KAT2*).

A. La región codificante completa del gen *KAT2* fue amplificada con los oligos KAT1-F/KAT1R. Se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción. **B.** La región amplificada subclonada en el vector pUC19 se clonó en el vector binario BinA7 en el sitio *Sma*I. La orientación del fragmento se determinó mediante restricción con *Hind*III. Se muestran las construcciones genéticas insertadas en las plantas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2*.

4.1.2. Análisis genéticos de las líneas transgénicas generadas.

Para la selección de las líneas transgénicas *KAT2as* y *35S::KAT2* se siguió el proceso descrito en el apartado 3.4.2. En primer lugar, se obtuvieron 61 y 65 plantas T1 resistentes a kanamicina para las transformaciones realizadas con las construcciones antisentido y sentido respectivamente. El análisis de la resistencia a kanamicina en la generación T2 permitió seleccionar 21 y 23 líneas transgénicas independientes con una segregación 3:1 (resistentes:susceptibles) para cada construcción. De cada una de estas líneas transgénicas se analizó la descendencia de 10 plantas (generación T3), encontrándose líneas T3 con un 100 % de resistencia a kanamicina, indicativo de líneas transgénicas homocigotas con una única inserción del transgén. Los análisis de expresión tanto en

situación basal como en herida en las líneas T3 homocigotas permitió seleccionar mediante la detección y cuantificación de los niveles de transcrito endógeno *KAT2* y del transgén, cuales de ellas presentaban un mayor efecto antisentido (en el caso de las plantas transgénicas *KAT2as*) o una mayor sobreexpresión del transgén *KAT2* en sentido (en plantas *35S::KAT2*). Para ello, se realizaron análisis Northern blot empleando las sondas radiactivas *KAT2e+t* y *KAT2e* (descritas en el apartado 3.3.3.1.3. y tablaVIII) que permiten discriminar entre el transgén y el transcrito endógeno de *KAT2*, respectivamente. Basándose en la reducción de los niveles de expresión de *KAT2* se seleccionaron 3 líneas independientes, la 16C (ó 16H) y 12G que presentaban más del 90 % de reducción del contenido endógeno de *KAT2* tanto en condiciones basales como inducidas por la herida, y la línea 38D, con valores de reducción próximos al 80 %. Además, estas líneas expresaban altos niveles del transgén que correlacionaban con la reducción de la expresión endógena de *KAT2*. Para las líneas transgénicas *35S::KAT2*, la mayoría de las líneas generadas presentaban un alto grado de expresión del transgén *KAT2*, y finalmente se seleccionaron las líneas 21A, 36B y 49I.

4.2. Plantas con la región promotora del gen *KAT2* fusionada a genes delatores.

Se obtuvieron plantas transgénicas en las que el promotor del gen *KAT2* estaba fusionado a los genes delatores β -glucuronidasa o luciferasa con el fin de analizar más detalladamente la regulación transcripcional del gen *KAT2* y en especial su patrón de expresión espacial.

4.2.1. Generación y transformación de las construcciones.

Una región de 2,5 kB de la región promotora del gen *KAT2* obtenida mediante PCR a partir de DNAG de *Arabidopsis Col-0* con los oligonucleótidos PPED1-4F y PPED1-1R (figura 48.A) y los ciclos de amplificación 94 °C 45 s; 58 °C 45 s y 72 °C 3 min., se clonó en el vector pBL SK+ y se digirió posteriormente con *BamHI* (figura 48.B). El fragmento de 2,2 kB generado con extremos *BamHI* fue utilizado para fusionarlo a los vectores pBI101 (Clontech) (Jefferson et al, 1987) cedido por el Dr. Luis Cañas (IBMCP, Valencia) y pZPXOmegaL+ cedido por el Dr. Steve Kay, (The Scripps Research Institute, La Jolla, California) mediante clonaje en *BamHI*, situado en el sitio de clonaje múltiple de

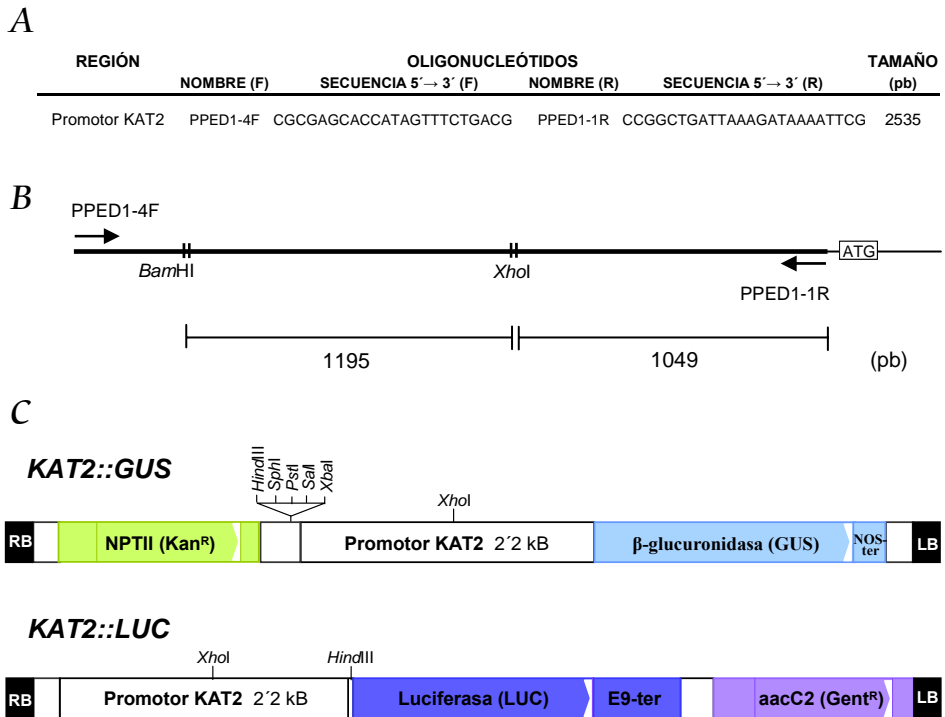


Figura 48. Esquema de la generación de plantas transgénicas con la región promotora del gen *KAT2* fusionada a los genes delatores β -glucuronidasa (*GUS*) y luciferasa (*LUC*).

A. Oligonucleótidos específicos empleados. **B.** Región del promotor del gen *KAT2* de 2,5 kB amplificada con los oligos PPED1-4F/PPED1-1R. La digestión con *Bam*HI de la región amplificada subclonada en el vector pBL SK+ dio lugar a un fragmento de 2,2 kB empleado en la generación de las construcciones (región 3'). La orientación del fragmento en orientación sentido se realizó mediante corte con el enzima de restricción *Xho*I. Se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción. **C.** Construcciones genéticas insertadas en las plantas transgénicas *KAT2::GUS* y *KAT2::LUC*.

estos vectores. El plásmido pBI101 contiene la secuencia codificante del gen β -glucuronidasa y pPZPXomegaL+ contiene una versión modificada del gen luciferasa que aumenta su expresión (Sherf y Wood, 1994). Las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pBI101 y pPZPXomegaL+ recombinantes fueron seleccionadas por la resistencia a kanamicina y espectinomomicina respectivamente, y a continuación se comprobó en las preparaciones de plásmidos obtenidas de diferentes colonias la orientación del

fragmento clonado mediante análisis de restricción empleando la enzima *XhoI* (figura 48.C). Se seleccionaron aquellos clones con la región promotora del gen *KAT2* en orientación sentido transformando *A. tumefaciens* con tales construcciones y, finalmente, se realizó la transformación en plantas Col-0.

4.2.2. Análisis genéticos de las líneas transgénicas generadas.

Para la selección de las líneas transgénicas *KAT2::GUS* y *KAT2::LUC* se siguió el proceso descrito en el apartado 3.4.2. Se obtuvieron 20 plantas T1 resistentes a kanamicina (construcciones con *GUS*) y a gentamicina (construcciones con *LUC*) para las transformaciones realizadas. En la generación T2 se seleccionaron 6 y 11 líneas transgénicas con una segregación 3:1 (resistentes:susceptibles) para cada construcción, respectivamente. De cada una de estas líneas transgénicas se analizó la descendencia de 10 plantas (generación T3), y para cada una de las transformaciones, se encontraron varias líneas T3 homocigotas (100 % resistencia a kan.). De éstas, se seleccionaron dos líneas T3 homocigotas independientes para cada construcción con las que se realizaron los experimentos de interés en cada caso.

4.2.3. Determinación de la actividad de los genes delatores.

4.2.3.1. Detección de la actividad β -glucuronidasa mediante tinción histoquímica.

Para la detección *in situ* de la actividad β -glucuronidasa se siguió el protocolo descrito por Weigel y Glazebrook (2002). La actividad GUS puede ser determinada cualitativamente con tinción histoquímica mediante el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc) indicando las zonas teñidas de azul los dominios físicos de la expresión de *KAT2* en los órganos analizados. Las muestras de plantas *KAT2::GUS* se recogieron en acetona fría 90 % (v/v) y se realizaron varios lavados con el tampón de tinción frío (tampón fosfato 50 mM pH 7,2, Triton X-100 0,2 % (v/v), ferrocianuro potásico 2 mM y ferricianuro potásico 2 mM). Posteriormente, las muestras fueron infiltradas al vacío durante 20 min. con la solución anterior suplementada con X-gluc 2 mM y se incubaron a 37 °C durante una noche. El ferrocianuro y ferricianuro tamponan el estado redox del tampón de tinción y el producto derivado de X-gluc precipita en el lugar donde se localiza la proteína GUS, indicando por tanto la localización espacial y

temporal del gen cuyo promotor controla la expresión de *GUS* en la planta. El tampón de tinción fue eliminado por series de etanol al 20 % (v/v), 35 % (v/v) y 50 % (v/v) a temperatura ambiente durante 30 min. cada serie, y a continuación, se fijaron las muestras con una solución de fijación conteniendo 50 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ácido acético y 5 % (v/v) formaldehído durante 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras teñidas se lavaron minuciosamente con etanol 70% (v/v) con agitación constante. Dependiendo del tipo de órgano analizado, la tinción histoquímica fue registrada mediante un escáner de alta resolución HP, un microscopio estereoscópico SMZ800 (Nikon) acoplado a una cámara digital Color View 12 (SIS) con el programa informático Analysis (SIS), o con un microscopio SZ60 (Olympus) acoplado a una cámara digital DXM 12000F (Nikon) y al programa ACT-1 (Nikon). Para obtener un mayor contraste de las tinciones histoquímicas analizadas con microscopía óptica, algunas de las muestras fueron tratadas con una mezcla hidrato de cloral/glicerol/agua (8:1:2) (p/v/v) durante 2 horas previamente a la colocación en los portaobjetos.

4.2.3.2. Detección de la actividad luciferasa mediante bioluminiscencia.

La actividad LUC puede ser determinada cualitativamente en las plantas *KAT2::LUC* por bioluminiscencia mediante el sustrato luciferina, siendo la cantidad de luz producida en la reacción proporcional a la cantidad de enzima luciferasa activa y por tanto a la actividad transcripcional del gen *KAT2*. Las plantas fueron pulverizadas con una solución 0,1 mM de luciferina entre 4 a 12 horas previamente al tratamiento de interés e incubadas en oscuridad. La luminiscencia emitida fue registrada con una cámara digital de baja luminosidad Hamamatsu C2400 acoplada a los programas informáticos Argus-20 y Wasabi (Hamamatsu). La intensidad de la luminiscencia emitida por las plantas fue registrada siguiendo un código de color siendo el azul el nivel más bajo de luminiscencia y el rojo el nivel mayor.

5. Obtención de la planta transgénica mutante *coi1-InahG*.

Para la obtención de la planta transgénica mutante *coi1-InahG* se realizaron cruces entre las flores de las plantas androestériles *coi1-1* y el polen de plantas transgénicas homocigotas nahG. En la población segregante F2, la proporción de plantas *coi1-InahG* esperable es de 3/16 según las leyes mendelianas de la herencia en el caso de dos genes no ligados, (uno dominante y otro recesivo). Las semillas se germinaron en un medio MS

suplementado con kanamicina 50 mg·L⁻¹ y JA 20 μM ya que únicamente las plantas transgénicas mutantes *coi1-InahG* presentan resistencia al antibiótico y un crecimiento normal de la raíz en presencia de JA.

6. Obtención del mutante de inserción de T-DNA *pex14*.

La línea transgénica SALK_007441 (fondo genético Col-0) presenta una inserción de T-DNA en el primer exón del locus At5g62810 (*PEX14*) y fue seleccionada de la colección del Arabidopsis Stock Centre (SALK Institute Genomic Analysis Laboratory; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Las plantas fueron genotipadas mediante PCR (ciclos de 94 °C 45 s; 58 °C 45 s 72 °C 1,5 min) teniendo en cuenta la posición y orientación del transgén, tal como se indica en la figura 44.A. Se emplearon oligonucleótidos específicos del gen *PEX14* (LP y RP) y el oligonucleótido JMLBb1 localizado en el borde izquierdo del T-DNA (figura 3.A-B). Se seleccionaron las plantas que únicamente amplificaban la región LP/JMLBb1 y no la región LP/RP, indicativo de plantas homocigotas para la inserción. Estas plantas se caracterizaron como mutantes nulos mediante RT-PCR cuantitativa utilizando los oligonucleótidos qPEX14-F y qPEX14-R (ver tabla IX).

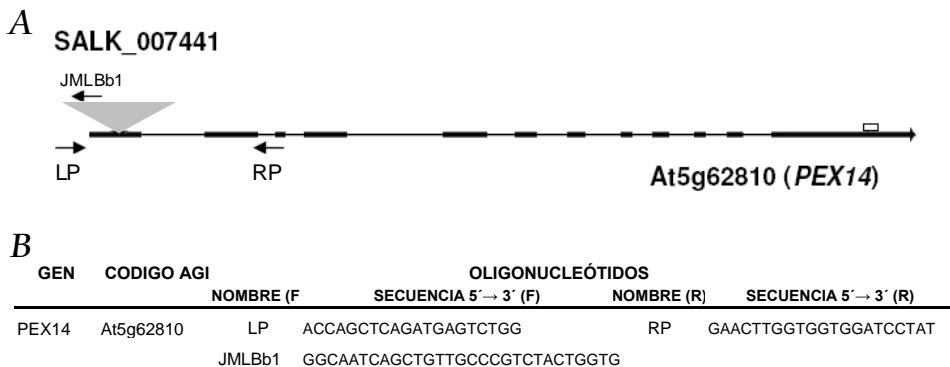


Figura 44. Localización de la inserción del T-DNA en el gen *PEX14* en la línea SALK_007441. A. La inserción de T-DNA se localiza en el primer exón del gen. Se indican los oligonucleótidos empleados para la selección de plantas homocigotas mediante genotipado por PCR. B. Oligonucleótidos específicos empleados.

7. Análisis transcriptómicos mediante micromatrices de oligonucleótidos.

En este trabajo se han llevado a cabo dos análisis transcriptómicos independientes. En primer lugar se analizó el transcriptoma de hojas control y hojas heridas de plantas Col y de la línea transgénica *KAT2as* 16C. En el segundo análisis transcriptómico se compararon plántulas control y tratadas con CFB, y el procesamiento de las muestras e hibridaciones fue realizado por el Servicio de Transcriptómica de la Unidad de Genómica del CNB, Madrid (<http://www.cnb.uam.es/~genomica/>). En ambos análisis, las muestras procedían de tres réplicas biológicas independientes. A continuación se detallan los pasos seguidos en ambos análisis.

7.1. Amplificación de RNA y marcaje.

La amplificación de RNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total de cada muestra empleando el kit MessageAmp aRNA (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido y purificado el cDNA la transcripción *in vitro* se llevó a cabo con la RNA-polimerasa T7, añadiendo a la mezcla aminoaril UTP (Ambion), que presenta el nucleótido UTP marcado con un grupo aminoarilo para la unión posterior de los fluoróforos. Posteriormente los RNAs se incubaron en 1 M Na₂CO₃ con 8 nmol de la sonda NHS ester (Cy3/Cy5) RPN 5661 (Amersham Biosciences) durante 1 h en oscuridad, añadiendo a continuación 0,1 M de sodio acetato sódico pH 5,2 durante 5 min.. La sonda marcada con Cy se purificó con el kit Megaclear (Ambion) y finalmente se cuantificó.

7.2. Hibridación de las micromatrices.

Se realizaron tres hibridaciones independientes para cada análisis. Las micromatrices empleadas en ambos experimentos estaban compuestas por oligonucleótidos de 70mer de la colección Operon Arabidopsis Genome Oligo Set Version 1.0 (Qiagen) los cuales contienen 26,101 elementos que representan 23,668 loci no redundantes del genoma de Arabidopsis. Las micromatrices fueron rehidratadas, fijadas con UV (según indican en <http://ag.arizona.edu/microarray/methods.html>), lavadas con 0,1 % SDS y etanol y secadas finalmente antes de la prehibridación. La prehibridación se realizó con SSC 6X, 0,5 % SDS (p/v) y BSA 1 % (p/v) a 42 °C durante 1 hora. Para llevar a cabo la hibridación, las

micromatrices se lavaron con agua miliQ y se secaron y se incubaron con cantidades equivalentes de cada RNA marcado tanto con Cy3 o Cy5 (200-300 pmoles). Los RNA control y tratamiento (CFB o herida según el caso) se marcaron en cada comparación con los fluoroforos Cy3 (verde) y Cy5 (rojo). A la mezcla de hibridación se le añadió tampón de fragmentación (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la hibridación se realizó durante 16 horas a 37 °C con una mezcla de hibridación conteniendo formamida al 50 % (v/v), SSC 6X, solución Denhardt's 5 X y 0,5 % (p/v) SDS. Las micromatrices se lavaron con SSC 0,5X y SDS 0,1 % (p/v) a 37 °C y, posteriormente a temperatura ambiente con SSC 0,1X. La lectura de las micromatrices para los canales Cy3 y Cy5 se realizó con el programa GenePix 4000B (Axon Instruments, http://www.axon.com/GN_GenePixSoftware.html) y la cuantificación de los puntos fluorescentes fue realizado con el programa Gene PixPro5.1 (Axon Molecular Devices, http://www.axon.com/GN_GenePixSoftware.html) (experimento de herida). En todos los casos, los datos se normalizaron empleando el método Lowess previamente a la transformación logarítmica.

7.3. Análisis de los datos

Experimento de Herida

Los datos se analizaron utilizando el programa Acuity 4.0 (Axon Instruments) seleccionando aquellos genes con un valor de señal superior a 200. Teniendo en cuenta los análisis estadísticos de los datos se eliminó una de las comparaciones ya que presentaba mayor varianza con respecto a las otras. Finalmente se seleccionaron los genes con un p-valor inferior a 0,05 y valores absolutos de cambio de expresión de 1,3 veces.

Experimento de CFB

Tras la normalización de los datos se realizó el tratamiento estadístico con el paquete de programas LIMMA (*Linear Models for Microarray Data.*). Los p-valores obtenidos entre las réplicas fueron corregidos usando el método descrito previamente por (Benjamani y Hochberg (1995) y Berrocal-Lobo y Molina (2004) y se seleccionaron aquellos genes con un valor de FDR (p-valor corregido) inferior a 0,05 y un cambio absoluto de expresión de 1,6 veces. Las categorías biológicas correspondientes a ontologías génicas diferencialmente expresadas se analizaron mediante la herramienta FatiGO+ de la web Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cifp.es/fatigoplus/cgi-bin/fatigoplus.cgi>); Al-

Shahrour et al. 2004; 2007). El análisis de los valores de expresión para los genes de interés se obtuvieron de la web Arabidopsis eFP Browser de la base de datos BAR que contiene múltiples datos transcriptómicos (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

8. Análisis de proteínas.

8.1. Extracción de proteínas.

Las proteínas procedentes de plántulas congeladas en N₂ líquido fueron extraídas con el tampón TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150mM) con 1% (v/v) de mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Los extractos de proteínas fueron cuantificados siguiendo el método descrito por Bradford (1976).

8.2. Western blot.

8.2.1. Electroforesis de proteínas.

Las muestras (10 µg) de proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10 % de acrilamida. Las condiciones de electroforesis fueron 15 min. a 10 mA por gel y luego a 20 mA por gel hasta que el frente alcanzó el final del gel. Los geles se tiñeron con Coomassie empleando el kit de tinción *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma-Aldrich) para visualizar el patrón de las proteínas o, alternativamente, se transfirieron a membrana como se describe a continuación.

8.2.2. Transferencia de proteínas a membrana.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v)) a 100 V durante 90 min. a 4 °C. La membrana se lavó brevemente con agua y se tiñó con Ponceau-S para verificar la transferencia y como control de carga de las muestras.

8.2.3. Hibridación con anticuerpos.

La membrana se bloqueó con 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo en tampón de incubación TBS-T (TBS con un 0,1 % (v/v) de Tween-20) durante al menos 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con el tampón TBS-T y finalmente se incubó toda la noche en una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo obtenido contra la proteína GFP-Ct (Sigma-Aldrich) que reacciona también con YFP. Tras lavar tres veces la membrana con tampón TBS-T, se incubó con una dilución 1:10000 de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidada (GE Healthcare). Tras tres nuevos lavados con el tampón TBS-T se procedió a la detección mediante el sistema ECL como se describe a continuación.

8.2.4. Detección.

La proteína YFP-MFP2 se detectó mediante el kit *Western blot ECL* (GE Healthcare) tal y como recomiendan los fabricantes. La proteína se visualizó exponiendo una película fotográfica *Fuji SuperRx* (Fujifilm) y revelada mediante una procesadora automática M-35-X-OMAT (Kodak).

9. Tiempo de floración y plastocrono.

El tiempo de floración se calculó mediante el recuento del número total de hojas de roseta producidas hasta la aparición del botón floral más las hojas caulinares, parámetro que en *Arabidopsis* se ha demostrado que es proporcional al tiempo de floración (Koorneef et al., 1991). El plastocrono, tiempo requerido para la formación de una nueva hoja, se calculó mediante el recuento del número de hojas de roseta durante un periodo de tiempo en el que las plantas permanecían en estado vegetativo. La inversa de la pendiente de la relación entre número de hojas y días establece un parámetro que mide el tiempo de formación de las hojas o plastocrono y permite realizar comparaciones entre distintos genotipos.

10. Cuantificación de los niveles de JA mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para la determinación de los niveles de JA se recogieron muestras de hoja de aproximadamente 0.5 -1 gr congelándolas en N₂ líquido y almacenándolas a -80 °C hasta su posterior análisis. Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Jean-Pierre Métraux (Universidad de Friburgo, Suiza) siguiendo para la extracción del JA de las hojas el protocolo descrito por Gundlach y col. (1992) con ligeras modificaciones. La cuantificación del JA se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas según describe Heck y col. (2003), empleando los picos de 9,10-dihidro-jasmonato como referencias para calcular la recuperación.

11. Cuantificación de clorofilas a+b mediante espectrofotometría.

Para cuantificar el contenido de clorofila a+b de hojas de roseta se siguió un protocolo modificado del descrito por Arnon (1949). Cada muestra contenía aproximadamente 100-150 mg de hojas y se mantuvieron en oscuridad a - 80 °C hasta la extracción. Las muestras con un peso conocido (P) se trituraron en 0,4 ml de acetona 80 % (v/v) y se mantuvieron 2 horas en oscuridad a 4 °C y en agitación constante, ya que la acetona desnaturaliza las proteínas de membrana y solubiliza los pigmentos liberados. A continuación se centrifugaron las muestras y se recuperó el sobrenadante (V₁). Aliquotas de 0,2 ml de los sobrenadantes se diluyeron con acetona 80 % (v/v) en un volumen variable (V₂) hasta que la medida de la A₆₄₅ y A₆₆₃ estuviera en el rango 0,2-0,8. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS SP8001 (Dinko). La concentración de clorofilas a y b (µg·ml⁻¹) se calculó como C_a=12,7·A₆₆₃-2,69·A₆₄₅ y C_b=22,9·A₆₄₅-4,68·A₆₆₃ (Arnon, 1949) Finalmente, en las condiciones expresadas anteriormente (C_a, C_b en µg·ml⁻¹; P en gr. y V en ml), la cantidad total de clorofilas (µg·g⁻¹ peso fresco) se calculó como: C_a+C_b · [V₁·(V₂+0,2) / (0,2·P)].

12. Técnicas utilizadas para el estudio de los peroxisomas en Arabidopsis.

12.1. Microscopía Confocal en plantas transgénicas *MFP2::YFP-MFP2*.

12.1.1. Descripción y origen de las plantas utilizadas.

Las plantas *MFP2::YFP-MFP2* procedentes de la colección *Fluorescent Tagging of Full-Length Proteins* (FTFLP) (<http://gfp.stanford.edu/>; Tian et al., 2004) fueron cedidas por el Dr. Vitaly Citovsky (Universidad de Nueva York, EEUU). Estas plantas transgénicas expresan de forma completa la proteína MFP2, que participa en β -oxidación y se localiza dentro de los peroxisomas, fusionada internamente a la proteína fluorescente YFP bajo la regulación de la propia secuencia promotora del gen *MFP2*, lo que determina que los patrones de expresión y la localización subcelular de la proteína YFP-MFP2 en planta, es decir, *in vivo*, sean los mismos que los de la proteína MFP2 endógena (Tian et al., 2004). A partir de las semillas T2 recibidas (*pBIN-YFP-MFP2*) que presentaron una segregación en kanamicina próxima a 3:1 (resistentes:susceptibles) se obtuvieron algunas plantas T3 con un 100 % de resistencia al antibiótico, las cuales fueron seleccionadas para los análisis posteriores.

12.1.2. Análisis cualitativo del número de peroxisomas.

Las muestras de hoja se colocaron directamente en un portaobjetos con una gota del medio de montaje Mowiol. Las señales fluorescentes emitidas por las proteínas YFP-MFP2 fueron visualizadas con un microscopio confocal TCS SL (Leica) acoplado al programa Leica, lo que permite observar cambios cualitativos en la cantidad de señales (peroxisomas) entre dos imágenes obtenidas con los mismos parámetros. La proteína YFP se excitó con un láser Argón a 488 nm y las emisiones fueron recogidas después de pasar a través de un filtro DD488/543 en un rango espectral desde 519 nm a 543 nm para YFP y desde 620 nm a 671 nm para la clorofila. Para cada imagen obtenida por microscopía confocal se realizaron medidas de la fluorescencia relativa utilizando el programa Adobe PhotoShop CS.

12.2. Marcaje de peroxisomas con 3, 3'-diaminobenzidina (DAB).

En esta técnica la DAB es oxidada por acción de la catalasa en presencia de H₂O₂ dando lugar a DAB oxidado (Fahimi, 1968; 1969; Novikoff y Goldfischer, 1969) que, por la fijación con OsO₄, produce un precipitado negro visible mediante microscopía óptica e indica la posición de los peroxisomas en las células.

12.2.1. Citoquímica con DAB.

El método usado es similar al descrito por Palma y col. (1991) para plantas de guisantes pero con algunas modificaciones. Se cortaron con bisturí trozos de hojas de roseta de 1 mm² y se infiltraron a vacío con glutaraldehído 0,5 % (v/v) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 6,8 durante 15 min, incubándolos a continuación durante 3 horas en agitación suave a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min. con el tampón fosfato potásico 50 mM pH 6,8, las muestras de hojas se infiltraron a vacío y en oscuridad durante 10 min. con una solución que contenía DAB (2 mg·ml⁻¹) (Sigma-Aldrich) en tampón Tris-HCl pH 9. Seguidamente, se incubaron a 37 °C durante 1,5 horas en oscuridad y agitación y durante 3 horas más en la solución con DAB anterior suplementada con H₂O₂ 0,02 % (v/v) (Merck). El control de la tinción con DAB fue realizado incluyendo en algunas muestras el inhibidor de la catalasa 3-amino-1,2,4-triazol (AT) (Sigma-Aldrich) a una concentración 50 mM en la solución de tinción anterior descrita. Después de la tinción, las muestras de hojas se lavaron con tampón fosfato potásico 50 mM pH 6,8 durante 30 min. y se incubaron durante 1 hora en 1 % OsO₄ (p/v), lavando finalmente las muestras con agua.

12.2.2. Fijación de tejidos y realización de cortes para microscopía.

Las muestras se deshidrataron en series crecientes de etanol (30, 50, 70, 90 y 3 veces 100 % (v/v)) y, a continuación fueron embebidas en series crecientes (25, 50, 75 y 3 veces 100 % (p/v)) de resina epoxi Embed 812 (Electron Microscopy Sciences), incubando las muestras en cada serie durante 10 min.. Tras la colocación de las muestras embebidas en resina en moldes se dejaron polimerizar a 60 °C durante una noche y con la ayuda de un microtomo se cortaron secciones finas (0,5-0,7 µm) o ultrafinas (50-70 nm) para los análisis de microscopía óptica y electrónica, respectivamente. Las secciones finas se tiñeron con azul de toluidina durante 1 min. y se analizaron con un microscopio óptico. Las secciones

ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo 2 % (v/v) durante 3 min. y fueron examinadas con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

12.2.3. Recuento de peroxisomas.

12.2.3.1. Determinación del número de peroxisomas.

Los peroxisomas fueron contabilizados en las células de las secciones semifinas visualizados mediante microscopía óptica que contenían entre 50 y 100 células por sección, y se analizaron tres secciones independientes por tratamiento. El número de peroxisomas obtenido era indicativo del número de peroxisomas medio por plano de célula. Además, se realizó la medida del área real de cada célula mediante el programa Image J v 1.3 utilizando como referencia una imagen de un portaobjetos escalado obtenida con la misma magnificación. Finalmente, con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico ANOVA en el cual, el tipo celular (tipo de parénquima) y los tratamientos se consideraron como factores fijos y las diferentes secciones analizadas como un factor aleatorio.

12.2.3.2. Determinación del tamaño de los peroxisomas y mitocondrias.

La medida del área de los orgánulos se realizó con el programa Image J en las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión teniendo como referencia las magnificaciones de las imágenes que equivalen a tamaños reales conocidos. Se analizaron 25 secciones ultrafinas con varios orgánulos por sección.

13. Aplicaciones de Internet

Bases de datos y páginas generales.

- The Arabidopsis Information Resource (TAIR), <http://www.arabidopsis.org/>.
- The National Center for Biotechnology Information , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- The Institute for Genomic Research Arabid. Database, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>
- EMBL Nucleotide Sequence Database, <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- Plant Genome Database, <http://www.plantgdb.org/>
- The Arabid. Lipid Gene Database, <http://lipids.plantbiology.msu.edu/index.htm?q=lipids/genesurvey/index.htm>; (Beisson et al., 2003).

▪ AraPeroX, A Database of Putative Arabidopsis Proteins from Plant Peroxisomes, <http://www.araperox.uni-goettingen.de/>

▪ T-DNA Express, <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>, (Alonso et al. 2003)

▪ The Database of Arabidopsis Transcription Factors, <http://datf.cbi.pku.edu.cn/>.

Análisis de secuencias

▪ Paquete GCG (Genetics Computer Group), Universidad de Wisconsin, (Devereux et al. 1984)

▪ ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

▪ The NCBI Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Expresión génica y análisis transcriptómicos

▪ Genevestigator, <https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>, (Zimmermann et al. 2004)

▪ Arabidopsis eFP Browser del Bio-Array Resource (BAR), <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Toufighi et al., 2005)

▪ Expression Browser, del Bio-Array Resource http://bbc.botany.utoronto.ca/affydb/cgi-bin/affy_db_exprss_browser_in.cgi

▪ Proyecto AtGenExpress, <http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>, (Kilian et al, 2007).

▪ FatiGO+, <http://babelomics.bioinfo.cifp.es/fatigoplus/cgi-bin/fatigoplus.cgi>; (Al-Shahrour et al. 2004; 2007)

Búsquedas bibliográficas

▪ ISI Web of Knowledge (Web of science), <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi>

▪ PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

Bibliografía

- Abdala, G., Miersch, O., Correa, N. y Rosas, S. (1999) Detection of jasmonic acid in cultures of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural Product Letters* **14**(1): 55-63.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **15**(1): 63-78.
- Abramovitch, R.B. y Martin, G.B. (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 356-364.
- Adham, A.R., Zolman, B.K., Millius, A. y Bartel, B. (2005) Mutations in Arabidopsis acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in β -oxidation. *Plant Journal* **41**(6): 859-874.
- Adie, B., Chico, J.M., Rubio-Somoza, I. y Solano, R. (2007a) Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**(2): 160-177.
- Adie, B., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A. y Solano, R. (2007b) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**(5): 1665-1681.
- Afitlhile, M.M., Fukushige, H., Nishimura, M. y Hildebrand, D.F. (2005) A defect in glyoxysomal fatty acid β -oxidation reduces jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**(6): 603-609.
- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Shibato, J., Han, O., Iwahashi, H. y Rakwal, R. (2003) Diverse environmental cues transiently regulate OsOPR1 of the "octadecanoid pathway" revealing its importance in rice defense/stress and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**(4): 1073-1082.
- A.-H.-Mackerness, S. (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280-320 nm) stress: What are the key regulators?. *Plant Growth Regulation* **32**: 27-39.
- A.-H.-Mackerness, S., Surplus, S. L., Blake, P., John, C. F., Buchanan-Wollaston, V., Jordan, B. R. y Thomas, B. (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: Role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1413-1423.
- A.-H.-Mackerness, S., John, C. F., Jordan, B. y Thomas, B. (2001) Early signalling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters* **489**: 237-242.
- Aldridge, D.C., Galt, S., Giles, D. y Turner, W.B. (1971) Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society Communications*, 1623-1627.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. y Ullrich, C.I. (2006) Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**: 315-328.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. et al. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- Al-Shahrour, F., az-Uriarte, R. y Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* **20**: 578-580.
- Al-Shahrour, F., Mínguez, P., Tárraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D. y Dopazo, J. (2007) FatiGO+: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory

- motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Research* 35 (Web Server issue): W91-96.
- Alvares, K., Carrillo, A. Yuan, P.M., Kawano, H., Morimoto, R.I. y Reddy, J.K. (1990) Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP70 family. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **87**: 5293-5297.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. y Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**(6): 773-784.
- Anderson, J.P., Badruzsafari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R. y Kazan, K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**(12): 3460-3479.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnstrom, A., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Gobel, C., Feussner, I. y Ellerstrom, M. (2006) Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: formation of a novel oxophytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *Journal of Biological Chemistry* **281**(42): 31528-31537.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Arent, S., Pye, V.P. y Henriksen, A. (2008) Structure and function of plant acyl-CoA oxidases. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**(3): 292-301.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**(1): 1-15.
- Arondel, V., Vergnolle, C., Cantre, C. y Kader, J.C. (2000) Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **157**: 1-12.
- Audenaert, K., De Meyer, G.B. y Höfte, M.M. (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**(2): 491-501.
- Aziz, A., Heyraud, A. y Lambert, B. (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218**: 767-774.
- Baerson, S.R., Sánchez-Moreiras, A., Pedrol-Bonjoch, N., Schulz, M., Kagan, I.A., Agarwal, A.K., Reigosa, M.J. y Duke, S.O. (2005) Detoxification and transcriptome response in Arabidopsis seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2(3H)-one. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 21867-21881.
- Baker, A. y Graham, I. (2002) *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Baker, A. y Sparkes, I.A. (2005) Peroxisome protein import: some answers, more questions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(6): 640-647.
- Baker, A., Graham, I.A., Holdsworth, M., Smith, S.M. y Theodoulou, F.L. (2006) Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. *Trends in Plant Science*. **11**(3): 124-132.
- Balbi, V. y Devoto, A. (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and physiological scenarios. *New Phytologist* **177**(2): 301-318.

- Bartel, B., Leclere, S., Magidin, M. y Zolman, B. (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**(3): 198–216.
- Barth, C. y Jander, G. (2006) Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant Journal* **46**: 549–562.
- Bechtold, N. y Pelletier, G. (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**: 259–266.
- Beckers, G.J. y Spoel, S.H. (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**(1): 1–10.
- Beekwilder, J., van Leeuwen, W., van Dam, N.M., Bertossi, M., Grandi, V., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Molthoff, J.W., Schipper, B. et al. (2008) The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in Arabidopsis. *PLoS ONE* **3**(4): e2068.
- Beevers, H. (1961) Metabolic production of sucrose from fat. *Nature* **191**: 433–436.
- Beevers, H. (1982) Glyoxisomes in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **386**: 243–251.
- Behrends, W., Engeland, K. y Kindl, H. (1988) Characterization of two forms of the multifunctional protein acting in fatty acid β -oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **263**(1): 161–169.
- Beier, K., Volkl, A., Hashimoto, T. y Fahimi, H.D. (1988) Selective induction of peroxisomal enzymes by the hypolipidemic drug bezafibrate. Detection of modulations by automatic image analysis in conjunction with immunoelectron microscopy and immunoblotting. *European Journal of Cell Biology* **46**: 383–393.
- Beisson, F., Koo, A.J., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J.J., Paddock, T., Salas, J.J., Savage, L., Milcamps, A., Mhaske, V.B., Cho, Y. y Ohlrogge, J.B. (2003) Arabidopsis genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiology* **132**(2): 681–697.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. y Dangl, J.L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 391–399.
- Bell, E. y Mullet, J.E. (1993) Characterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* **103**(4): 1133–1137.
- Bell, E., Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **92**(19): 8675–8679.
- Benjamani, Y. y Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**: 289–300.
- Bent, A.F. y Mackey, D. (2007) Elicitors, Effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *The Annual Review of Phytopathology* **45**: 399–436.
- Berger, S. (2002) Jasmonate-related mutants of Arabidopsis as tools for studying stress signaling. *Planta* **214**(4): 497–504.
- Berger, S., Bell, E. y Mullet, J.E. (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of AtVsp in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* **111**(2): 525–531.

- Bergey, D.R., Howe, G.A. y Ryan, C.A. (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **93**(22): 12053-12058.
- Berrocal-Lobo, M. y Molina, A. (2004) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **17**(1): 763-770.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. y Solano, R. (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal* **29**(1): 23-32.
- Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A.C., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J.M., Métraux, J.P. y Nawrath, C. (2007) A permeable cuticle in Arabidopsis leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO Journal* **26**(8): 2158-2168.
- Biesgen, C. y Weiler, E.W. (1999) Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **208**(2): 155-165.
- Birkenmeier, G.F. y Ryan, C.A. (1998) Wound signaling in tomato plants. Evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiology* **117**(2): 687-693.
- Birkett, M.A., Campbell, C.A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A.J., Martin, J.L., Matthes, M., Napier, J.A., Pettersson, J., Pickett, J.A. et al. (2000) New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**(16): 9329-9334.
- Bishop, P.D., Makus, D.J., Pearce, G. y Ryan, C.A. (1981) Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **78**(6): 3536-3540.
- Blechert, S., Bockelmann, C., Füsslein, M., Schrader, V.T., Stelmach, B., Niesel, U. y Weiler, E.W. (1999) Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril coiling response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* **207**(3): 470-479.
- Blée, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7**(7): 315-322.
- Bock, K.W., Lipp, H.P. y Bock-Hennig, B.S. (1990) Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica* **20**: 1101-1111.
- Bode, K., Hooks, M.A. y Couée, I. (1999) Identification, separation and characterization of acyl-Coenzyme A dehydrogenases involved in mitochondrial β -oxidation in higher plants. *Plant Physiology* **119**(4): 1305-1314.
- Bodenhausen, N. y Reymond, P. (2007) Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in Arabidopsis. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**(11): 1406-1420.
- Boisson-Dernier, A., Frietsch, S., Kim, T.H., Dizon, M.B. y Schroeder, J.I. (2008) The peroxin loss-of-function mutation abstinence by mutual consent disrupts male-female gametophyte recognition. *Current Biology* **18**(1): 63-68.
- Bojorquez, G. y Gomez-Lim, M.A. (1995) Peroxisomal thiolase mRNA is induced during mango fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **28**(5): 811-820.
- Bolwell, G.P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**(4): 287-294.

- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. y Prat, S. (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Development* **18**(13): 1577-1591.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y.D., Klessig, D.F. y Dong, X.N. (1997) The *cpr5* mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant Cell* **9**: 1573-1584.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brederode, F.T., Linthorst, H.J. y Bol, J.F. (1991) Diferential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology* **17**: 1117-1125.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn, N.H., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J. y Mundy, J. (2006) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant Journal* **47**(4): 532-546.
- Broshé, M. y Strid, A. (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum* **117**: 1-10.
- Brown, J.D. y Plutzky, J. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation* **115**(4): 518-533.
- Browse, J. (2005) Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitamines and Hormones* **72**: 431-456.
- Browse, J. y Howe, G.A. (2008) New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiology* **146**: 832-838.
- Bruce, T.J., Matthes, M.C., Chamberlain, K., Woodcock, C.M., Mohib, A., Webster, B., Smart, L.E., Birkett, M.A., Pickett, J.A. y Napier, J.A. (2008) *cis*-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**(12): 4553-4558.
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C.B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q. y Li, C. (2008) Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research* **18**(7): 756-767.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**(307): 181-199.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. y Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**(1): 3-22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. y Leaver, C.J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Journal* **42**(4): 567-585.
- Bünger, M., Hooiveld, G.J., Kersten, S. y Müller, M. (2007) Exploration of PPAR functions by microarray technology—a paradigm for nutrigenomics. *Biochimica et Biophysica Acta* **1771**: 1046-1064.
- Bunker, T.W., Koetje, D.S., Stephenson, L.C., Creelman, R.A., Mullet, J.E., Grimes, H.D. (1995) Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *The Plant Cell* **7**: 1319-1331.

- Buseman, C.M., Tamura, P., Sparks, A.A., Baughman, E.J., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M.R., Esch, S.W., Shah, J., Williams, T.D. y Welti, R. (2006) Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **142**(1): 28–39.
- Cammue, B.P.A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., et al. (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* **109**: 445–455.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S. y Dong, X.N. (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is non responsive to inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* **6**(11): 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. y Dong, X.N. (1997) The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**(1): 57-63.
- Cao, H., Li, X. y Dong, X.N. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**(11): 6531-6536.
- Capiati, D.A., País, S.M. y Téllez-Iñón, M.T. (2006) Wounding increases salt tolerance in tomato plants: evidence on the participation of calmodulin-like activities in cross-tolerance signalling. *Journal of Experimental Botany* **57**(10): 2391-400.
- Carrera, E. y Prat, S. (1998) Expression of the Arabidopsis *abi1-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *Plant Journal* **15**: 765-771.
- Carrie, C., Murcha, M.W., Millar, A.H., Smith, S.M. y Whelan, J. (2007) Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. *Plant Molecular Biology* **63**(1): 97-108.
- Carvalho, A. y Gomes, V.M. (2008) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. *Peptides* **28**: 1144-1153.
- Castillo, M.C. y León, J. (2008) Expression of the β -oxidation gene *3-ketoacyl-CoA thiolase 2* (*KAT2*) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **59**(8): 2171-2179.
- Castillo, M.C., Martínez, C., Buchala, A., Métraux, J.P. y León, J. (2004) Gene-specific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**(1): 85-94.
- Castillo, M.C., Sandalio, L.M., del Río, L.A. y León, J. (2008) Peroxisome proliferation, wound-activated responses and expression of peroxisome-associated genes are cross-regulated but uncoupled in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **31**(4): 492-505.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E. y Métraux J.P. (2008) Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters* **582**(4): 473–478.
- Chang, C.C., South, S., Warren, D., Jones, J., Moser, A.B., Moser, H.W. y Gould, S.J. (1999) Metabolic control of peroxisome abundance. *Journal of Cell Science* **112**: 1579–1590.
- Chang, C.C., Ball, L., Fryer, M.J., Baker, N.R., Karpinski, S. y Mullineaux, P.M. (2004) Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant Journal* **38**(3): 499-511.

- Charlton, W. y Lopez-Huertas, E. (2002) *PEX* genes in plants and other organisms. En *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications* (Baker, A. y Graham, I.A.), pp 385-426. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Charlton, W.L., Johnson, B., Graham, I.A. y Baker, A. (2005a) Non-coordinate expression of peroxisome biogenesis, β -oxidation and glyoxylate cycle genes in mature Arabidopsis plants. *The Plant Cell Reports* **23**(9): 647-653.
- Charlton, W.L., Matsui, K., Johnson, B., Graham, I.A., Ohme-Takagi, M. y Baker, A. (2005b) Salt-induced expression of peroxisome-associated genes requires components of the ethylene, jasmonate and abscisic acid signalling pathways. *The Plant Cell and Environment* **28**(4): 513-524.
- Chassot, C., Nawrath, C. y Métraux, J.P. (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal* **49**(6): 972-980.
- Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H.J., Métraux, J.P. y Lamotte, O. (2008) Wounding of Arabidopsis leaves causes a powerful but transient protection against Botrytis infection. *Plant Journal* doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03540.x
- Chen, Z., Hong, X., Zhang, H., Wang, Y., Li, X., Zhu, J.K. y Gong, Z. (2005) Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal* **43**: 273-283.
- Cheong, J.J. y Choi, Y.D. (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* **19**(7): 409-413.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. y Luan, S. (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**(2): 661-677.
- Chern, M.S., Fitzgerald, H.A., Yadav, R.C., Canlas, P.E., Dong, X. y Ronald, P.C. (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Journal* **27**(2): 101-113.
- Chern, M., Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Navarre, D.A. y Ronald, P.C. (2005) Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant Microbe Interactions* **18**(6): 511-520.
- Chico, J.M., Raíces, M., Téllez-Iñón, M.T. y Ulloa, R.M. (2002) A calcium dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiology* **128**: 256-270.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L. y Solano, R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.
- Chou, C.M. y Kao, C.H. (1992) Methyl jasmonate, calcium, and leaf senescence in rice. *Plant Physiology* **99**(4): 1693-1694.
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A. Yang, Y., Tang, Y. y Grill, E. (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biology* **8**: 314-325.
- Chung, H.S., Koo, A.J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D. y Howe, G.A. (2008) Regulation and function of Arabidopsis *JASMONATE ZIM*-Domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* **146**(3): 952-964.

- Chuong, S.D., Mullen, R.T. y Muench, D.G. (2002) Identification of a rice RNA and microtubule-binding protein as the multifunctional protein, a peroxisomal enzyme involved in the β -oxidation of fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **277**(4): 2419-2429.
- Chuong, S.D., Park, N.I., Freeman, M.C., Mullen, R.T. y Muench, D.G. (2005) The peroxisomal multifunctional protein interacts with cortical microtubules in plant cells. *BMC Cell Biology* **6**: 40.
- Clarke, J.D., Liu, Y.D., Klessig, D.F., y Dong, X.N. (1998) Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterization of the dominant Arabidopsis *cpr6-1* mutant. *The Plant Cell* **10**(4): 557-569.
- Cleland, C.F. y Ajami, A. (1974) Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiology* **64**: 421-424.
- Cohn, J., Sessa, G. y Martin, G.B. (2001) Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology* **13**: 55-62.
- Coleman, J.O.D., Blake-Kalff, M.A.A. y Davis T.G.E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentalisation. *Trends in Plant Science* **2**: 144-151.
- Colton, H.M., Falls, J.G., Ni, H., Kwanyuen, P., Creech, D., McNeil, E., Casey, W.M., Hamilton, G. y Cariello, N.F. (2004) Visualization and quantitation of peroxisomes using fluorescent nanocrystals: treatment of rats and monkeys with fibrates and detection in the liver. *Toxicological Sciences* **80**: 183-192.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A. y Ryan, C.A. (1996a) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology* **111**(3): 797-803.
- Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A. y Ryan, C. A. (1996b). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* **383**(6603): 826-829.
- Cooper, T.G. y Beevers, H. (1969) β -oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *Journal of Biological Chemistry* **244**(13): 3514-3520.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. y del Río, L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 145-150.
- Corton, J.C., Anderson, S.P. y Stauber, A. (2000) Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**: 491-518.
- Costa, C.L., Arruda, P. y Benedetti, C.E. (2000) An Arabidopsis gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Molecular Biology* **44**(1): 61-71.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **92**(10): 4114-4119.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1997a) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 355-381.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1997b) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: non traditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *The Plant Cell* **9**(7): 1211-1223.
- Cross, B.E. y Webster, G.R. (1970) New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. XV. *N*-jasmonoyl- and *N*-dihydrojasmonoyl-isoleucine. *Journal of Chemical Society* **13**: 1839-1842.

- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S. y Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 3718–3723.
- Dammann, C., Rojo, E. y Sánchez-Serrano, J.J. (1997) Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant Journal* **11**(4): 773-782.
- Dangl, J.L. y Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**(6839): 826-833.
- De Bellis, L., Giuntini, P., Hayashi, H., Hayashi, M. y Nishimura, M. (1999) Purification and characterization of pumpkin long-chain acyl-CoA oxidase. *Physiologia Plantarum* **106**: 170-176.
- De Bellis, L., Gonzali, S., Alpi, A., Hayashi, H., Hayashi, M. y Nishimura, M. (2000) Purification and characterization of a novel pumpkin short-chain acyl-coenzyme A oxidase with structural similarity to acyl-coenzyme A dehydrogenases. *Plant Physiology* **123**(1): 327-334.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. y Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**(13): 4777-4788.
- De Bruxelles, G.L. y Roberts, M.R. (2001) Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Critical Reviews in Plant Sciences* **20**(5): 487-521.
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R.K., Hause, B., Shetty, S.H. y Mithöfer, A. (2007) Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Planta* **226**(2): 323-333.
- de Felipe, M., Lucas, M.M. y Pozuelo, J.M. (1988) Cytochemical study of catalase and peroxidase in the mesophyll of *Lolium rigidum* plants treated with isoproturon. *Journal of Plant Physiology* **132**: 67–73.
- Delaney, T.P. (2000) New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends in Plant Science* **5**(2): 49-51.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E. y Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**(5192): 1247-1250.
- Delaney, T.P., Friedrich, L. y Ryals, J.A. (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**(14): 6602-6606.
- Delessert, D., Wilson, I.W., Van Der Straeten, D., Dennis, E.S. y Dolferus, R. (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology* **55**(2): 165–181.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I. y Wasternack, C. (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*—enzymes, products, regulation. *Plant Biology* **8**(3): 297-306.
- Delker, C., Bethany, K., Zolman, B.K., Miersch, O. y Wasternack, C. (2007) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* requires peroxisomal β -oxidation enzymes— Additional proof by properties of *pex6* and *aim1*. *Phytochemistry* **68**: 1642–1650.

- del Río, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jiménez, A., López-Huertas, E. y Hernández, J.A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* **116**: 1195–1200.
- del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M. y Barroso, J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**(372): 1255-1272.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. y Barroso, J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**(2): 330–335.
- Demole, E., Lederer, E. y Mercier, D. (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* **45**: 675–685.
- Dempsey, D.A., Shah, J. y Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**(4): 547-575.
- Desai, M. y Hu, J. (2008) Light induces peroxisome proliferation in Arabidopsis seedlings through the photoreceptor phytochrome A, the transcription factor HY5 HOMOLOG, and the peroxisomal protein PEROXIN11b. *Plant Physiology* **146**: 1117-1127.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. y Fobert, P.R. (2000) The arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell* **12**(2): 279-290.
- Desvergne, B. y Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrinology Reviews* **20**: 649–688.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bogre, L. y Grant, M. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* **26**: 1434-1443.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzales, F.J. y Wahli, W. (1996) The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* **384**: 39–43.
- Devereux, J. (1984) Genetics computer group sequence analysis software package, version 6.1. *Nucleic Acids Research* **13**: 387-395.
- Devoto, A. y Turner, J.G. (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Annals of Botany* **92**(3): 329-337.
- Devoto, A. y Turner, J.G. (2005) Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiologia Plantarum* **123**(2): 161-172.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M. y Turner, J.G. (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant Journal* **32**(4): 457-466.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T. y Turner, J.G. (2005) Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**(4): 497-513.

- De Vos, M., van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelius, J.P., Dicke, M., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (2006) Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**(1): 352–363.
- Dewdney, J., Reuber, T.L., Wildermuth, M.C., Devoto, A., Cui, J., Stutius, L.M., Drummond, E.P. y Ausubel, F.M. (2000) Three unique mutants of Arabidopsis identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant Journal* **24**(2): 205-218.
- Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B.A., Legrand, M. y Heitz, T. (2000) Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant Journal* **23**(4): 431-440.
- Díaz, J., ten Have, A. y van Kan, J.A. (2002) The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **129**(3): 1341–1351.
- Dieuaide, M., Couee, I., Pradet, A. y Raymond, P. (1993) Effects of glucose starvation on the oxidation of fatty acids by maize root tip mitochondria and peroxisomes: evidence for mitochondrial fatty acid β -oxidation and acyl-CoA dehydrogenase activity in a higher plant. *Biochemical Journal* **296**: 199-207.
- Doares, S.H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A. y Ryan, C.A. (1995a) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* **108**(4): 1741-1746.
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. y Ryan, C.A. (1995b) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**(10): 4095-4098.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M. y Kazan, K. (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**(7): 2225-2245.
- Dombrowski, J.E. (2003) Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiology* **132**(4): 2098-2107.
- Dombrowski J.E. y Bergey, D.R. (2007) Calcium ions enhance systemin activity and play an integral role in the wound response. *Plant Science* **172**(2): 335–344.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**(4): 316-323.
- Dong, X. (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(4): 309-314.
- Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(5): 547-552.
- Droillard, M.J. y Paulin, A. (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology* **94**: 1187–1192.
- Durrant, W.E. y Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209.
- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E. y Jones, J.D.G. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *The Plant Cell* **12**(6): 963-977.

- Eastmond, P.J. y Graham, I.A. (2000) The multifunctional protein AtMFP2 is co-ordinately expressed with other genes of fatty acid β -oxidation during seed germination in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Biochemical Society Transactions* **28**(2): 95-99.
- Eastmond, P.J., Hooks, M. y Graham, I.A. (2000a) The Arabidopsis acyl-CoA oxidase gene family. *Biochemical Society Transactions* **28**: 755-757.
- Eastmond, P.J., Hooks, M.A., Williams, D., Lange, P., Bechtold, N., Sarrobert, C., Nussaume, L. y Graham, I.A. (2000b) Promoter trapping of a novel medium-chain acyl-CoA oxidase, which is induced transcriptionally during Arabidopsis seed germination. *Journal of Biological Chemistry* **275**(44): 34375-34381.
- Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**(6): 1349.
- Eliassen, K. y Osmundsen, H. (1984) Factors which may be significant regarding regulation of the clofibrate-dependent induction of hepatic peroxisomal β -Oxidation and hepatomegaly. *Biochemical Pharmacology* **33**(7): 1023-1031.
- Ellis, C. y Turner, J.G. (2001) The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* **13**(5): 1025-1033.
- Ellis, C. y Turner, J.G. (2002) A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**(4): 549-556.
- Ellis, C., Karafyllidis, I. y Turner, J.G. (2002a) Constitutive activation of jasmonate signalling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **15**(10): 1025-1230.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. y Turner, J.G. (2002b) The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell* **14**(7): 1557-1566.
- Ellis, C.M., Nagpal, P. Young, J.C., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. y Reed, J.W. (2005) Auxin Response Factor1 and Auxin Response Factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis Thaliana*. *Development* **132**(20): 4563-4574.
- Eulgem, T. (2006) Dissecting the WRKY web of plant defense. *PLOS Pathogens* **2**: e126.
- Eulgem, T. y Somssich, I. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(4): 366-371.
- Faber, K.N., Heyman, J.A., y Subramani, S. (1998) Two AAA family peroxins, PpPex1p and PpPex6p, interact with each other in an ATP-dependent manner and are associated with different subcellular membranous structures distinct from peroxisomes. *Molecular and Cellular Biology* **18**(2): 936-943.
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M. y Rachubinski, R.A. (2007) Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**: 321-344.
- Fahimi, H.D. (1968) Cytochemical localization of peroxidase activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **16**(8): 547-550.
- Fahimi, H.D. (1969) Cytochemical localization of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *Journal of Cell Biology* **43**(2): 275-288.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J. y Parker, J.E. (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 3292-3297.

- Fan, W. y Dong, X. (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**(6): 1377-1389.
- Fan, L., Zheng, S. y Wang, X. (1997) Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *The Plant Cell* **9**: 2183-2196.
- Fan, J.L., Quan, S., Orth, T., Awai, C., Chory, J. y Hu, J.P. (2005) The Arabidopsis *PEX12* gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. *Plant Physiology* **139**: 231-239.
- Farmer, E. (2007) Jasmonate perception machines. *Nature* **448**(9): 659-660.
- Farmer, E.E., Almeras, E. y Krishnamurthy, V. (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* **6**(4): 372-378.
- Farre, J.C. y Subramani, S. (2004) Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends in Cell Biology* **14**(9): 515-523.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Nesh-Kumar, S.P., Wei, N. y Deng, X.W. (2003) The COP9 signalosome interacts physically with SCF CO11 and modulates jasmonate responses. *The Plant Cell* **15**(5): 1083-1094.
- Feng, X.L., Ni, W.M., Elge, Mueller-Roeber, B., Xu, Z.H. y Xue H.W. (2006) Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Molecular Biology* **61**: 215-226.
- Ferrari S., Plotnikova, J. M., De, L. G. y Ausubel, F. M. (2003) Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal* **35**(2): 193-205.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M. y Dewdney, J. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*, **144**(1): 367-379.
- Ferreira, M., Bird, B. y Davies, D.D. (1989) The effect of light on the structure and organization of Lemna peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **40**: 1029-1035.
- Feussner, I. y Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 275-297.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. y Turner, J.G. (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* **6**(5): 751-759.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A. y Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO Journal* **20**: 5400-5411.
- Flescher, E. (2005) Jasmonates – a new family of anti-cancer agents. *Anticancer Drugs* **16**(9): 911-916.
- Flescher, E. (2007) Jasmonates in cancer therapy. *Cancer Letters* **245**: 1-10.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296.
- Footitt, S., Slocombe, S.P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A. y Holdsworth, M. (2002) Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO Journal* **21**(12): 2912-2922.

- Footitt, S., Marquez, J., Schmuths, H., Baker, A., Theodoulou, F.L. y Holdsworth, M. (2006) Analysis of the role of COMATOSE and peroxisomal β -oxidation in the determination of germination potential in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**(11): 2805-2814.
- Footitt, S., Cornah, J.E., Pracharoenwattana, I., Bryce, J.H. y Smith, S.M. (2007a) The Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (*kat2-1*) mutant exhibits increased flowering but reduced reproductive success. *Journal of Experimental Botany* **58**(11): 2959-2968.
- Footitt, S., Marquez, J., Schmuths, H., Baker, A., Theodoulou, F.L., Holdsworth, M. (2007b) The COMATOSE ATP-binding cassette transporter is required for full fertility in Arabidopsis. *Plant Physiology* **144**: 1467-1480.
- Forman, B.M., Chen, J. y Evans, R. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 4312-4317.
- Francia, D., Demaria, D., Calderini, O., Ferraris, L., Valentino, D., Arcioni, S., Tamietti, G. y Cardinale, F. (2007) Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. *Plant, Cell and Environment* **30**(11): 1357-1365.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S. et al (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* **10**(1): 61-70.
- Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willits, M., Cade, R. y Ryals, J. (2001) NIM1 overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**(9): 1114-1124.
- Froehlich, J.E., Itoh, A. y Howe, G.A. (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* **125**(1): 306-317.
- Frohnmeier, H. y Staiger, D. (2003) Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology* **133**: 1420-1428.
- Frohnmeier, H., Loyall, L., Blatt, M. R. y Grabov, A. (1999) Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic free Ca^{2+} and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant Journal* **20**: 209-227.
- Froman, B.E., Edwards, P.C., Bursch, A.G. y Dehesh, K. (2000) ACX3, a novel medium-chain acyl-coenzyme A oxidase from Arabidopsis. *Plant Physiology* **123**(2): 733-742.
- Frye, C.A. y Innes, R.W. (1998) An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *The Plant Cell* **10**(6): 947-956.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**(4): 436-442.
- Fukuchi-Mizutani, M., Ishiguro, K., Nakayama, T., Utsunomiya, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T. y Ueda, T. (2000) Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence. *Plant Science* **160**(1): 129-137.
- Fulda, M., Shockey, J.M., Werber, M., Wolter, F.P. y Heinz, E. (2002) Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Plant Journal* **32**(1): 93-103.

- Fulda, M., Schnurr, J., Abbadi, A., Heinz, E. y Browse, J. (2004) Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16**(2): 394-405.
- Funato, M., Shimozawa, N., Nagase, T., Takemoto, Y., Suzuki, Y., Imamura, Y., Matsumoto, T., Tsukamoto, T., Kojidani, T., Osumi, et al. (2006) Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal β -oxidation enzyme deficiencies. *Brain and Development* **28**(5): 287-292.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. y Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of Systemic Acquired-Resistance. *Science* **261**(5122): 754-756.
- García-Garrido, J.M., Menossi, M., Puigdimenèch, P., Martínez-Izquierdo, J.A. y Delseny, M. (1998) Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. *FEBS Letter* **428**: 193-199.
- Garcion, C. y Métraux, J.P. (2006) Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and signal transduction. En *Plant Hormone Signaling*, (Hedden, P. y Thomas, S), **24**: pp. 229-255, Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrè, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P. y Métraux, J.P. (2008) Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE 2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **147**(3): 1279-1287.
- Ge, X., Chen, J., Li, N., Lin, Y., Sun, C. y Cao, K. (2003) Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *Journal Biochem* **36**: 603-607.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.J., Hajouj, T., Neshet, M.F. Yariv, I., Dor, C. y Bassani, M. (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* **36**(5): 629-642.
- Gerbling, H. y Gerhardt, B. (1989) Peroxisomal degradation of branched-chain 2-oxo acids, *Plant Physiology* **91**: 1387-1392.
- Gerhardt, B. (1983) Localization of β -oxidation enzymes in peroxisomes isolated from non-fatty plant tissues. *Planta* **159**: 238-246.
- Gerhardt, B. (1992) Fatty-acid degradation in plants. *Progress in Lipid Research* **31**(4): 417-446.
- Germain, V., Rylott, E.L., Larson, T.R., Sherson, S.M., Bechtold, N., Carde, J.P., Bryce, J.H., Graham, I.A. y Smith, S.M. (2001) Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid β -oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal* **28**(1): 1-12.
- Gfeller, A. y Farmer, E.E. (2004) Keeping the leaves green above us. *Science* **306**(5701): 1515-1516.
- Gfeller, A., Liechti, R. y Farmer, E.E. (2006) *Arabidopsis* jasmonate signalling pathway. *Science signalling* *STKE*, cm1.
- Gidda, K.S., Miersch, O., Schmidt, J., Wasternack, C. y Varin, L. (2003) Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**(20): 17895-17900.
- Giri, A.P., Wunsche, H., Mitra, S., Zavala, J.A., Muck, A., Svatos, A. y Baldwin, I.T. (2006) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **142**: 1621-1641.
- Glazebrook, J. (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* **2**(4): 280-286.

- Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(4): 301-308.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E. y Ausubel, F.M. (1996) Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**(2): 973-982.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E. y Ausubel, F.M. (1997) Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* **31**: 547-569.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Métraux, J.P., Zhu, T. y Katagiri, F. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal* **34**(2): 217-228.
- Goepfert, S. y Poirier, Y. (2007) β -oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 245-251.
- Goepfert, S., Vidoudez, C., Rezzonico, E., Hiltunen, J.K. y Poirier, Y. (2005) Molecular identification and characterization of the Arabidopsis $\Delta^{3,5}$, $\Delta^{2,4}$ -dienoyl-coenzyme A isomerase, a peroxisomal enzyme participating in the β -oxidation cycle of unsaturated fatty acids. *Plant Physiology* **138**(4): 1947-1956.
- Goepfert, S., Hiltunen, J.K. y Poirier, Y. (2006) Identification and functional characterization of a monofunctional peroxisomal enoyl-CoA hydratase 2 that participates in the degradation of even cis-unsaturated fatty acids in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **281**(47): 35894-35903.
- Gombert, J., Etienne, P., Ourry, A. y Le Dily, F. (2006) The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany* **57**(9): 1949-1956.
- Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda, S., Matsumoto, T.K., Zhu, J., Cushman, J.C., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (2001) Genes that are uniquely stress regulated in *salt overly sensitive (sos)* mutants. *Plant Physiology* **126**(1): 363-375.
- Gorlach, J., Volrath, S., KnaufBeiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., y Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* **8**(4): 629-643.
- Goodman, H.M., Ecker, J.R. y Dean, C. (1995) The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**(24): 10831-10835.
- Govrin, E.M. y Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**(13): 751-757.
- Graham, I.A. (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 115-142.
- Graham, I.A. y Eastmond, P.J. (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in Lipid Research* **41**(2): 156-181.
- Grant, J. y Loake, G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiology* **124**(5): 21-29.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W. y Dangl, J.L. (1995) Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**(5225): 843-846.

- Gray, T.J.B., Beamand, J.A., Lake, B.G., Foster, J.R. y Gangolli, S.D. (1982) Peroxisome proliferation in cultured rat hepatocytes produced by clofibrate and phthalate ester metabolites. *Toxicology Letters* **10**(2-3): 273-279.
- Greenberg, J.T. y Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**: 201-211.
- Grimaldi, P.A. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 2459-2464.
- Grubb, C.D. y Abel, S. (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* **11**: 89-100.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S. y Durner, J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**(3): 507-516.
- Guhnemann-Schafer, K. y Kindl, H. (1995a) Fatty acid β -oxidation in glyoxysomes. Characterization of a new tetrafunctional protein (MFP III). *Biochimica et Biophysica Acta* **1256**(2): 181-186.
- Guhnemann-Schafer, K. y Kindl, H. (1995b) The leaf peroxisomal form (MFP IV) of multifunctional protein functioning in fatty acid β -oxidation. *Planta* **196**: 642-646.
- Guhnemann-Schafer, K., Engeland, K., Linder, D. y Kindl, H. (1994) Evidence for domain structures of the trifunctional protein and the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid β -oxidation. *European Journal of Biochemistry* **226**(3): 909-915.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M. y Zenk, M.H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 2389-2393.
- Guo, Y.F. y Gan, S.S. (2005) Leaf senescence: Signals, execution, and regulation. *Current Topics in Developmental Biology*: **71**: 83-112.
- Guo, X. y Stotz, H.U. (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in Arabidopsis is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(11): 1384-1395.
- Guo, Y., Cai, Z. y Gan, S. (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *The Plant Cell and Environment* **27**: 521-549.
- Gusta, L.V., Trischuk, R. y Weiser, C.J. (2005) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**: 308-318.
- Halim, V.A., Vess, A., Scheel, D. y Rosahl, S. (2006) The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology* **8**(3): 307-313.
- Halitschke, R. y Baldwin, I.T. (2003) Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* **36**: 794-807.
- Halitschke, R. y Baldwin, I.T. (2004) Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 238-245.
- Hamberg, M. y Fahlstadius, P. (1990) Allene oxide cyclase— A new enzyme in plant lipid-metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**(2): 518-526.
- Hanfrey, C., Fife, M., y Buchanan-Wollaston, V. (1996) Leaf senescence in *Brassica napus*: Expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **30**(3): 597-609.

- Harano, T., Nose, S., Uezu, R., Shimizu, N. y Fujiki, Y. (2001) Hsp70 regulates the interaction between the peroxisome targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p and PTS1. *Biochemical Journal* **357**: 157-165.
- Harrison, E.H. (1984) Action of clofibrate and its analogs in rats—Dissociation of hypolipidemic effects and the induction of peroxisomal β -Oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* **796**(2): 163-168.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J. y Wasternack, C. (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant Journal* **24**(1): 113-126.
- Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Miersch, O. y Wasternack, C. (2003a) Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant and Cell Physiology* **44**(6): 643-648.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O. y Wasternack, C. (2003b) Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **64**(5): 971-980.
- Hayashi, M. y Nishimura, M. (2006) *Arabidopsis thaliana*—A model organism to study plant peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**: 1382-1391.
- Hayashi, H., De, B.L. Yamaguchi, K., Kato, A., Hayashi, M. y Nishimura, M. (1998a) Molecular characterization of a glyoxysomal long chain acyl-CoA oxidase that is synthesized as a precursor of higher molecular mass in pumpkin. *Journal of Biological Chemistry* **273**(14): 8301-8307.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M. y Nishimura, M. (1998b) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid β -oxidation. *The Plant Cell* **10**(2): 183-195.
- Hayashi, H., De, B.L., Ciurli, A., Kondo, M., Hayashi, M. y Nishimura, M. (1999) A novel acyl-CoA oxidase that can oxidize short-chain acyl-CoA in plant peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry* **274**(18): 12715-12721.
- Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T. y Nishimura, M. (2000a) AtPex14p maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes. *Embo Journal* **19**(21): 5701-5710.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Kato, A., Mano, S., De Bellis, L., Ishimaru, Y., Yamaguchi, K., Hayashi, H. y Nishimura, M. (2000b) Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **32**: 295-304.
- Hayashi, Y., Hayashi, M., Hayashi, H., Hara-Nishimura, I. y Nishimura, M. (2001) Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana ped1* mutant. *Protoplasma* **218**(1-2): 83-94.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T. y Nishimura, M. (2002) Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid β -oxidation. *The Plant Cell Physiology* **43**(1): 1-11.
- He, Y. y Gan, S. (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 805-815.
- He, Y., Tang, W., Swain, J.D., Green, A.L., Jack, T.P. y Gan, S. (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**(2): 707-716.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F. y Gan, S. (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**(3): 876-884.

- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Métraux, J.P. y Nawrath, C. (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* pv. tomato interaction. *Plant Journal* **36**(3): 342–352.
- Heiland, I. y Erdmann, R. (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS Journal* **272**: 2362–2372.
- Hernández-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sánchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sánchez-Rodríguez, C. et al. (2007) Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant Cell* **19**: 890–903.
- Hertweck, C., Jarvis, A.P., Xiang, L., Moore, B.S. y Oldham, N.J. (2001) A mechanism of benzoic acid biosynthesis in plants and bacteria that mirrors fatty acid β -oxidation. *ChemBioChem* **2**(10): 784–786.
- Hildmann, T., Ebnet, M., Pena-Cortes, H., Sánchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L. y Prat, S. (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *The Plant Cell* **4**(9): 1157–1170.
- Hiltunen, J.K. y Qin, Y. (2000) β -oxidation strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1484**: 117–128.
- Hoerberichts, F.A., van Doorn, W.G., Vorst, O., Hall, R.D. y van Wordragen, M.F. (2007) Sucrose prevents upregulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2873–2885.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P. y Tabak, H.F. (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**: 85–95.
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X. y Bent, A. (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* **119**: 935–949.
- Höfgen, R. y Willmitzer, L. (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science* **66**(2): 221.
- Hofstra, A.H., King, L.M., y Walker, R.M. (1995) Peroxisome proliferation and microsomal-enzyme induction by the hypolipidemic Ci-924 in rats and mice—Relationship to tumorigenicity. *Fundamental and Applied Toxicology* **27**(2): 277–286.
- Holmes-Davis, R., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman W.J. y McCormick, S. (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **5**: 4864–4884.
- Hooks, M.A. (2002) Molecular biology, enzymology and physiology of β -oxidation. En *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications* (Baker, A. y Graham, I.A.), pp 19–55. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Hooks, M.A., Bode, K. y Couee, I. (1996) Higher-plant medium-chain and short-chain acyl-CoA oxidases—identification, purification and characterization of two novel enzymes of eukaryotic peroxisomal β -oxidation. *Biochemical Journal* **320**: 607–614.
- Hooks, M.A., Kellas, F. y Graham, I.A. (1999) Long-chain acyl-CoA oxidases of Arabidopsis. *Plant Journal* **20**(1): 1–13.
- Hopkins, M., Taylor, C., Liu, Z., Ma, F., McNamara, L., Wang, W.T. y Thompson, J.E. (2007) Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytologist* **175**(2): 201–214.

- Howe, G.A. (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**(3): 223–237.
- Howe, G.A. y Schilmiller, A.L. (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(3): 230-236.
- Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A., Li, L. y DeRocher, A.E. (2000) Cytochrome P450 dependent metabolism of oxylin in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology* **123**(2): 711-724.
- Hu, J. (2007) Plant peroxisome multiplication: highly regulated and still enigmatic. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**(8): 1112–1118.
- Hu, J., Aguirre, M., Peto, C., Alonso, J., Ecker, J. y Chory, J. (2002) A role for peroxisomes in photomorphogenesis and development of Arabidopsis. *Science* **297**: 405–409.
- Huang, Q., Alvares, K., Chu, R., Bradfield, C.A. y Reddy, J.K. (1994) Association of peroxisome proliferator-activated receptor and Hsp72. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 8493-8497.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M.J. y Durner, J. (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**(6): 938-946.
- Huffaker, A. y Ryan, C.A. (2007) Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**(25): 10732-10736.
- Huffaker, A., Pearce, G. y Ryan, C.A. (2006) An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**(26): 10098–10103.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H.J. Yu, J., Nam, S.J., Ko, J., Park, J.Y., Seo, Y.S., Kim, E.Y., Ryu, S.B., et al. (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Development Cell* **14**(2): 183-192.
- Innes, R.W. (1998) Genetic dissection of R gene signal transduction pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **1**(4): 299-304.
- Ishiga, Y., Funato, A., Tachiki, T., Toyoda, K., Shiraishi, T., Yamada, T. y Ichinose, Y. (2002) Expression of the 12-oxophytodienoic acid 10,11-reductase gene in the compatible interaction between pea and fungal pathogen. *Plant and Cell Physiology* **43**(10): 1210-1220.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. y Okada, K. (2001) The *DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**(10): 2191-2209.
- Isseman, I. y Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**: 645–650.
- Ito, T., Ng, K.H., Lim, T.S., Yu, H. y Meyerowitz E.M. (2007) The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**: 3516–3529.
- Iyanagi, T. (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *International Review of Cytology* **260**: 35-112.
- Jang, C.S., Lee, H.J., Chang, S.J. y Seo, Y.W. (2004) Expression and promoter analysis of the TaLTP1 gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant Science* **167**: 995–1001.

- Jarvis, A.P., Schaaf, O. y Oldham, N.J. (2000) 3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta* **212**(1): 119-126.
- Jin, J.B., Jin, Y.H., Lee, J., Miura, K., Yoo, C.Y., Kim, W.Y., van Oosten, M., Hyun, Y., Somers, D.E., Lee, I. et al (2008) The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *Plant Journal* **53**(3): 530-540.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M. y Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 13583-13588.
- Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Dong, X., y Glazebrook, J. (2001) Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires PAD4. *Plant Journal* **26**(4): 395-407.
- Johnson, C., Boden, E. y Arias, J. (2003) Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**(8): 1846-1858.
- Jones, J.D. y Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Jones, P.R., Manabe, T., Awazuhara, M. y Saito, K. (2003) A new member of plant CS-lyases. A cystine lyase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(12): 10291-10296.
- Jung, H.W., Kim, W. y Hwang, B.K. (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic and environmental stresses. *Plant, Cell and Environment* **26**: 915-928.
- Jung, H.W., Lim, C.W. y Hwang, B.K. (2006) Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (CALTPIII) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Plant Science* **170**: 258-266.
- Jung, C., Lyou, S.H., Yeu, S., Kim, M.A., Rhee, S., Kim, M., Lee, J.S., Choi, Y.D. y Cheong, J.J. (2007) Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Reports* **26**(7): 1053-1063.
- Kader, J.C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 627-654.
- Kang, J.H., Wang, L., Giri, A. y Baldwin, I.T. (2006) Silencing threonine deaminase and *JAR4* in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant Cell* **18**(11): 3303-3320.
- Kato, A., Hayashi, M., Takeuchi, Y. y Nishimura, M. (1996) cDNA cloning and expression of a gene for 3-ketoacyl-CoA thiolase in pumpkin cotyledons. *Plant Molecular Biology* **31**(4): 843-852.
- Kawachi, T., Sunaga, Y., Ebato, M., Hatanaka, T. y Harada, H. (2006) Repression of nitrate uptake by replacement of Asp105 by asparagine in AtNRT3.1 in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology* **47**(10): 1437-1441.
- Kessler, A. y Baldwin, I.T. (2002) Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 299-328.
- Kessler A., Halitschke, R. y Baldwin, I.T. (2004) Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science* **305**(5684): 665-668.
- Kays, S.J. y Pallas, J.E. (1980) Inhibition of photosynthesis by ethylene. *Nature* **285**: 51-52.

- Kienow, L., Schneider, K., Bartsch, M., Stuible, H.P., Weng, H., Miersch, O., Wasternack, C y Kombrink, E. (2008) Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **59**(2): 403–419.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak J, Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla y Harter, K. (2007) *Plant Journal* **50** (2): 347-363.
- Kim, H.S. y Delaney, T.P. (2002) Arabidopsis SON1 regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **14**(7): 1469-1482.
- Kindl H. (1987) β -oxidation of fatty acids by specific organelles. *The Biochemistry of Plants* **9**: 31-52.
- Kinkema, M., Fan, W.H. y Dong, X.N. (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell* **12**(12): 2339-2350.
- Kirsch, T., Löffler, H.G. y Kindl, H. (1986) Plant acyl-CoA oxidase—purification, characterization, and monomeric apoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 8570-8575.
- Kiyosawa, N., Watanabe, T., Sakuma, K., Kanbori, M., Niino, N., Ito, K., Yamoto, T. y Manabe, S. (2003) Phylogenetic tree facilitates the understanding of gene expression data on drug metabolizing enzymes obtained by microarray analysis. *Toxicology Letters* **145**: 281-289.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. y Linthorst, H.J.M. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**: 1933–1937.
- Koch, A., Thiemann, M., Grabenbauer, M., Yoon, Y., McNiven, M.A. y Schrader, M. (2003) Dynamamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 8597–8605.
- Koda, Y. (1992) The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *International Review of Cytology* **135**: 155-199.
- Koda, Y. (1997) Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia Plantarum* **100**(3): 639-646.
- Koh, S., Andre, A., Edwards, H., Ehrhardt, D. y Somerville, S. (2005) *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant Journal* **44**: 516–529.
- Kong, Z., Li, M. Yang, W., Xu, W. y Xue, Y. (2006) A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiology* **141**(4): 1376–1388.
- Koo, A.J.K., Chung, H.S., Kobayashi, Y. y Howe, G.A. (2006) Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **281**(44): 33511-33520.
- Koo, J., Kim, Y., Kim, J., Yeom, M., Lee, I.C. y Nam, H.G. (2007) A GUS/Luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with luciferin-dependent control of the reporter protein stability. *Plant and Cell Physiology* **48**(8): 1121-1131.
- Koornneef, A. y Pieterse, C.M. (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* **146**(3): 839-844.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. y Vanderveen, J.H. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* **229**(1): 57-66.
- Kourtchenko, O., Andersson, M.X., Hamberg, M., Brunnström, A., Göbel, C., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Feussner, I. y Ellerström, M. (2007) Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiology* **145**(4): 1658-1669.

- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B. y Wasternack, C. (1997) Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Febs Letters* **414**(2): 197-202.
- Kramer, J.A., Blomme, E.A.G., Bunch, R.T., Davila, J.C., Jackson, C.J., Jones, P.F., Kolaja, K.L. y Curtiss, S.W. (2003) Transcription profiling distinguishes dose-dependent effects in the livers of rats treated with clofibrate. *Toxicologic Pathology* **31**: 417-431.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G. y Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology* **11**(6): 779-791.
- Kristensen, A.K., Brunstedt, J., Nielsen, K.K., Roepstorff, P. y Mikkelsen, J.D. (2000) Characterization of a new antifungal nonspecific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Science* **155**: 131-140.
- Kubigsteltig, I., Laudert, D. y Weiler, E.W. (1999) Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* **208**(4): 463-471.
- Kunau, W.H., Dommès, V. y Schulz, H. (1995) β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes and bacteria: a century of continued progress. *Progress in Lipid Research* **34**: 267-342.
- Kunkel, B.N. y Brooks, D.M. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(4): 325-331.
- Kunz, B.A., Cahill, D.M., Mohr, P.G., Osmond, M.J. y Vonarx, E.J. (2006) Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. *International Review of Cytology* **255**: 1-40.
- Kunze, M., Pracharoenwattana, I., Smith, S.M. y Hartig, A. (2006) A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1441-1452.
- Kvannes, J., Eikhom, T.S. y Flatmark, T. (1994) The Peroxisomal β -Oxidation enzyme-system of rat-heart - basal level and effect of the peroxisome proliferator clofibrate. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1201**(2): 203-216.
- Lalwani, N.D., Reddy, M.K., Qureshi, S.A., Sirtori, C.R., Abiko, Y. y Reddy, J.K. (1983) Evaluation of selected hypolipidemic agents for the induction of peroxisomal enzymes and peroxisome proliferation in the rat-liver. *Human Toxicology* **2**(1): 27-48.
- Lalwani, N.D., Reddy, M.K., Ghosh, S., Barnard, S.D., Molello, J.A. y Reddy, J.K. (1985) Induction of fatty-acid β -Oxidation and peroxisome proliferation in the liver of rhesus-monkeys by DI-040, a new hypolipidemic agent. *Biochemical Pharmacology* **34**(19): 3473-3482.
- Lamb, C. y Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275.
- Lang, V. y Palva, E.T. (1992) The expression of a rab-related gene, *Rab18*, is induced by abscisic-acid during the cold-acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Plant Molecular Biology* **20**(5): 951-962.
- Lange, P.R., Eastmond, P.J., Madagan, K. y Graham, I.A. (2004) An *Arabidopsis* mutant disrupted in valine catabolism is also compromised in peroxisomal fatty acid β -oxidation. *FEBS Letter* **571**(1-3): 147-153.
- Latruffe, N. y Vamecq, J. (1997) Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* **79**(2-3): 81-94.

- Laudert, D. y Weiler, E.W. (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant Journal* **15**(5): 675-684.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollander-Czytko, H. y Weiler, E.W. (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Molecular Biology* **31**(2): 323-335.
- Laudert, D., Hennig, P., Stelmach, B.A., Muller, A., Andert, L. y Weiler, E.W. (1997) Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. *Analytical Biochemistry* **246**(2): 211-217.
- Laudert, D., Schaller, F. y Weiler, E.W. (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* **211**(1): 163-165.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H. y Kunkel, B.N. (2006) The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **19**(7): 789-800.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vermooij, B., Uknes, S. y Ryals, J. (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **8**(6): 863-870.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., y Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* **10**(1): 71-82.
- Lazarow, P.B. (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Current Opinion in Cell Biology* **15**(4): 489-497.
- LeBrasseur, N.D., MacIntosh, G.C., Pérez-Amador, M.A., Saitoh, M. y Green, P.J. (2002) Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *The Plant Journal* **29**(4): 393-403.
- Lee, G.I. y Howe, G.A. (2003) The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Journal* **33**(3): 567-576.
- Lee, J., Parthier, B. y Lobler, M. (1996) Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* **199**(4): 625-632.
- Lee, J., Nam, J., Park, H.C., Na, G., Miura, K., Jin, J.B. Yoo, C.Y., Baek, D., Kim, D.H., Jeong et al. (2007) Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant Journal* **49**(1): 79-90.
- León, J., Yalpani, N., Raskin, I. y Lawton, M.A. (1993) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* **103**(2): 323-328.
- León, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M.A. y Raskin, I. (1995) Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**(22): 10413-10417.
- León, J., Rojo, E., Titarenko, E. y Sánchez-Serrano, J.J. (1998) Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* **258**(4): 412-419.
- León, J., Rojo, E. y Sánchez-Serrano, J.J. (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**(354): 1-9.

- Li, J., Zhao, J., Rose, A.B., Schmidt, R. y Last, R.L. (1995) Arabidopsis phosphoribosylanthranilate isomerase: molecular genetic analysis of triplicate tryptophan pathway genes. *The Plant Cell* **7**(4): 447-461.
- Li, L., Li, C., Lee, G.I. y Howe, G.A. (2002a) Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**(9): 6416-6421.
- Li, C., Williams, M.M., Loh, Y.T., Lee, G.I. y Howe, G.A. (2002b) Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* **130**(1): 494-503.
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G.I., Bauer, P., Ling, H.Q., Ganai, M.W. y Howe, G.A. (2003) The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Cell* **15**: 1646-1661.
- Li, J., Brader, G. y Palva, E.T. (2004a) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell* **16**(2): 319-331.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E. y Howe, G.A. (2004b) The tomato homolog of CORONATINE INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell* **16**(1): 126-143.
- Li, C., Schillmiller, A.L., Liu, G., Lee, G.I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J. Yagi, K., Kobayashi, Y. y Howe, G.A. (2005) Role of β -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell* **17**(3): 971-986.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T. y Palva, E.T. (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant Journal* **46**(3): 477-491.
- Liavonchanka, A. y Feussner, I. (2006) Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* **163**(3): 348-357.
- Liechti, R. y Farmer, E.E. (2006) Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling STKE* **14**(322):cm3.
- Lim, P.O. y Nam, H.G. (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in Arabidopsis. *Current Topics in Developmental Biology* **67**: 49-83.
- Lim, P.O., Kim, H.J. y Nam, H.G. (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 115-136.
- Lin, J.F., Wu, S.H. (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *The Plant Journal* **39**: 612-628.
- Lin, Y., Sun, L., Nguyen, L.V., Rachubinski, R.A., Goodman, H.G. (1999) The pex16p homolog SSE1 and storage organelle formation in Arabidopsis seeds, *Science* **284**: 328-330.
- Lingard, M.J. y Trelease, R.N. (2006) Five Arabidopsis peroxin 11 homologs individually promote peroxisome elongation, duplication or aggregation. *Journal of Cell Science* **119**(9): 1961-1972.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D. et al. (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science* **310**: 1180-1183.
- Liscum, E. y Reed, J.W. (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* **49**(3-4): 387-400.

- Loake, G. y Grant, M. (2007) Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(5): 466-472.
- Logemann, J., Schell, J. y Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* **163**(1): 16-20.
- Lohman, K.N., Gan, S.S., John, M.C. y Amasino, R.M. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**(2): 322-328.
- López-Huertas, E., Oh, J. y Baker, A. (1999) Antibodies against pex14p block ATP-independent binding of matrix proteins to peroxisomes in vitro. *FEBS Letter* **459**(2): 227-229.
- López-Huertas, E., Charlton, W.L., Johnson, B., Graham, I.A. y Baker, A. (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO Journal* **19**(24): 6770-6777.
- Lopukhina, A., Dettenberg, M., Weiler, E.W. y Hollander-Czytko, H. (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**(4): 1678-1687.
- Lord, E.M. y Russell, S.D. (2002) The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**: 81-105.
- Lorenzo, O. y Solano, R. (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(5): 532-540.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell* **15**(1): 165-178.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2004) JASMONATE INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**(7): 1938-1950.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balagué, C. y Roby, D. (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* **8**(6): 263-271.
- Low, P.S. y Mérida, J.R. (1996) The oxidative bursts in plant defence: Function and signal transduction. *Physiologia Plantarum* **96**: 533-542.
- Ma, C., Haslbeck, M., Babujee, L., Jahn, O. y Reumann, S. (2006) Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes. *Plant Physiology* **141**(1): 47-60.
- Mackowiak, P.A. (2000) Brief history of antipyretic therapy. *Clinical Infectious Diseases* **31**: Suppl 154-156.
- Major, I.T. y Constabel, C.P. (2006) Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *New Phytologist* **172**: 617-635.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., y Raskin, I. (1990) Salicylic-acid—A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**(4983): 1002-1004.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. y Cameron, R.K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**(6905): 399-403.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L. y Dietrich, R.A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**(4): 403-410.

- Mannaerts, G.P. y Debeer, L.J. (1982) Mitochondrial and peroxisomal β -oxidation of fatty acids in rat liver. En *Peroxisome and Glyoxisomes* (Kindl, H. y Lazarow, P.B.) *Annual of New York Academy of Science*, pp 30-38.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Markus, L.B., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G. y Browse, J. (2006) Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *Plant Journal* **46**(6): 984-1008.
- Mano, S. y Nishimura, M. (2005) Plant peroxisomes. *Vitamines and Hormones* **72**: 111-154.
- Mano, S., Nakamori, C., Hayashi, M., Kato, A., Kondo, M. y Nishimura, M. (2002) Distribution and characterization of peroxisomes in Arabidopsis by visualization with GFP: Dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant and Cell Physiology* **43**(3): 331-341.
- Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Hayashi, M. y Nishimura, M. (2004) An Arabidopsis dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *Plant Journal* **38**(3): 487-498.
- Mano, S., Nakamori, C., Nito, K., Kondo, M. y Nishimura, M. (2006) The Arabidopsis *pex12* and *pex13* mutants are defective in both PTS1- and PTS2-dependent protein transport to peroxisomes. *Plant Journal* **47**(4): 604-618.
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G. y León, J. (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant Journal* **37**(2): 209-217.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B. y Schulz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta* **214**: 345-355.
- Masterson, C. y Wood, C. (2001) Mitochondrial and peroxisomal β -oxidation capacities of organs from a non-oilseed plant. *Proceedings of the Biological Sciences* **268**(1479): 1949-1953.
- Matsui, K. (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 274-280.
- Matsui, H., Nakamura, G., Ishiga, Y., Toshima, H., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. y Ichinose, Y. (2004) Structure and expression of 12-oxophytodienoate reductase (subgroup I) genes in pea, and characterization of the oxidoreductase activities of their recombinant products. *Molecular Genetics and Genomics* **271**(1): 1-10.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M. y Hara-Nishimura, I. (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**(4): 1807-1814.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. y Hara-Nishimura, I. (2003a). The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **44**(7): 661-666.
- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M. y Hara-Nishimura, I. (2003b). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. *Plant Journal* **33**(3): 493-502.
- Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M. y Hara-Nishimura, A. (2004) NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *The Plant Cell* **16**(6): 1536-1549.

- Mauch-Mani, B. y Slusarenko, A.J. (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell* **8**: 203–212.
- Mauch-Mani, B. y Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(4): 409-414.
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J. y Wasternack, C. (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant Journal* **21**(2): 199-213.
- Mayda, E., Tornero, P., Conejero, V. y Vera, P. (1999) A tomato homeobox gene (HD-zip) is involved in limiting the spread of programmed cell death. *Plant Journal* **20**(5): 591-600.
- Mayda, E., Mauch-Mani, B. y Vera, P. (2000) Arabidopsis *dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid dependent responses. *The Plant Cell* **12**(11): 2119-2128.
- Mayrose, M., Bonshtien, A. y Sessa, G. (2004) LeMPK3 is a mitogen activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *Journal of Biological Chemistry* **279**(15): 14819–14827.
- McConn, M. y Browse, J. (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an arabidopsis mutant. *The Plant Cell* **8**(3): 403-416.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. y Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**(5389): 662, 679-682.
- Melan, M.A., Dong, X.N., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M. y Peterman, T.K. (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **101**(2): 441-450.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyssbenz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., y Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic-acid at the onset of Systemic Acquired-Resistance in cucumber. *Science* **250**(4983): 1004-1006.
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G. y Yang, Y. (2006) Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, *PR* gene expression, and host resistance to fungal infection. *Molecular Plant Microbe Interactions* **19**(10): 1127-1137.
- Miao, Y. y Zentgraf, U. (2007) The antagonist function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *The Plant Cell* **19**(3): 819–830.
- Miersch, O. y Wasternack, C. (2000) Octadecanoid and jasmonate signalling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biological Chemistry* **381**(8): 715–722.
- Miersch, O., Knöfel, H.D., Schmidt, J., Kramell, R. y Parthier, B. (1998) A jasmonic acid conjugate, N-[(-)-jasmonoyl]-tyramine, from *Petunia* pollen. *Phytochemistry* **47**: 327-329.
- Miersch, O., Bohlmann, H. y Wasternack, C. (1999) Jasmonates and related compounds form *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* **50**(4): 517–523.
- Miersch, O., Weichert, H., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Feussner, I. y Wasternack, C. (2004) Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus)

- elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry* **65**(7): 847-856.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I. y Wasternack, C. (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologists* **177**(1): 114-127.
- Miller, A., Schlagnhauser, C., Spalding, M., Rodermel, S. (2000) Carbohydrate regulation of leaf development: prolongation of leaf senescence in Rubisco antisense mutants of tobacco. *Photosynthesis Research* **63**: 1-8.
- Mithöfer, A., Wanner, G. y Boland, W. (2005) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology* **137**: 1160-1168.
- Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D. y Ellis, B.E. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**(24): 14165-14170.
- Molina, A. y García-Olmedo, F. (1997) Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant Journal* **12**: 669-675.
- Molina, A., Segura, A. y García-Olmedo, F. (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letter* **316**: 119-322.
- Moraes, M.C., Birkett, M.A., Gordon-Weeks, R., Smart, L.E., Martin, J.L., Pye, B.J., Bromilow, R. y Pickett, J.A. (2008) cis-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. *Phytochemistry* **69**(1): 9-17.
- Morré, D.J., Selden, G., Ojanpera, K., Sandelius, A.S., Egger, A., Morre, D.M., Chalko, C.M. y Chalko, R.A. (1990) Peroxisome proliferation in norway spruce induced by ozone. *Protoplasma* **155**(1-3): 58-65.
- Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P. y Buchanan-Wollaston, V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* **23**(5): 677-685.
- Mortensen, P.B., Kolvraa, S., Gregersen, N. y Rasmussen, K. (1982) Cyanide-insensitive and clofibrate enhanced β -Oxidation of dodecanedioic acid in rat-liver— An indication of peroxisomal β -Oxidation of N-dicarboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **713**(2): 393-397.
- Mou, Z., Fan, W. y Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**(7): 935-944.
- Moyen, C. y Johannes, E. (1996) Systemin transiently depolarizes the tomato mesophyll cell membrane and antagonizes fusicoccin-induced extracellular acidification of mesophyll tissue. *Plant, Cell and Environment* **19**(4): 464-470.
- Moyen, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., Knight, M.R. y Johannes, E. (1998) Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca^{2+} mobilization from intra- and extracellular compartments. *The Plant Cell and Environment* **21**(11): 1101-1111.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Muelle, M.J. y Berger, S. (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**(3): 768-785.

- Muench, D.G. y Mullen, R.T. (2003) Peroxisome dynamics in plant cells: a role for the cytoskeleton. *Plant Science* **164**(3): 307-315.
- Mullen, R.T. y Trelease, R.N. (2006) The ER-peroxisome connection in plants: Development of the 'ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication' model for plant peroxisome biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**(12): 1655-1668.
- Mur, L.A., Carver, T.L. y Prats, E. (2006a) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **57**(3): 489-505.
- Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., Wasternack, C. (2006b) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**: 249-262.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473.
- Müssig, C., Biesgen, C., Lisso, J., Uwer, U., Weiler, E.W. y Altmann, T. (2000) A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid action and jasmonic acid synthesis. *Journal of Plant Physiology* **157**(2): 143-152.
- Mysore, K.S. y Ryu, C.M. (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**(2): 97-104.
- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E. et al (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**(18): 4107-4118.
- Nandi, A., Welti, R., y Shah, J. (2004) The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **16**(2): 465-477.
- Narváez-Vásquez, J. y Ryan, C.A. (2004) The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218**(3): 360-369.
- Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J. y Ryan, C.A. (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *The Plant Cell* **11**(11): 2249-2260.
- Narváez-Vásquez, J., Pearce, G. y Ryan, C. (2005) The plant cell wall matrix harbors a precursor of defense signaling peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**(36): 12974-12977.
- Narváez-Vásquez, J., Orozco-Cárdenas, M.L. y Ryan, C.A. (2007) Systemic wound signaling in tomato leaves is cooperatively regulated by systemin and hydroxyproline-rich glycopeptide signals. *Plant Molecular Biology* **65**(6): 711-718.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. y Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P. y Jones, J.D. (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* **18**(9): 650-655.

- Nawrath, C. y Métraux, J.P. (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell* **11**(8): 1393-1404.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N. y Métraux, J.P. (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *The Plant Cell* **14**(1): 275-286.
- Ni, W.T., Fahrendorf, T., Ballance, G.M., Lamb, C.J. y Dixon, R.A. (1996) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) .20. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* **30**(3): 427-438.
- Nickstadt, A., Thomma, B.P.H.J., Feussner, I., Kangasjarvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., Scheel, D. y Berger, S. (2004) The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology* **5**(5): 425-434.
- Nila, A.G., Sandalio, L.M., Lopez, M.G., Gomez, M., del Rio, L.A. y Gomez-Lim, M.A. (2006) Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gene (xPPAR α) from *Xenopus laevis* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Planta* **224**(3): 569-581.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F. 3rd y Dangl, J.L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* **37**: 579-609.
- Nobuta, K., Okrent, R.A., Stoutemyer, M., Rodibaugh, N., Kempema, L., Wildermuth, M.C. y Innes, R.W. (2007) The GH3 Acyl Adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**(2): 1144-1156.
- Noh, Y.S. y Amasino, R.M. (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology* **41**: 181-194.
- Noir, S., Bräutigam, A., Colby, T., Schmidt, J. y Panstruga, R. (2005) A reference map of the *Arabidopsis thaliana* mature pollen proteome *Biochemical and Biophysical Research Communications* **337**: 1257-1266.
- Normanly, J. y Bartel, B. (1999) Redundancy as a way of life—IAA metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **2**(3): 207-213.
- Novikoff, A.B. y Goldfischer, S. (1969) Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **17**(10): 675-680.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. y Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249-266.
- Nyathi, Y. y Baker, A. (2006) Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**(12): 1478-1495.
- Odell, J.T., Nagy, F. y Chua, N.H. (1985) Identification of DNA-sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus- 35S promoter. *Nature* **313**: 810-812.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. y Bowles, D.J. (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**(5294): 1914-1917.
- Oeljeklaus, S., Fischer, K. y Gerhardt, B. (2002) Glyoxysomal acetoacetyl-CoA thiolase and 3-oxoacetyl-CoA thiolase from sunflower cotyledons. *Planta* **214**(4): 597-607.
- Ogawa, D., Nakajima, N., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kamada, H. y Saji, H. (2007) The isochorismate pathway is negatively regulated by salicylic acid signaling in O₃-exposed *Arabidopsis*. *Planta* **226**(5): 1277-1285.

- Ohashi, T., Ito, Y., Okada, M. y Sakagami, Y. (2005) Isolation and stomatal opening activity of two oxylipins from *Ipomoea tricolor*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **15**(2): 263–265.
- Okamoto, M., Kumar, A., Li, W.B., Wang, Y., Siddiqi, M.Y., Crawford, N.M. y Glass, A.D.M. (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiology* **140**(3): 1036-1046.
- Oksanen, E., Kaikio, E., Sober, J. y Karnosky, D.F. (2003) Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar structure and peroxisomal activity. *New Phytologists* **161**: 791–799.
- Olesen, C. y Brandt, A. (1995) A full-length cDNA encoding 3-ketoacyl-CoA thiolase from *Brassica napus*. *Plant Physiology* **110**: 714.
- Olesen, C., Thomsen, K.K., Svendsen, I. y Brandt, A. (1997) The glyoxysomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor from *Brassica napus* has enzymatic activity when synthesized in *Escherichia coli*. *FEBS Letter* **412**(1): 138-140.
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L. y Skriver, K. (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* **10**: 79-87.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M. y Moriyama, Y. (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**: 587-593.
- Orozco-Cárdenas, M. y Ryan, C.A. (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**(11): 6553–6557.
- Orozco-Cárdenas, M.L. y Ryan, C. (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology* **130**(1): 487–493.
- Orozco-Cárdenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J. y Ryan, C.A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **13**(1): 179-191.
- Orth, T., Reumann, S., Zhang, X.C., Fan, J.L., Wenzel, D., Quan, S. y Hu, J.P. (2007) The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**(1): 333-350.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr. y Kangasjarvi, J. (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *The Plant Cell* **12**(10): 1849-1862.
- Palma, J.M., Garrido, M., Rodriguez-Garcia, M.I. y del Río, L.A. (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **287**(1): 68-74.
- Pallas, J.A., Paiva, N.L., Lamb, C. y Dixon, R.A. (1996) Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant Journal* **10**(2): 281–293.
- Pang, P.P. y Meyerowitz, E.M. (1987) *Arabidopsis thaliana*—A model system for plant molecular biology. *Biotechnology* **5**: 1177.
- Park, J.H., Oh, S.A., Kim, Y.H., Woo, H.R. y Nam, H.G. (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **37**: 445–454.

- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. y Feyereisen, R. (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant Journal* **31**(1): 1-12.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. y Klessig, D.F. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**(5847): 113-116.
- Parthier, B. (1990) Jasmonates—Hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *Journal of Plant Growth Regulation* **9**(1): 1–7.
- Parthier, B. (1991) Jasmonates, new regulators of plant growth and development—Many facts and few hypotheses on their actions. *Botanica Acta* **104**(6): 446-454.
- Pastori, G.M. y Foyer, C.H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* **129**(2): 460-468.
- Pearce, G., Ryan, C.A. (2003) Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 30044–30050.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. y Ryan, C.A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 995–998.
- Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J. y Ryan, C.A. (2001) Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* **411**(6839): 817–820.
- Pedersen, L. y Henriksen, A. (2005) Acyl-CoA oxidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. Structure of a key enzyme in plant lipid metabolism. *Journal of Molecular Biology* **345**(3): 487-500.
- Penfield, S., Graham, S. y Graham, I.A. (2005) Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system. *Biochemical Society Transactions* **33**: 380-383.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M. y Broekaert, W.F. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Métraux, J.P. y Broekaert, W.F. (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**(12): 2103-2113.
- Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Mertens, R. y Willmitzer, L. (1989) Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 9851-9855.
- Peña-Cortés, H., Willmitzer, L. y Sánchez-Serrano, J.J. (1991) Abscisic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor-II gene family. *The Plant Cell* **3**: 963-972.
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J. y Willmitzer, L. (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**(10): 4106-4113.
- Peretó, J., Lopez-García, P. y Moreira, D. (2005) Phylogenetic analysis of eukaryotic thiolases suggests multiple proteobacterial origins. *Journal of Molecular Evolution* **61**(1): 65-74.

- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E. et al. (2000) Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**(7): 1111-1120.
- Peterson, R.K.D. y Higley, L.G. (2001) Illuminating the black box: The relationship between injury and yield. En *Biotic Stress and Yield Loss*. CRC Press.
- Pierpoint, W.S. (1997) The natural history of salicylic acid—Plant product and mammalian medicine. *Interdisciplinary Science Reviews* **22**(1): 45-52.
- Pieterse, C.M.J. y van Loon, L.C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 456-464.
- Pieterse, C.M.J., Ton, J. y van Loon, L.C. (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* **3**: 1-8.
- Pickett, J.A., Birkett, M.A., Bruce, T.J., Chamberlain, K., Gordon-Weeks, R., Matthes, M.C., Napier, J.A., Smart, L.E. y Woodcock, C.M. (2007) Developments in aspects of ecological phytochemistry: the role of cis-jasmone in inducible defence systems in plants. *Phytochemistry* **68**(22-24): 2937-2945.
- Pineau, C., Freydisier, A., Ranocha, P., et al. (2005) *hca*: an Arabidopsis mutant exhibiting unusual cambial activity and altered vascular patterning. *The Plant Journal* **44**: 271-289.
- Pinfield-Wells, H., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Job, K., Larson, T.R. y Graham, I.A. (2005) Sucrose rescues seedling establishment but not germination of Arabidopsis mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. *Plant Journal* **43**(6): 861-872.
- Poirier, Y., Ventre, G. y Caldelari, D. (1999) Increased flow of fatty acids toward β -oxidation in developing seeds of Arabidopsis deficient in diacylglycerol acyltransferase activity or synthesizing medium-chain-length fatty acids. *Plant physiology* **121**(4): 1359-1366.
- Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T. y Hiltunen, J.K. (2006) Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**(12): 1413-1426.
- Porat, R. y Halevy, A.H. (1993) Enhancement of petunia and dendrobium flower senescence by jasmonic acid methyl-ester is via the promotion of ethylene production. *Plant Growth Regulation* **13**(3): 297-301.
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J.E. y Smith, S.M. (2005) Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *The Plant Cell* **17**(7): 2037-2048.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M. y Memelink, J. (2008) The AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* **147**(3): 1347-1357.
- Preisig-Muller, R. y Kindl, H. (1993) Thiolase mRNA translated *in vitro* yields a peptide with a putative N-terminal presequence. *Plant Molecular Biology* **22**: 59-66.
- Preisig-Muller, R., Guhnmann-Schafer, K. y Kindl, H. (1994) Domains of the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid β -oxidation. Demonstration of epimerase and isomerase activities on a peptide lacking hydratase activity. *Journal of Biological Chemistry* **269**(32): 20475-20481.
- Purdue, P.E. y Lazarow, P.B. (2001) Peroxisome biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 701-752.
- Qu, L.J. y Zhu, Y.X. (2006) Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinion in Plant Biology* **9**(5): 544-549.

- Quirino, B.F., Normanly, J. y Amasino, R.M. (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology* **40**(2): 267–278.
- Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E. y Amasino, R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**: 278–282.
- Ralph, S.G. Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J.A., Nelson, C.C., Butterfield, Y.S., Kirkpatrick, R., Liu, J., Jones, S.J. et al (2006) Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant, Cell and Environment* **29**: 1545–1570.
- Rao, M.V. y Davis, K.R. (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Journal* **17**(6): 603–614.
- Rao, M.V., Lee, H., Creelman, R.A., Mullet, J.E. y Davis, K.R. (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **12**(9): 1633–1646.
- Rao, M.V., Lee, H.I. y Davis, K.R. (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant Journal* **32**(4): 447–456.
- Rask, L., Andreasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. y Meijer, J. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* **42**: 93–113.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 439–463.
- Rea, P.A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 347–375.
- Reddy, J.K. y Chu, R.Y. (1996) Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: Pursuit of a phenomenon. Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease. *Annals of the New York Academy of sciences*, pp 176–201.
- Reddy, M.K., Lalwani, N.D., Qureshi, S.A. y Reddy, J.K. (1982) Induction of hamster hepatic peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferation-associated 80000 Mol Wt polypeptide by hypolipidemic drugs. *Human Toxicology* **1**(2): 135–147.
- Reichert, K. y Menzel, R. (2005) Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray. *Chemosphere* **61**: 229–237.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B. y Reinbothe, C. (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *The Plant Cell* **6**: 1197–1209.
- Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, Bennett, M., Traas, J., Friml, J. y Kuhlemeier, C. (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255–260.
- Reumann, S. y Weber, A.P. (2006) Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled—others remain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1496–1510.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S. y Babujee, L. (2004) AraPeroX: a database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiology* **136**(1): 2587–2608.

- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C.L., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Luder, F., Weckwerth, W. y Jahn, O. (2007) Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant Cell* **19**: 3170-3193.
- Reymond, P. y Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**(5): 404-411.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. y Farmer, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *The Plant Cell* **12**(5): 707-719.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., van Poecke, R.M., Krishnamurthy, V., Dicke, M. y Farmer, E.E. (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell* **16**(11): 3132-3147.
- Ribnicky, D.M., Shulaev, V. y Raskin, I. (1998) Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* **118**(2): 565-572.
- Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E.E., Reymond, P. y Poirier, Y. (2008) Induction of the Arabidopsis *PHO1;H10* gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE 1-dependent pathway. *Plant Physiology* **147**(2): 696-706.
- Richmond, T.A. y Bleecker, A.B. (1999) A defect in β -oxidation causes abnormal inflorescence development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **11**(10): 1911-1924.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. y Jones, J.D.G. (2007) Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(4): 372-379.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P.R. y Despres, C. (2006) The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell* **18**: 3670-3685.
- Rodríguez-Concepción, M. y Beltrán, J.P. (1995) Repression of the pea lipoxygenase gene *Loxg* is associated with carpel development. *Plant Molecular Biology* **27**(5): 887-899.
- Rojo, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G. y Sánchez-Serrano, J.J. (1998) Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **13**(2): 153-165.
- Rojo, E., León, J. y Sánchez-Serrano, J.J. (1999) Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **20**(2): 135-142.
- Rojo, E., Solano, R. y Sánchez-Serrano, J.J. (2003) Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**(1): 82-98.
- Romero-Puertas, M.C. y Delledonne, M. (2003) Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **55**(10-11): 579-583.
- Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M. y del Río, L.A. (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radical Research* **31**: S25-S31.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D. y Delledonne, M. (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**(9): 795-803.
- Rottensteiner, H. y Theodoulou, F.L. (2006) The ins and outs of peroxisomes: Co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**: 1527-1540.

- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P. y Sánchez-Serrano, J.J. (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**(3): 1146-1151.
- Russell, L., Larner, V., Kurup, S., Bougourd, S. y Holdsworth, M.J. (2000) The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potential. *Development* **127**: 3759–3767.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. y Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**(10): 1809-1819.
- Ryan, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**(1-2): 112-121.
- Ryan, C.A. y Pearce, G. (1998) Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**(1): 1-17.
- Ryan, C.A. y Moura, D.S. (2002) Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**(10): 6519-6520.
- Ryan, C.A. y Pearce, G. (2003) Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100** Suppl 2: 14577-14580.
- Ryan, C.A. y Huffaker, A. y Yamaguchi, Y. (2007) New insights into innate immunity in Arabidopsis. *Cellular Microbiology* **9**(8): 1902–1908.
- Rylott, E.L., Hooks, M.A. y Graham, I.A. (2001) Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Society Transactions* **29**: 283-287.
- Rylott, E.L., Rogers, C.A., Gilday, A.D., Edgell, T., Larson, T.R. y Graham, I.A. (2003) Arabidopsis mutants in short- and medium-chain acyl-CoA oxidase activities accumulate acyl-CoAs and reveal that fatty acid β -oxidation is essential for embryo development. *Journal of Biological Chemistry* **278**(24): 21370-21377.
- Rylott, E.L., Eastmond, P.J., Gilday, A.D., Slocombe, S.P., Larson, T.R., Baker, A. y Graham, I.A. (2006) The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (*MFP2*) of peroxisomal β -oxidation is essential for seedling establishment. *Plant Journal* **45**(6): 930-941.
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J. y Kiel, J.A. (2006) Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1767–1775.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 2nd de. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W. y Goldberg, R.B. (2000) The arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* **12**(7): 1041-1061.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T. et al (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Research* **8**(4): 153-161.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Taki, N., Obayashi, T., Aono, M., Matsumoto, F., Sakurai, N., Suzuki, H., Hirai, M.Y., Noji, M., Saito, K., Masuda, T. et al. (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for

- antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal* **44**(4): 653-668.
- Sawada, H., Shim, I.S. y Usui, K. (2006) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis—Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Science* **171**(2): 263-270.
- Schaller, F. (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* **52**(354): 11-23.
- Schaller, F. y Weiler, E.W. (1997) Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*—Structural and functional relationship to yeast old yellow enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **272**(44): 28066-28072.
- Schaller, F., Hennig, P. y Weiler, E.W. (1998) 12-oxophytodienoate-10,11-reductase: Occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid. *Plant Physiology* **118**(4): 1345-1351.
- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T. y Weiler, E.W. (2000) 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**(6): 979-984.
- Schaller, F., Schaller, A. y Stintzi, A. (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**(3): 179-199.
- Scheel, D. Resistance response physiology and signal transduction (1998) *Current Opinion in Plant Biology* **1**(4): 305-310.
- Scheer, J.M. y Ryan, C.A. (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **99**(14): 9585-9590.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. y Manners, J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**(21): 11655-11660.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Manners, J.M., Anderson, J.P., Simpson, R.S., Wilson, I.W., Somerville, S.C. y Maclean, D.J. (2003) Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* **132**(2): 999-1010.
- Schillmiller, A.L. y Howe, G.A. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(4): 369-377.
- Schillmiller, A.L., Koo, A.J.K. y Howe, G.A. (2007) Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiology* **143**(2): 812-824.
- Schluter, A., Fourcade, S., Ripp, R., Mandel, J.L., Poch, O. y Pujol, A. (2006) The origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 838-845.
- Schneider, K., Kienow, L., Schmelzer, E., Colby, T., Bartsch, M., Miersch, O., Wasternack, C., Kombrink, E. y Stuible, H.P. (2005) A new type of peroxisomal acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis thaliana* has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid. *Journal of Biological Chemistry* **280**(14): 13962-13972.
- Schrader, M. y Fahimi, H.D. (2006a) Growth and division of peroxisomes. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology* **255**: 237-290.
- Schrader, M. y Fahimi, H.D. (2006b) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1755-1766.

- Schumann, U., Wanner, G., Veenhuis, M., Schmid, M. y Gietl, C. (2003) AthPEX10, ariuclear gene essential for peroxisome and storage organelle formation during Arabidopsis embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**: 9626–9631.
- Schumann, U., Prestele, J., O'Geen, H., Brueggeman, R., Wanner, G., Gietl, C. (2007) Requirement of the C3HC4 zinc RING finger of the Arabidopsis PEX10 for photorespiration and leaf peroxisome contact with chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**(3): 1069-1074.
- Segura, A., Moreno, M. y García-Olmedo, F. (2003) Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of Arabidopsis and spinach. *FEBS* **332**: 243–246.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T. et al. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **31**: 279–292.
- Sembdner, G. y Parthier, B. (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 569-589.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S. y Choi, Y.D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**(8): 4788-4793.
- Serino, L., Reimmann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P. y Haas, D. (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics* **249**(2): 217-228.
- Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* **6**(4): 365-371.
- Shah, J. (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 229-260.
- Shah, J., Tsui, F. y Klessig, D.F. (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **10**(1): 69-78.
- Sharma, R., Lake, B.G. y Gibson, G.G. (1988) Co-induction of microsomal cytochrome-P-452 and the peroxisomal fatty-acid β -Oxidation pathway in the rat by clofibrate and di-(2-Ethylhexyl)phthalate - dose-response studies. *Biochemical Pharmacology* **37**(7): 1203-1206.
- Sharma, Y.K., Léon, J., Raskin, I. y Davis, K.R. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**(10): 5099-5104.
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V.M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F.M. y Oelmüller, R. (2008) PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *The Plant Journal* **54**(3): 428-439.
- Sherf, B.A. y Wood, K.V. (1994) Firefly luciferase engineered for improved genetic reporting. *Promega Notes* **49**: 14-21.
- Sheweita, S.A. (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Current Drug Metabolism* **1**(2): 107-132.
- Shiojiri, K., Kishimoto, K., Ozawa, R., Kugimiya, S., Urashimo, S., Arimura, G., Horiuchi, J., Nishioka, T., Matsui, K. y Takabayashi, J. (2006) Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an

- approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**(45): 16672–16676.
- Siqueira-Júnior, C.L., Jardim, B.C., Urményi, T.P., Vicente, A.C., Hansen, E., Otsuki, K., da Cunha, M., Madureira, H.C., de Carvalho, D.R. y Jacinto T. (2008) Wound response in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) plants: gene characterization of a novel chloroplast-targeted allene oxide synthase up-regulated by mechanical injury and methyl jasmonate. *The Plant Cell Reports* **27**(2): 387-397.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B. y Rothstein, S.J. (2000) Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiology* **122**(4): 1335-1342.
- Smith, J.J., Brown, T.W., Eitzen, A. y Rachubinski, R.A. (2000) Regulation of peroxisome size and number by fatty acid β -oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 20168-20178.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. y Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **2**: 755-767.
- Sobajima, H., Takeda, M., Sugimori, M., Kobashi, N., Kiribuchi, K., Cho, E.M., Akimoto, C., Yamaguchi, T., Minami, E., Shibuya, N. et al (2003) Cloning and characterization of a jasmonic acid-responsive gene encoding 12-oxophytodienoic acid reductase in suspension-cultured rice cells. *Planta* **216**(4): 692-698.
- Somerville, C.R. (2001) An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiology* **125**(1): 20-24.
- Somerville, C. y Koornneef, M. (2002) A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Natural Review Genetics* **3**: 883-889.
- Song, W.C. y Brash, A.R. (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science* **253**(5021): 781-784.
- Song, W.C., Funk, C.D. y Brash, A.R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **90**(18): 8519-8523.
- Sparkes, I.A., Brandizzi, F., Slocombe, S.P., El-Shami, M., Hawes, C. y Baker, A. (2003) An arabidopsis *pex10* null mutant is embryo lethal, implicating peroxisomes in an essential role during plant embryogenesis. *Plant Physiology* **133**(4): 1809-1819.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K. et al. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* **15**(3): 760-770.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S. y Dong, X. (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **104**(47): 18842–18847.
- Staswick, P.E. (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science* **13**(2): 66-71.
- Staswick, P.E. y Tiriyaki, I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**(8): 2117-2127.
- Staswick, P.E., Su, W. y Howell, S.H. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **89**(15): 6837-6840.

- Staswick, P.E., Yuen, G.Y. y Lehman, C.C. (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant Journal* **15**(6): 747-754.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I. y Rowe, M.L. (2002) Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell* **14**(6): 1405-1415.
- Stelmach, B.A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M. y Weiler, E.W. (2001) A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**(16): 12832-12838.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C.A. y Wasternack, C. (2003a) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato—amplification in wound signalling. *Plant Journal* **33**(3): 577-589.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. y Wasternack, C. (2003b) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**(6): 895-911.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. y Métraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 235-270.
- Stintzi, A. y Browse, J. (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **97**(19): 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. y Farmer, E.E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **98**(22): 12837-12842.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Macheroux, P. y Schaller, A. (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant Journal* **32**(4): 585-601.
- Stratmann, J. (2003a) Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *TRENDS in Plant Science* **8**(11): 526-533.
- Stratmann, J.W. (2003b) Long distance run in the wound response—jasmonic acid is pulling ahead. *Trends in Plant Science* **8**(6): 247-250.
- Stratmann, J.W. y Ryan, C.A. (1997) Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **94**(20): 11085-11089.
- Strawn, M.A., Marr, S.K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C., Wildermuth, M.C. (2007) *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 5919-5933.
- Stumpe, M. y Feussner, I. (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemical Reviews* **5**: 347-357.
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W. y Brisson, N. (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nature Biotechnology* **19**(8): 769-772.

- Sumanasekera, W.K., Tien, E.S., Turpey, R., Vanden, Heuvel, J.P. y Perdew, G.H. (2003) Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *Journal of Biological Chemistry* **278**(7): 4467-4473.
- Sundaramoorthy, R., Micossi, E., Alphey, M.S., Germain, V., Bryce, J.H., Smith, S.M., Leonard, G.A. y Hunter, W.N. (2006) The crystal structure of a plant 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals the potential for redox control of peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Journal of Molecular Biology* **359**(2): 347-357.
- Surplus, S.L., Jordan, B.R., Murphy, A.M., Carr, J.P., Thomas, B. y Mackerness, S.A.H. (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant, Cell and Environment* **21**: 685-694.
- Suza, W.P y Staswick, P.E. (2008) The role of JAR1 in Jasmonoyl-L-isoleucine production during Arabidopsis wound response. *Planta* **227**(6): 1221-1232.
- Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A. y Subramani, S. (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminal of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO Journal* **10**: 3255-3262.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Aina, T. Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T. et al. (2005) 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**(3): 1268-1283.
- Taler, D., Galperin, M., Benjamin, I., Cohen, Y. y Kenigsbuch, D. (2004) Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *The Plant Cell* **16**(1): 172-184.
- Tani, T., Sobajima, H., Okada, K., Chujo, T., Arimura, S., Tsutsumi, N., Nishimura, M., Seto, H., Nojiri, H. y Yamane H. (2008) Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* **227**(3): 517-526.
- Tamura, K., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T. y Urushidani, T. (2006) Profiling of gene expression in rat liver and rat primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. *Journal of Toxicological Sciences* **31**: 471-490.
- Tao, Y., Xie, Z.Y., Chen, W.Q., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G.Z. y Katagiri, F. (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **15**(2): 317-330.
- Taylor, N.G. (2008) Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist* **178**(2): 239-252.
- Tenhaken, R., Anstatt, C., Ludwig, A. y Seehaus, K. (2001) WY-14,643 and other agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor reveal a new mode of action for salicylic acid in soybean disease resistance. *Planta* **212**: 888-895.
- Thaler, J.S. y Bostock R.M. (2004) Interactions between abscisic-acid mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* **85**: 48-58.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R. y Graham, I.A. (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* **137**(3): 835-840.

- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. y Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665.
- Thoma, S.L., Kaneko, Y. y Somerville, C. (1993) An Arabidopsis lipid transfer protein is a cell wall protein, *Plant Journal* **3**: 427–437.
- Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., De Vries, S., Somerville, C. (1994) Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from Arabidopsis. *Plant Physiology* **105**(1): 35–45.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. y Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate dependent and salicylate-dependent defense response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. **95**(25): 15107-15111.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F. y Broekaert, W.F. (1999) Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **121**(4): 1093–1102.
- Thompson, J., Taylor, C., Wang, T.W. (2000) Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochemical Society Transactions* **28**: 775–777.
- Thoms, S. y Erdmann, R. (2005) Dynammin-related proteins and PEX11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS Journal* **272**(20): 5169–5181.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**(4): 351-357.
- Thorpe, M.R., Ferrieri, A.P., Herth, M.M. y Ferrieri, R.A. (2007) 11C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* **226**(2): 541-551.
- Tian, G.W., Mohanty, A., Chary, S.N., Li, S.J., Paap, B., Drakakaki, G., Kopec, C.D., Li, J.X., Ehrhardt, D., Jackson, D. et al. (2004) High-throughput fluorescent tagging of full-length Arabidopsis gene products in planta. *Plant Physiology* **135**(1): 25-38.
- Tilton, G., Shockey, J., Browse, J. (2000) Two families of acyl-CoA thioesterases in Arabidopsis. *Biochemical Society Transactions* **28**: 946–947.
- Tilton, G.B., Shockey, J.M., Browse, J. (2004) Biochemical and molecular characterization of ACH2, an acyl-CoA thioesterase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(9): 7487–7494.
- Tiryaki, I. y Staswick, P.E. (2002) An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiology* **130**(2): 887-894.
- Titarenko, E., Rojo, E., León, J. y Sánchez-Serrano, J.J. (1997) Jasmonic acid-dependent and independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **115**(2): 817-826.
- Titarenko, V.I. y Rachubinski, R.A. (2000) Peroxisomal membrane fusion requires two AAA family ATPases, Pex1p and Pex6p. *The Journal of Cell Biology* **150**(4): 881-886.
- Titarenko, V.I. y Rachubinski, R.A. (2004) The peroxisome: orchestrating important developmental decisions from inside the cell. *Journal of Cell Biology* **164**: 641-645.

- Titorenko, V.I. y Mullen, R.T. (2006) Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *Journal of Cell Biology* **174**(1): 11–17.
- Titorenko, V.I., Smith, J.J., Szilard, R.K. y Rachubinski, R.A. (2000) Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochemistry and Biophysics* **32**: 21–26.
- Ton, J. y Mauch-Mani, B. (2004) Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* **38**: 119–130.
- Tornero, P. y Dangl, J.L. (2001) A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **28**(4): 475–481.
- Torrá, I.P., Chinetti, G., Duval, C., Fruchart, J.C. y Staels, B. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Current Opinion in Lipidology* **12**: 245–254.
- Torres, M.A. y Dangl, J.L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 397–403.
- Torres, M.A., Jones, J.D. y Dangl, J.L. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**(2): 373–378.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E. y Provar, N.J. (2005) The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant Journal* **43**(1): 153–163.
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1 promoter. *The Plant Cell* **16**: 2481–2498.
- Trelease, R.N. (1984) Biogenesis of Glyoxysomes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**: 321–347.
- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C. y Grant, M. (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **104**(3): 1075–1080.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Matsuda, T. y Takamiya, K. (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **96**: 15362–15367.
- Turner, J.G., Ellis, C. y Devoto, A. (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14** Suppl: S153–S164.
- Ueda, J. y Kato, J. (1980) Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* **66**(2): 246–249.
- Ulker, B., Mukhtar, M.S. y Somssich, I.E. (2007) The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta* **226**(1): 125–137.
- Ulloa, R.M., Raices, M., MacIntosh, G.C., Maldonado, S. y Tellez-Inon, M.T. (2002) Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* **115**: 417–427.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S. y Bender, C.L. (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic

- acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant Microbe Interactions* **20**(8): 955-965.
- Vandenbussche, F., Smalle, J., Le, J. y et al. (2003) The Arabidopsis mutant *alh1* illustrates a cross talk between ethylene and auxin. *Plant Physiology* **131**: 1228–1238.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I. y Kunze, R. (2006) Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* **141**(2): 776-792.
- van Doorn, W.G. y Woltering, E.J. (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany* **59**(3): 453-480.
- van Verk, M.C., Pappaioannou, D., Neeleman, L., Bol, J.F. y Linthorst, H.J. (2008) A novel WRKY transcription factor is required for induction of PR-1a gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiology* **146**(4): 1983-1995.
- van Roermund, C.W.T., Tabak, H.F., van den Berg, M., Wanders, R.J.A. y Hettema, E.H. (2000) Pex11 plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **150**: 489-498.
- van Wees, S.C. y Glazebrook, J. (2003) Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *Plant Journal* **33**(4): 733-742.
- Velazhahan, R., Radhajeyalakshmi, R., Thangavelu, R., Muthukrishnan, S. (2001) An antifungal protein purified from pearl millet seeds shows sequence homology to lipid transfer proteins. *Biologia Plantarum* **44**: 417–421.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M.A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M. y Castresana, C. (2007) Oxylipins produced by the 9-Lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell* **19**(3): 831–846.
- Verberne, M.C., Budi Muljono, A.B. y Verpoorte, R. (1999) Salicylic acid biosynthesis. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* **33**: 295-312.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditzjawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. y Ryals, J. (1994) Salicylic-Acid is not the translocated signal responsible for inducing Systemic Acquired-Resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell* **6**(7): 959-965.
- Vick, B.A. y Zimmerman, D.C. (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **111**(2): 470-477.
- Vick, B.A. y Zimmerman, D.C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* **75**(2): 458-461.
- Vignols, F., Wigger, M., García-Garrido, J.M., Grellet, F., Kader, J.C. y Delseny, M. (1997) Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differently regulated. *Gene* **195**: 177–186.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., y Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **95**(12): 7209–7214.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C. y Somerville, S.C. (2002) PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**(9): 2095-2106.

- Von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K. y Keller, B. (2002) The Arabidopsis male sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**(1): 187-192.
- Wada, M. y Suetsugu, N. (2004) Plant organelle positioning. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(6): 626-631.
- Wahli, W. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Medical Weekly* **132**(7-8): 83-91.
- Walling, L.L. (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**(2): 195-216.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. y Wang, X. (2000) Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *The Plant Cell* **12**(11): 2237-2246.
- Wang, S.Y., Wu, J.H., Ng, T.B. Ye, X.Y. y Rao, P.F. (2004) A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides* **25**: 1235-1242.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N. y Dong, X. (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* **2**(11): e123.
- Wang, D., Pajeroska-Mukhtar, K., Culler, A.H. y Dong, X. (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* **17**(20): 1784-1790.
- Wang, L., Allmann, S., Wu, J. y Baldwin, I.T. (2008) Comparisons of LIPOXYGENASE3- and JASMONATE-RESISTANT4/6-silenced plants reveal that jasmonic acid and jasmonic acid-amino acid conjugates play different roles in herbivore resistance of *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **146**(3): 904-915.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahlgoy, P., Métraux, J.P. y Ryals, J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce Systemic Acquired-Resistance. *The Plant Cell* **3**(10): 1085-1094.
- Wasternack, C. (2006) Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. En: *Plant hormone signalling*, Hedden., P. y Thomas., S. eds. *Annual Plant Reviews* pp 185-228, Blackwell Publishing.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**: 681-697.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **72**: 165-221.
- Watanabe K., Fujita T., Takimoto A. (1981) Relationship between structure and flower inducing activity of benzoic acid derivates in *lemna paucicostata* 151. *The Plant Cell Physiology* **20**: 847-850.
- Watanabe, K., Yamada, N. y Takeuchi, Y. (2006) Oxidative DNA damage in cucumber cotyledons irradiated with ultraviolet light. *Journal of Plant Research* **119**: 239-246.
- Weaver, L.M. y Amasino, R.M. (2001) Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* **127**(3): 876-886.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R.M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**: 455-469.
- Weber, H. (2002) Fatty acid derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **7**(5): 217-224.

- Weber, H., Vick, B.A. y Farmer, E.E. (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **94**(19): 10473-10478.
- Weidhase, R.A.E., Kramell, H.M., Lehmann, J., Liebisch, H.W., Lerbs, W. y Parthier, B. (1987) Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Sciences* **51**: 177-186.
- Weigel, D. y Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: A laboratory Manual*. CSLH Press
- Wiermer, M., Feys, B.J. y Parker, J.E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(4): 383-389.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. y Ausubel, F.M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**(6863): 562-565.
- Wolf, G. (1996) Adipocyte differentiation is regulated by a prostaglandin liganded to the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor. *Nutrition Reviews* **54**(9): 290-292.
- Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K., Nam, H.G. (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**(8): 1779-1790.
- Woo, H.R., Goh, C.H., Park, J.H., Teysseidier, B., Kim, J.H., Park, I.Y. y Nam, H.G. (2002) Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of Arabidopsis with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *The Plant Journal* **31**: 331-340.
- Woodward, A.W. y Bartel, B. (2005a) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**(5): 707-735.
- Woodward, A.W. y Bartel, B. (2005b) The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular Biology of the Cell* **16**(2): 573-583.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. y Turner, J.G. (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**(5366): 1091-1094.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **6**(8): 1077-1085.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. y Xie, D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**(8): 1919-1935.
- Xue, R. y Zhang, B. (2007) Increased endogenous methyl jasmonate altered leaf and root development in transgenic soybean plants. *Journal of Genetics and Genomics* **34**(4): 339-346.
- Yalpani, N., León, J., Lawton, M.A. y Raskin, I. (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* **103**(2): 315-321.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., León, J. y Raskin, I. (1994) Ultraviolet-light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis related proteins and virus-resistance in tobacco. *Planta* **193**(3): 372-376.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1993) Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiology* **101**(3): 1119-1120.

- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* **6**(2): 251–264.
- Yamane, H., Abe, H. y Takahasi, N. (1982) Jasmonic acid and methyl jasmonate in pollens and anthers of three *Camellia* species. *The Plant Cell Physiology* **23**: 1125-1127.
- Yan, X. y Chen, S. (2007) Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* **226**(6): 1343-1352.
- Yan, M., Rayapuram N. y Subramani S. (2005) The control of peroxisome number and size during division and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 376–383.
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. y Farmer, E.E. (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell* **19**(8): 2470-2483.
- Yang, W., Devaiah, S.P., Pan, X., Isaac, G., Welti, R. y Wang, X. (2007) AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Biological Chemistry* **282**(25): 18116-18128.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M. y Lamb, C. (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* **136**(1): 2875-2886.
- Zhai, Q., Li, C.B., Zheng, W., Wu, X., Zhao, J., Zhou, G., Jiang, H., Sun, J., Lou, Y. y Li, C. Phytochrome chromophore deficiency leads to overproduction of jasmonic acid and elevated expression of jasmonate-responsive genes in Arabidopsis. *The Plant Cell Physiology* **48**(7): 1061-1671.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. y Dong, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **96**: 6523-6528.
- Zhang, Y.L., Tessaro, M.J., Lassner, M. y Li, X. (2003) Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **15**(11): 2647-2653.
- Zhang, J., Simmons, C. Yalpani, N., Crane, V., Wilkinson, H. y Kolomiets, M. (2005) Genomic analysis of the 12-oxo-phytodienoic acid reductase gene family of *Zea mays*. *Plant Molecular Biology* **59**(2): 323-343.
- Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y. y He, Z. (2007) Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiology* **145**(2): 450-464.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J. y Celenza, J.L. (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes and Development* **16**(23): 3100–3112.
- Zheng, Z., Mosher, S.L., Fan, B., Klessig, D.F. y Chen, Z. (2007) Functional analysis of Arabidopsis WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biology* **7**(1): 2.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. y Klessig, D.F. (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**(2): 191-202.

- Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **53**: 247-273.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganal, M. y Wasternack, C. (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *Journal of Biological Chemistry* **275**(25): 19132-19138.
- Ziegler, J., Keinänen, M. y Baldwin, I.T. (2001) Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry* **58**(5): 729-773.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., Somerville, S. (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant Journal* **40**(5): 633-646.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. y Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**(1): 2621-2632.
- Zolman, B.K. y Bartel, B. (2004) An Arabidopsis indole-3-butyric acid-response mutant defective in PEROXIN6, an apparent ATPase implicated in peroxisomal function. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **101**(6): 1786-1791.
- Zolman, B.K., Yoder, A. y Bartel, B. (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* **156**(3): 1323-1337.
- Zolman, B.K., Monroe-Augustus, M., Thompson, B., Hawes, J.W., Krukenberg, K.A., Matsuda, S.P. y Bartel, B. (2001a) *chy1*, an Arabidopsis mutant with impaired β -oxidation, is defective in a peroxisomal beta-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* **276**(33): 31037-31046.
- Zolman, B.K., Silva, I.D. y Bartel, B. (2001b) The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Plant Physiology* **127**(3): 1266-1278.
- Zolman, B.K., Nyberg, M. y Bartel, B. (2007) IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response. *Plant Molecular Biology* **64**(1-2): 59-72.

