



Universidad Politécnica de Valencia
Departamento de Tecnología de Alimentos

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

“Cambios de Expresión Génica Asociados a la Respuesta de los Frutos Cítricos Frente a la Infección por Hongos del Género Penicillium”

Memoria presentada por **Santiago Alamar Cort** para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia



MINISTERIO DE
CIENCIA E
INNOVACIÓN



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS

Los Doctores Luis González Candelas, Científico Titular, Jose Fco. Marcos López, Científico Titular y Lorenzo Zacarías García, Investigador Científico, pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas con destino en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

Hacen constar que:

La Tesis Doctoral titulada “**Cambios de Expresión Génica Asociados a la Respuesta de los Frutos Cítricos Frente a la Infección por Hongos del Género *Penicillium***”, presentada por Don Santiago Alamar Cort para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizada en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo su dirección, y que reúne los requisitos legales establecidos para ser defendida por su autor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Burjassot, a 24 de Octubre del 2008.

Luis González Candelas Jose Fco. Marcos López Lorenzo Zacarías García

A mi familia.

A Amparo.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad”*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores, Luis González, Jose F. Marcos y Lorenzo Zacarías, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y por toda la inestimable formación que he recibido de ellos. Gracias a los tres.

A mis compañeros de laboratorio durante todos estos años, Alberto, Beatriz, Ana Rosa, Berta, Anibal, Mario, Lourdes, Belén, Yolanda y Jacques, con los que he compartido, además de reactivos y pipetas, muchos buenos momentos, dentro y fuera del laboratorio. A Teresa Lafuente, María Jesús Rodrigo y Ana Veyrat por sus consejos y apoyo. A todas las técnicas, Lolita, María José, Ana y Amparo, por su ayuda y colaboración. Y a todos los compañeros del grupo de postcosecha que han aparecido en estos últimos tiempos, y que me han soportado como vecino de pasillo.

A las personas con las que he coincidido en el IATA, de los que he recibido sabios consejos, y con las que también he vivido momentos entrañables. En especial al grupo de Enzimas, Álvaro, Lola y Julia, por aguantar mi mal genio y apoyarme durante estos últimos meses. A Julio Polaina, por sus consejos y enseñanzas, pero especialmente por su cercanía y comprensión.

A todos los trabajadores del IATA, por su disponibilidad y paciencia, los del almacén, informática, seguridad, mantenimiento, biblioteca y administración. Sin todos ellos esta tesis no habría sido posible.

A todo el equipo del CFGP, y en especial a Pepe, Javier y M^a Ángeles por su ayuda y compañerismo. A Miguel Ángel Pérez, por su colaboración y asesoramiento en la realización de la biblioteca de cDNA de longitud completa.

A la explotación de cítricos Agrimarba S.A. (Lliria, Valencia) y a Jose Luis Navarro, por haberme cedido algunos árboles de sus fincas para la recolección de los frutos cítricos, que al fin y al cabo, son los protagonistas de este trabajo.

A Rosaura Farré, tutora de la fase de docencia, y a M^a José Ocio y Nuria Martínez, tutoras durante el periodo de tesis.

Este trabajo ha sido realizado gracias a becas recibidas por el Ministerio de Educación y Ciencia en los proyectos GEN2001-4885-CO5-04, AGL 2003-01304 y el proyecto intramural 2004 7 OE 150 del CSIC.

Finalmente, quiero dar gracias a mis incondicionales amigos, que han aguantado mis comentarios “científicos” sobre la naranja, aunque en la mayoría de los casos no entendieran de lo que les hablaba. A toda mi familia, y en especial a mis padres, que me han apoyado siempre, pero especialmente durante toda mi etapa predoctoral, con la ilusión de ver a su hijo hecho doctor.

A Ana, que desde que estás dentro de la mamá, me has animado a seguir adelante. A Amparo, por tu sonrisa, tu paciencia y apoyo. Por la fe que has puesto siempre en mí ¿Recuerdas cuando te dije que algún día miraríamos atrás y nos reiríamos de todo esto? Pues ya está aquí.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1.....Los hongos como patógenos de plantas.	4
1.1. Proceso de infección de hongos patógenos de plantas.	4
1.2. Mecanismos de defensa de las plantas.	5
1.3. Etileno: biosíntesis y ruta de señalización	20
1.4. Respuesta de los frutos frente a la infección.	25
2.....Podredumbres postcosecha de frutos cítricos.	28
2.1. Hongos fitopatógenos de frutos cítricos.	28
2.2. Medidas de control de enfermedades en frutos cítricos.	32
2.3. Respuestas de los frutos cítricos.	35
3.....Herramientas genómicas en la caracterización de la interacción planta-patógeno.	39
3.1. Desarrollo de proyectos de genómica funcional en plantas.	39
3.2. El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos	42
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1.....Organismos:	53
1.1. Material vegetal.	53
1.2. Microorganismos.	54
2.....Inoculaciones y toma de muestra	55
2.1. Inoculaciones.	55
2.2. Toma de muestra.	56
3.....Tratamientos y medida de etileno.	57
3.1. Tratamiento con etileno, 1-metilciclopropeno (1-MCP) y aire.	57
3.2. Determinación de la producción de etileno y estudio del desarrollo de la infección.	57
4.....Purificación y cuantificación de RNA total y mRNA	59
4.1. Extracción de RNA total de tejido de naranja.	59
4.2. Medida de la cantidad y calidad del RNA.	60

Índice general

4.3. Purificación de mRNA	60
5.....Análisis Northern	60
5.1. Electroforesis y transferencia del RNA a membranas de nailon.	60
5.2. Síntesis y marcaje de las sondas.....	61
5.3. Hibridación y análisis de datos.....	61
6.....Construcción de bibliotecas génicas y análisis de sus secuencias:	62
6.1. Biblioteca de ESTs (RindPdig24).....	62
6.2. Biblioteca de cDNAs de longitud completa (PostharvP1).....	64
6.3. Análisis de las secuencias de las bibliotecas.	67
7.....Análisis de expresión génica mediante el empleo de macromatrices de cDNA.	68
7.1. Descripción de la macromatriz.....	68
7.2. Marcaje con ³³ P de la primera cadena de cDNA por transcripción reversa.....	69
7.3. Hibridación de la macromatriz de cDNA y análisis informático de las imágenes.....	70
7.4. Secuenciación de una selección de clones de la macromatriz.....	71
8.....Análisis global de expresión génica mediante el empleo de micromatrices de cDNA.	71
8.1. Diseño experimental.....	72
8.2. Síntesis y purificación de aminoalil-cDNA (AA-cDNA).....	74
8.3. Acoplamiento de los fluoróforos al AA-cDNA y purificación de los Cy's-cDNA.....	75
8.4. Preparación de las sondas e hibridación de las micromatrices de cDNA.	75
8.5. Adquisición y procesado de las imágenes.....	76
8.6. Ontologías génicas (GO).....	78
RESULTADOS	81
1.....Estudio de la implicación del etileno en la respuesta de frutos cítricos a la infección por el hongo <i>P. digitatum</i>	83

1.1. Progreso de la podredumbre verde causada por <i>P. digitatum</i> en frutos de mandarina 'Clemenules'.....	83
1.2. Producción de etileno durante las fases iniciales de la infección de frutos de mandarina con <i>P. digitatum</i>	85
1.3. Cambios en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de etileno durante la infección de frutos de mandarina con <i>P. digitatum</i>	86
1.4. Efecto del pretratamiento con un inhibidor de la acción del etileno (1-MCP) sobre el desarrollo de la infección y la producción de etileno.....	88
2.....Análisis de una biblioteca sustractiva enriquecida en genes inducidos durante la infección de frutos de naranja 'Navelina' por el hongo <i>P. digitatum</i>	91
2.1. Utilización de una biblioteca de cDNA con expresión diferencial durante la infección elaborada mediante la técnica de Hibridación Sustractiva mediada por PCR Supresiva (SSH) y de una macromatriz de cDNA generada a partir de ella.....	91
2.2. Hibridación diferencial de la macromatriz con muestras de infección y de herida.....	92
2.3. Identificación de cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta de los frutos cítricos al etileno, la herida y/o la infección.....	93
2.4. Secuenciación y análisis de las secuencias de RindPdigS.....	96
2.5. Caracterización transcripcional de la respuesta de frutos de naranja 'Navelina' a la infección por <i>P. digitatum</i>	99
3.....Generación de bibliotecas de cDNA de genes expresados durante la infección.....	104
3.1. Construcción de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1.....	104
3.2. Comparación de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1.....	106
3.3. Análisis de las bibliotecas PostharvP1, RindPdig24 y RindPdigS en el contexto del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.....	112
4.....Análisis global de la expresión génica en frutos de mandarina 'Clemenules' en respuesta a la infección por <i>P. digitatum</i> mediante hibridación con una micromatriz de cDNA del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.....	116
4.1. Elaboración de la muestra de referencia.....	116

4.2. Hibridaciones.....	117
4.3. Expresión diferencial en las condiciones de estudio.	119
4.4. Anotación funcional.	125
4.5. Análisis de la expresión de genes relacionados con patogénesis, estrés oxidativo, transcripción y señalización.	137
5.....Análisis de la expresión génica en frutos cítricos en respuesta a herida, infección y etileno mediante hibridación Northern.	143
5.1. Expresión diferencial de genes de frutos cítricos en respuesta a la infección.	144
5.2. Implicación del etileno en la expresión de genes por la infección de frutos cítricos.....	153
5.3. Comparación de la respuesta de naranjas 'Navelate' a la infección con hongos patógenos y no patógenos del género <i>Penicillium</i>	159
DISCUSIÓN	167
1.....Caracterización molecular de la interacción fruto-patógeno.....	169
1.1. Infección de frutos cítricos por hongos del género <i>Penicillium</i>	170
1.2. Variabilidad experimental del patosistema fruto cítrico- <i>P. digitatum</i>	171
2.....Aplicación de herramientas genómicas en el estudio de la interacción fruto cítrico- <i>P. digitatum</i>	174
2.1. Análisis de secuencias.....	174
2.2. Hibridaciones de matrices.....	179
2.3. Anotación funcional global de la respuesta del fruto cítrico a la infección por <i>P. digitatum</i>	183
3.....Redireccionamiento del metabolismo celular del fruto en respuesta a la infección por <i>P. digitatum</i> . Implicación del metabolismo secundario.....	191
3.1. Biosíntesis de corismato/siquimato.....	193
3.2. Biosíntesis de Isopentenildifosfato (IPP).....	195
3.3. Metabolismo de fenilpropanoides.	198
3.4. Metabolismo de alcaloides.....	201
3.5. Expresión de genes del metabolismo secundario en los frutos cítricos por la interacción con diferentes hongos del género <i>Penicillium</i>	204

4.....Señalización de respuestas de defensa del fruto cítrico a la infección. Implicación del etileno.	206
4.1. Producción de etileno en la respuesta del fruto a la infección.....	209
4.2. Estudio de la inducción de la síntesis de etileno durante la infección por anotación funcional.....	211
4.3. ¿Está implicado el etileno en la respuesta de defensa del fruto durante la infección?	213
CONCLUSIONES.....	221
BIBLIOGRAFÍA	227

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de interacción entre rutas de señalización hormonal durante la interacción planta-patógeno 12

Figura 2. Estructura de algunos compuestos de interés en la respuesta de las plantas a la infección 17

Figura 3. Ruta de biosíntesis de etileno. Abreviaturas: ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ACO, ACC oxidasa; ACS, ACC sintasa; SAM, S-adenosil-metionina 21

Figura 4. Esquema simplificado de la ruta de señalización de etileno 23

Figura 5 Síntomas sobre frutos cítricos de podredumbres postcosecha . 29

Figura 6. El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) 42

Figura 7. Variedades de frutos cítricos utilizados durante el trabajo de tesis 53

Figura 8. *Penicillium digitatum* 54

Figura 9. Estudio del desarrollo de la infección en frutos previamente pretratados en jarras 58

Figura 10. Esquema de la síntesis de cDNA mediante el *kit* “BD smart™ PCR cDNA síntesis” 65

Figura 11. Electroforesis de los cDNAs obtenidos tras la digestión con Sfi I previo a la inserción en el vector pENTR 66

Figura 12. Diseño de la macromatriz de cDNA elaborada a partir de clones procedentes de la biblioteca RindPdigS 69

Figura 13. Diseño experimental de las hibridaciones a realizar con las micromatrices 73

Figura 14.. Incidencia de la infección en frutos de mandarina ‘Clemenules’ inoculadas con 3 concentraciones (10^4 , 10^5 y 10^6 conidios/mL) del hongo *P. digitatum* 83

Figura 15. Fotografías representativas de la evolución de la podredumbre verde causada por *P. digitatum* a 10^4 conidios/mL 84

Figura 16. Producción de ET en frutos de mandarina 'Clemenules' heridos o infectados con <i>P. digitatum</i> a 10^6 conidios/mL y en frutos control intactos	85
Figura 17. Análisis Northern de CsACS1, CsACS2 y CsACO en corteza de frutos de mandarina 'Clemenules' después de la herida y durante el desarrollo de la infección con <i>P. digitatum</i> (10^6 conidios/mL) a 8, 16, 24 y 48 horas respecto al control	87
Figura 18. Incidencia de la infección en frutos de 'Clemenules' tratados con diferentes concentraciones de 1-MCP e inoculados con <i>P. digitatum</i> a 5×10^3 con/mL, frente a frutos tratados con aire	89
Figura 19. Producción de ET en frutos de 'Clemenules' tratados con dos concentraciones de 1-MCP e infectados con <i>P. digitatum</i> (5×10^3 con/mL) frente a frutos tratados con aire	90
Figura 20. Imágenes comparadas de la hibridación de la macromatriz generada a partir de la biblioteca RindPdigS	92
Figura 21. Gráfico obtenido con el programa ArrayStat a partir del análisis de expresión que relaciona la intensidad de señal ($\text{Log}_{10}(I \times W)$) frente a la expresión diferencial ($\text{Log}_2(I/W)$) para cada clon de la macromatriz.	93
Figura 22. Detalle representativo de la hibridación de las macromatrices	94
Figura 23. Diagramas de Venn que muestran la distribución de los clones de RindPdigS presentes en la macromatriz según sus patrones de expresión diferencial, inducidos (A) o reprimidos (B) respecto a aire para las condiciones de herida, infección con <i>P. digitatum</i> (10^6 conidios/mL) o aplicación de ET exógeno (10 ppm)	95
Figura 24. Análisis Northern del material utilizado en la síntesis de la biblioteca de cDNA PostharvP1	104
Figura 25. Estimación del tamaño medio de los insertos de cDNA clonados en la biblioteca RindPdig24	106
Figura 26. Distribución de los unigenes de las bibliotecas RindPdig24 y PostHarvP1	108
Figura 27. Distribución en categorías funcionales de los unigenes de las bibliotecas RindPdig24 y PostHarvP1 con homólogos en <i>A. thaliana</i>	109

Figura 28. Distribución de los agrupamientos en las bibliotecas RindPdig24 y PostharvP1	110
Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los RNAs utilizados en la elaboración de la muestra de referencia, correspondientes a frutos de dos campañas distintas	117
Figura 30. Esquema del diseño experimental empleado en la hibridación de las micromatrices	118
Figura 31. Imágenes de la hibridación de una micromatriz	118
Figura 32. Árbol jerárquico de los unigenes significativos obtenido a partir del análisis SAM ("Significance Analysis of Microarrays") entre todas las condiciones de estudio	119
Figura 33. Diagramas de Venn que muestran la distribución de los genes presentes en la macromatriz según sus patrones de expresión diferencial, inducidos (A) o reprimidos (B) respecto a aire para las condiciones de herida, infección con <i>P. digitatum</i> (10^6 conidios/mL) o aplicación de ET exógeno (10 ppm)	121
Figura 34. Perfiles de expresión de 13 unigenes de cítricos presentes en la micromatriz que presentan la máxima similitud con el gen At5g54160 de <i>A. thaliana</i> , que codifica una cafeil O-metil transferasa	126
Figura 35. Representación conjunta de las rutas de síntesis de ET a partir de metionina, ciclo de la metionina y ciclo de SAM, mediante el uso del programa informático "OMICS viewer" de "AraCyc 4.0"	132
Figura 36. Representación de la ruta de la síntesis de ácido jasmónico, mediante el uso del programa informático "OMICS viewer" de "AraCyc 4.0"	133
Figura 37. Representación de la ruta de la síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano y L-fenilalanina, mediante el uso del programa informático "OMICS viewer" de "AraCyc 4.0"	134
Figura 38. Representación del metabolismo de fenilpropanoides a partir de la fenilalanina, mediante el uso del programa informático "OMICS viewer" de "AraCyc 4.0"	135
Figura 39. Representación de la biosíntesis de isoprenoides, mediante el uso del programa informático "OMICS viewer" de "AraCyc 4.0"	136

Figura 40. Imagen de la hibridación de los filtros utilizados para el análisis Northern hibridados con un fragmento del gen 26 rRNA de <i>C. sinensis</i>	145
Figura 41. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: síntesis de aminoácidos precursores del metabolismo secundario y fenilpropanoides	147
Figura 42. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: fenilpropanoides	149
Figura 43. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: alcaloides	150
Figura 44. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: isoprenoides y derivados de isoprenoides	151
Figura 45. Análisis Northern de genes relacionados con la síntesis de ET y el metabolismo de la S-adenosilmetionina (SAM)	154
Figura 46. Análisis Northern de genes con expresión diferencial en respuesta a ET en frutos <i>Clemenules</i> recién recogidos del campo (0), pretratados con aire (A), ET (10 ppm) (E) y 1-MCP (500 ppb) (M) en tres réplicas diferentes	155
Figura 47. Análisis Northern de genes de naranjas 'Navelate' con expresión diferencial en respuesta a la infección y al tratamiento con ET siguiendo cuatro tipos de patrones: genes inducidos tanto por el tratamiento con ET como por la infección (Patrón 1), genes que se inducen por el tratamiento por ET pero que no responden a la infección (Patrón 2), genes que no responden al ET pero que se inducen en respuesta a la infección (Patrón 3), y genes que no responden ni al tratamiento con ET ni como respuesta a la infección (Patrón 4)	157
Figura 48. Análisis Northern de genes de mandarinas 'Clemenules' con expresión diferencial a la infección y al tratamiento con ET siguiendo cuatro tipos de patrones: genes inducidos tanto por el tratamiento con ET como por la infección (Patrón 1), genes que se inducen por el tratamiento por ET pero que no responden a la infección (Patrón 2), genes que no responden al ET pero que se inducen durante el proceso de infección (Patrón 3), y genes que no responden ni al tratamiento con ET ni como respuesta a la infección (Patrón 4)	158
Figura 49. Incidencia de la infección de naranjas 'Navelate' causada por los aislados PHI-1 de <i>P. digitatum</i> , PHI-8 de <i>P. brevicompactum</i> , PHI-26 de <i>P. digitatum</i> y PHI-65 de <i>P. expansum</i>	160

Figura 50. Tinción con azul de metileno (RNA tot) e hibridaron con un fragmento del gen 26 rDNA de <i>C. sinensis</i> (26S rDNA <i>C. sinensis</i>), de dos filtros utilizados para hibridación Northern con RNA de frutos 'Navelate' heridos o infectados con 10 ⁶ conidios/mL de cuatro hongos diferentes del género <i>Penicillium</i> .	161
Figura 51. Análisis Northern de genes relacionados con la síntesis de ET y el metabolismo de S-adenosil metionina (SAM) durante la infección por hongos del género <i>Penicillium</i>	162
Figura 52. Análisis Northern de genes de naranjas 'Navelate' relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides durante la infección por hongos del género <i>Penicillium</i>	163
Figura 53. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo de alcaloides durante la infección por hongos del género <i>Penicillium</i>	164
Figura 54. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides y derivados de isoprenoides durante la infección por hongos del género <i>Penicillium</i>	165
Figura 55. Análisis Northern de genes de localización metabólica desconocida durante la infección por hongos del género <i>Penicillium</i>	166
Figura 56. Nivel de expresión del unigen 7117 presente en la micromatriz, con homología a una lipoxigenasa	173
Figura 57. Esquema del alineamiento de los unigenes N14G04, P-27 y P-03, pertenecientes a la biblioteca de cDNA RindPdigS, con el unigen aCL246Contig2 de la base de datos del CFGP, con homología a Nectarina 5	183
Figura 58. Esquema de las rutas del metabolismo secundario de frutos cítricos	192
Figura 59. Biosíntesis de IPP en las células vegetales mediante la ruta del mevalonato en el citosol y la ruta del MEP en los plastidios	196

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las características de las bibliotecas de cDNA utilizadas durante este trabajo	67
Tabla 2. Esquema de las muestras de RNA utilizadas para la elaboración de la muestra de referencia	73
Tabla 3. Características generales del agrupamiento de las ESTs de la colección RindPdigS después de su secuenciación	97
Tabla 4. Distribución de las ESTs de la biblioteca RindPdigS con homólogos en <i>A. thaliana</i> en categorías funcionales, usando la base de datos del MIPS	98
Tabla 5. Anotación de los unigenes que contienen 4 o más ESTs de la colección RindPdigS	100
Tabla 6. Unigenes con mayor inducción en infección respecto a herida de la biblioteca RindPdigS	104
Tabla 7. Estadísticas de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1 y del conjunto de ambas bibliotecas	107
Tabla 8. Anotación de los unigenes que contienen 4 o más ESTs en alguna de las bibliotecas RindPdig24 o PostharvP1	110
Tabla 9. Análisis comparativo de Ontologías génicas (GO) en la categoría de “proceso biológico”, para las tres colecciones de infección y para el conjunto de colecciones del CFGP.....	113
Tabla 10. Análisis comparativo de Ontologías génicas (GO) en la categoría de “función molecular” para las tres colecciones de infección y para el conjunto de colecciones del CFGP	114
Tabla 11. Análisis comparativo de Ontologías génicas (GO) en la categoría de “componente celular” para las tres colecciones de infección y para el conjunto de colecciones del CFGP	115
Tabla 12. Unigenes de la micromatriz con mayor inducción en infección respecto a herida (FDR<1%). Para cada unigen, se muestra la relación entre su expresión en las condiciones de infección (I), etileno (E) y herida (W) respecto a aire (A), y de infección respecto a herida, como logaritmo en base 2 de sus cocientes (SAM; FDR<1%)	123

Tabla 13. Unigenes de la micromatriz con mayor represión en infección respecto a herida (FDR<1%). Para cada unigen, se muestra la relación entre su expresión en las condiciones de infección (I), ET (E) y herida (W) respecto a aire (A), y de infección respecto a herida, como logaritmo en base 2 de sus cocientes (SAM; FDR<1%)	124
Tabla 14. Anotación funcional por Ontologías Génicas (GO) de los procesos biológicos significativos “no redundantes” de los genes de frutos ‘Clemenules’ con inducción en respuesta a la infección con <i>P. digitatum</i> (10 ⁶ conidios/mL) respecto a herida, con el programa FatiGO+ (Babelomics). Se incluye el valor de p corregido por FDR y el nivel GO de cada proceso biológico	127
Tabla 15. Análisis de la anotación funcional por Ontologías Génicas (Procesos biológicos) de genes con expresión diferencial en frutos ‘Clemenules’ en las condiciones de tratamiento con ET (10 ppm) (E), herida (W) e infección con <i>P. digitatum</i> (10 ⁶ conidios/mL) (I) frente al tratamiento con aire (A)	128
Tabla 16. Unigenes de la micromatriz relacionados con la transcripción y señalización, con mayor expresión diferencial (FDR<1%), tanto por inducción como represión, en infección respecto a herida y/o aire	138
Tabla 17. Unigenes de la micromatriz relacionados con el estrés oxidativo con mayor expresión diferencial (FDR<1%), tanto por inducción como represión, en infección respecto a herida y/o aire	140
Tabla 18. Unigenes de la que codifican proteínas PR con mayor expresión diferencial (FDR<1%), tanto por inducción como represión, en infección respecto a herida y/o aire	142
Tabla 19. Unigenes con mayor expresión en infección por <i>P. digitatum</i> (I) respecto a aire (A), según los resultados de hibridación con macromatrices y micromatrices	181

RESUMEN/SUMMARY/RESUM

“Cambios de expresión génica asociados a la respuesta de los frutos cítricos frente a la infección por hongos del género *Penicillium*”

La infección producida por *P. digitatum* y *P. italicum* es una de las principales causas de pérdidas durante la postcosecha de frutos cítricos. Los problemas derivados de la aplicación de fungicidas químicos utilizados en su control justifican la búsqueda de alternativas eficaces. El conocimiento de las bases de la interacción planta-patógeno y los mecanismos de defensa de las plantas son fundamentales en el desarrollo de alternativas para el control de patologías vegetales. Hasta la fecha, hay pocos estudios sobre los procesos implicados en la respuesta de defensa de los frutos frente a la infección por hongos fitopatógenos.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos empleado diferentes aproximaciones de genómica funcional para profundizar en la respuesta de los frutos cítricos a la infección por hongos del género *Penicillium*. Hemos elaborado dos bibliotecas de cDNA: RindPdig24 se obtuvo de frutos de mandarina ‘Clemenules’ a las 24 horas después de ser heridos e infectados por *P. digitatum*, mientras que PostharvP1 se obtuvo de frutos de mandarina ‘Clemenules’ heridos y frutos heridos e infectados por *P. digitatum* a diferentes tiempos, y está enriquecida en cDNAs de longitud completa. Junto a ellas, se analizó una tercera biblioteca substractiva de cDNA elaborada previamente, RindPdigS, enriquecida en genes específicos de infección de naranja ‘Navelina’. La secuenciación masiva de clones de estas tres bibliotecas, su anotación y categorización funcional ha permitido obtener una representación global de los genes expresados en el fruto de los cítricos durante el proceso de infección. Así, se han secuenciado un total de 2.505 clones distintos e identificado 1.941 unigenes. Los datos se han integrado en el Proyecto Español de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP). El 25% del total de clones no tienen homología en las bases de datos públicas y el 26% de los unigenes no están presentes en ninguna otra biblioteca de cDNA del CFGP. Estos datos indican que la respuesta del fruto cítrico a la infección presenta particularidades importantes que merecen un estudio detallado, y que una parte importante de la misma es relativamente desconocida.

Hemos realizado estudios de expresión génica a partir del empleo, por un lado, de una macromatriz conteniendo 1.436 clones seleccionados aleatoriamente de RindPdigS y, por otro lado, de la micromatriz 7K

generada en el marco del CFGP y que contiene 12.671 clones, que corresponden a 6.333 unigenes. La hibridación de estas matrices ha permitido caracterizar el perfil global de expresión en distintos tratamientos relacionados con la infección. Se ha estudiado de forma más detallada los cambios de expresión de genes individuales en respuesta a la herida o infección por distintos hongos del género *Penicillium*. El análisis global de los resultados muestra de forma más relevante un redireccionamiento del metabolismo general del fruto cítrico durante la infección hacia rutas del metabolismo secundario implicadas en la síntesis de compuestos relacionados con respuestas de defensa, en especial de la familia fenilpropanoides y alcaloides, identificando genes relevantes a partir de su abundancia o nivel de expresión. Estas secuencias génicas enriquecen notablemente el repertorio de genes implicados en la biosíntesis de distintas familias de compuestos del metabolismo secundario. Asimismo, hemos realizado estudios encaminados a determinar la implicación de la hormona vegetal etileno en la respuesta de frutos cítricos a la infección. Los resultados indican que aunque el etileno es un mediador de una parte importante de las respuestas frente a la infección, deben existir otros mecanismos adicionales de regulación.

“Changes in gene expression in citrus fruits in response to the infection by fungi from the genus *Penicillium*”

Infection produced by *P. digitatum* and *P. italicum* is one of the main causes of losses during postharvest of citrus fruit. Problems derived from the application of chemical fungicides for its control justify the search of efficient alternatives. Knowledge of the basis of plant-pathogen interaction and plant defence is essential for the development of alternatives to control plant pathologies. So far, there are few studies dealing with the processes involved in the defence response of fruits to infection by phytopathogenic fungi.

During the development of this work we have used different functional genomics approaches to analyse the response of the citrus fruit to the infection by fungi from the genus *Penicillium*. We have obtained two cDNA libraries: RindPdig24 was made from ‘Clemenules’ mandarin fruits 24 hours after being wounded and inoculated with *P. digitatum*, whereas PostharvP1 was made from wounded ‘Clemenules’ mandarin fruits, and from fruits that had been wounded and inoculated with *P. digitatum*, at different times after inoculation, and it is enriched in full-length cDNAs. In addition, a previous cDNA subtractive library, RindPdigS, which is enriched in infection-responsive genes of ‘Navelina’ oranges, was also studied. Massive sequencing of clones from these three libraries, sequence annotation and functional categorization, offer a global representation of the genes expressed in the citrus fruit during the infection. A total of 2.505 different clones have been sequenced, and 1.941 unigenes have been identified. Data have been integrated within the Spanish Citrus Functional Genomic Project (CFGP). Twenty five percent of the clones do not have homology in public databases, and twenty six percent of the unigenes are not present in any other cDNA library of the CFGP. We conclude that the response of citrus fruit to infection has distinctive features that deserve detailed analyses, being a significant part of the response relatively unknown.

In a second part, we have carried out gene expression studies through array technology using a cDNA macroarray containing 1.436 clones randomly selected from RindPdigS, and a 7k cDNA microarray constructed by the CFGP consortium that contains 12.671 clones grouped into 6.333 unigenes. Hybridization of these arrays allowed the characterization of the global expression profile in different treatments

related to infection. Individual changes in gene expression in response to wounding or infection by different fungi from the genus *Penicillium* have also been studied in detail. Taken together, the results show noteworthy changes during infection of the fruit metabolism towards specific secondary metabolism pathways involved in the synthesis of defence related compounds, specially of the phenylpropanoid and alkaloid families, identifying significant genes from their abundance or expression level. These represent an enrichment of the repertoire of genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites belonging to different families.

Finally, we carried out studies towards the elucidation of the involvement of the plant hormone ethylene in the response of citrus fruits to the infection. The results obtained suggest that although ethylene is an important mediator of this response, there are probably additional mechanisms/regulators involved.

“Canvis d’expressió gènica associats a la resposta dels fruits cítrics contra la infecció per fongs del gènere *Penicillium*”

La infecció produïda per *P. digitatum* y *P. italicum* és una de les principals causes de pèrdues durant la postcollita de fruits cítrics. Els problemes derivats de l’aplicació de fungicides químics utilitzats en el seu control justifiquen la recerca d’alternatives eficaces. El coneixement de les bases de la interacció planta-patogen i els mecanismes de defensa de les plantes són fonamentals en el desenvolupament d’alternatives per al control de patologies vegetals. Fins l’actualitat, hi ha pocs estudis sobre el processos implicats en la resposta de defensa dels fruits contra la infecció per fongs fitopatògens.

Durant el desenvolupament d’aquest treball hem emprat diferents aproximacions de genòmica funcional per a aprofundir en la resposta dels fruits cítrics a la infecció per fongs del gènere *Penicillium*. Hem elaborat dues biblioteques de cDNA: RindPdig24 s’obtingué de fruits de mandarina ‘Clemenules’ a les 24 hores després de ser ferits i infectats per *P. digitatum*, mentre que PostharvP1 s’obtingué de fruits de mandarina ‘Clemenules’ ferits i infectats per *P. digitatum*, a diferents temps, i està enriquida en cDNAs de longitud completa. Junt a elles, es va analitzar una tercera biblioteca substractiva de cDNA elaborada prèviament, RindPdigS, enriquida en gens específics d’infecció de taronja ‘Navelina’. La seqüenciació massiva de clons d’estes tres biblioteques, la seua anotació i categorització funcional ha permés obtenir una representació global dels gens expressats en el fruit dels cítrics durant el procés d’infecció. Així, s’han seqüenciat un total de 2.505 clons diferents i identificat 1.941 unigens. Les dades s’han integrat en el Projecte Espanyol de Genòmica Funcional de Cítrics (CFGP). El 25% del total de clons no tenen homologia en les bases de dades públiques i el 26 % dels unigens no estan presents en cap altra biblioteca de cDNA del CFGP. Estes dades indiquen que la resposta del fruit cítric a la infecció presenta particularitats importants que mereixen un estudi detallat i que una part important de la mateixa és relativament desconeguda.

Hem realitzat estudis d’expressió gènica a partir de l’ús, per una banda, d’una macromatriu que conté 1.436 clons seleccionats aleatòriament de RindPdigS i, d’altra banda, de la micromatriu 7K generada en el marc del CFGP i que conté 12.671 clons que corresponen a 6.333 unigens. La hibridació d’estes matrius ha permés caracteritzar el

perfil global d'expressió en distints tractaments relacionats amb la infecció. S'han estudiat de manera més detallada els canvis d'expressió de gens individuals en resposta a la ferida o infecció per distints fongs del gènere *Penicillium*. L'anàlisi global dels resultats mostra de forma més rellevant un redireccionament del metabolisme general del fruit cítric durant la infecció cap a rutes del metabolisme secundari implicades en la síntesi de composts relacionats amb respostes de defensa, en especial de la família dels fenilpropanoides i alcaloides, identificant gens rellevants a partir de la seua abundància o nivell d'expressió. Estes seqüències gèniques enriqueixen notablement el repertori de gens implicats en la biosíntesi de distintes famílies de composts del metabolisme secundari. Així mateix, hem realitzat estudis encaminats a determinar la implicació de l'hormona vegetal etilé en la resposta de fruits cítrics a la infecció. Els resultats indiquen que encara que l'etilé és un mediador d'una part important de les respostes contra la infecció, es possible que existisquen altres mecanismes addicionals de regulació.

ABREVIATURAS

1-MCP	1-metilciclopropeno
ABA	Ácido abscísico
AA-cDNA	Aminoalil-cDNA
ACC	Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico
ACO	ACC oxidasa
ACS	ACC sintasa
AHCY	Adenosilhomocisteinasa
ASR	Respuesta a estrés mediada por ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidasa
AQP	Acuaporina
AT	Acetiltransferasa
<i>Avr</i>	gen de avirulencia
BABA	Ácido β -aminobutírico
BCH	β -caroteno hidroxilasa
BBE	Enzima del puente de la berberina
BIA	Alcaloide benzilisoquinólico
BrEt	Bromuro de etidio
CAS	Proteína celular implicada en apoptosis
CAT	Catalasa
CaOMT	Catecol-O-metil transferasa

Abreviaturas

CBS	Cistationina sintasa
cDNA	DNA complementario
CDP-MEP	4-difosfocitidil-2-metileritritol-2-fosfato
CFGP	Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos
COMT	Ácido cafeico-O-metiltransferasa
CPRD	Sensible a la deshidratación del caupi
CFP	Proteína de la familia de las ciclasas
CS	Cafeína sintasa
CTNS	Cistinosina
CyP	Ciclofilina
CYP79A1	Citocromo P450 79A1
CYPM	Citocromo monoxigenasa
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato
DCN	Dicianina
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DX	1-desoxi-D-xilulosa
DXP	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
DXS	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
dpi	Días después de la inoculación
EMB	Proteína abundante embrionaria

EPSPs	3-fosfosiquimato-1-carboxivinil transferasa
ERF	Factor de transcripción de respuesta al etileno
EST	Etiqueta de secuencia expresada
ET	Etileno
FBD	Proteína con secuencia de unión a FAD
FPP	Farnesil pirofosfato
GcpE	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1- il difosfato sintasa
GGPP	Geranilgeranildifosfato
GPP	Geranildifosfato
GR	Glutation reductasa
GST	Glutation S-transferasa
HGA	Ácido homogentísico
HGGT	Ácido homogentísico geranilgeranil transferasa
HR	Respuesta hipersensible
HRGP	Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
HSP	Proteína de choque térmico
IPI	Isopentenildifosfato isomerasa
IPP	Isopentenildifosfato
JA	Ácido jasmónico
LAS	L-asparaginasa
LEA	Proteína tardía abundante embrionaria

Abreviaturas

LOX	Lipoxigenasa
LTP	Proteína transportadora de lípidos
MAPK	Proteínquinasa de señalización celular
MEC	2-metileritritol-2,4-ciclodifosfato
MECPs	Metileritritol-ciclofosfato sintasa
MeJA	Jasmonato de metilo
MEP	Metileritritolfosfato
MetH	Metionina sintasa
MOPS	Ácido 3-morfolino-propano-sulfónico
mRNA	RNA mensajero
MT	Monoterpenos
MVA	Ácido mevalónico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NCBI	Centro nacional de investigación biotecnológica
OMT	O-metiltransferasa
OX	Oxidoreductasa
PAL	L-fenilalanina amonio-liasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Patata, glucosa y agar
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina

PL	Pectato liasa
POX	Peroxidasa
PR	Relacionado con patógenesis
Pyr	Piruvato
R	Gen de resistencia
Retic	Reticulina
RT-PCR	Transcripción reversa de mRNA seguida de PCR
rRNA	RNA ribosómico
SA	Ácido salicílico
SAM	S-adenosil-L-metionina
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SAMS	S-adenosilmetionina sintetasa
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
SSH	Hibridación sustractiva mediada por PCR supresiva
TC	Tocoferol ciclasa
TIA	Alcaloide terpenoide indólico
TR	Tropinona reductasa
Trp	Triptófano
TrpD	Antranilato fosforribosil transferasa

Abreviaturas

Tyr	Tirosina
UGT	UDP-glucosil transferasa
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

Los cítricos constituyen el primer cultivo frutal del mundo, con una producción de 92 millones de toneladas en la campaña 2004/05. España es el quinto productor mundial de frutos cítricos, después de Brasil, EEUU, China y México, con una producción de 6,1 millones de toneladas y 300.000 hectáreas de cultivo, y el primer exportador de fruta fresca, con 3,5 millones de toneladas, casi cuatro veces más que el siguiente exportador, EEUU (FAO, 2005, <http://www.fao.org>). Aproximadamente el 45% de la producción es de naranjas dulces, el 41% de mandarinas y el 13% de limones. La Comunidad Valenciana, con una producción de 3,8 millones de toneladas, representa un 70% de la producción nacional y un 68% de la superficie de cultivo (MAPA, 2005, <http://www.mapa.es>).

Aunque es difícil de cuantificar, se estima que las enfermedades son la causa de entre un 12 y un 20% de las pérdidas de la producción total en la agricultura (Knight *et al.*, 1997). En el caso de los frutos cítricos, la infección por hongos fitopatógenos es una de las principales causas de pérdidas durante su postcosecha, estimándose entre un 3 y un 6% del producto manejado en las centrales hortofrutícolas (Tuset, 1987, Perucho, 2002). Los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, causantes de la podredumbre verde y azul de frutos cítricos, respectivamente, son los que presentan mayor incidencia, pudiendo llegar a producir el 80% de las infecciones postcosecha de cítricos (Tuset, 1987).

Actualmente, el método principal de control de hongos patógenos en cítricos se realiza mediante la aplicación de fungicidas químicos, que en el caso de la postcosecha de cítricos son principalmente derivados del benzimidazol, como el tiabendazol, y del imidazol, como el imazalil. Sin embargo, el empleo de estos compuestos no está exento de inconvenientes. El problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana y el medio ambiente, junto a los que se derivan de la aparición de cepas resistentes y unas normativas más estrictas, han incentivado los estudios de métodos alternativos a los procedimientos habituales de control de hongos.

El conocimiento de las bases de la interacción planta-patógeno es fundamental en el desarrollo de alternativas para el control de enfermedades vegetales. La gran mayoría de los estudios realizados en este sentido se centran en la respuesta frente a la infección de la parte vegetativa de la planta. Sin embargo, y a pesar de su importancia

agroalimentaria, hay pocos estudios sobre la respuesta de los frutos frente al ataque por patógenos, y más escasos todavía son aquellos que abordan este conocimiento desde el punto de vista molecular.

Los estudios realizados sobre frutos cítricos muestran que la infección por *P. digitatum* conlleva la liberación de grandes cantidades de etileno (ET), producido tanto por el fruto como por el hongo (Achilea *et al.*, 1985b). El ET es una hormona vegetal gaseosa asociada a distintos procesos de desarrollo, senescencia y respuesta a estrés de plantas, incluida la respuesta frente a la infección por microorganismos patógenos (Broekaert *et al.*, 2006). Trabajos previos del “Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha” del IATA estudiaron la regulación de la síntesis de ET en frutos cítricos como respuesta a la infección fúngica, y cómo la percepción del ET influye en la inducción de respuestas de defensa, mostrando distintos patrones de regulación de genes específicos en la respuesta a la infección por *P. digitatum* (Marcos *et al.*, 2005).

Este trabajo se centra en el estudio de las bases moleculares, mediante el empleo de técnicas de alto rendimiento, de la respuesta de los frutos cítricos a la infección por hongos del género *Penicillium* y la determinación de la posible implicación del ET como mediador de dicha respuesta.

1. Los hongos como patógenos de plantas.

Los hongos constituyen un amplio grupo de organismos eucariotas, de nutrición heterótrofa, presentes en la mayor parte de los hábitats del planeta. Existen unas 100.000 especies de hongos, de las que aproximadamente el 10% son capaces de colonizar tejidos vegetales, de ellas, unas 8.000 pueden llegar a producir algún tipo de enfermedad o desorden en las plantas (Schafer, 1994; Knogge, 1996).

1.1. Proceso de infección de hongos patógenos de plantas.

Cada tipo de hongo ha desarrollado un modo específico de invadir y colonizar su planta huésped (Agrios, 2007). Algunas especies penetran directamente a través de la piel mediante presión mecánica o ataque

enzimático. Otros penetran a través de los orificios naturales de la planta (estomas o lenticelas). Un tercer grupo de organismos solamente invaden tejido que ha sido previamente dañado. Una vez se encuentra dentro de la planta, el patógeno se clasifica en tres grupos según su estrategia de colonización.

Los hongos **necrótrofos** son aquellos que matan las células de la planta para obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo, como *Penicillium* sp., *Botrytis* sp., o *Alternaria* sp. Éstos suelen ser patógenos de un número amplio de especies de plantas. Por ejemplo, existen hongos de los géneros *Pythium* y *Botrytis* capaces de atacar a más de 200 especies. Sin embargo, algunos necrótrofos también producen toxinas específicas de huésped que son activas solamente frente a una o pocas especies de plantas.

Los hongos **biótrofos**, por el contrario, mantienen las células de la planta huésped vivas, y generalmente muestran un alto grado de especialización sobre una especie determinada de planta. Estos organismos a menudo forman una estructura de penetración en el tejido de la planta para introducirse en la célula y luego un haustorio especializado en la alimentación, que maximiza la absorción por el patógeno de agua y nutrientes de la planta.

Los hongos **hemibiótrofos** tienen un comportamiento secuencial de biótrofo y necrótrofo, manteniendo inicialmente vivas a las células de la planta, pero matándolas en etapas posteriores de la infección. Esto ocurre al aumentar las necesidades nutricionales del patógeno por el aumento de su biomasa. Este tipo de patógenos son los causantes de algunas de las mayores plagas de la historia, como el caso de *Phytophthora infestans*, causante de la plaga de la patata en Irlanda en 1846, que provocó la emigración de más de un millón de personas a los Estados Unidos y otros países.

1.2. Mecanismos de defensa de las plantas.

En general, las plantas se defienden de los patógenos por la combinación de dos tipos de defensa: una **defensa estructural**, que actúa como barrera física e inhibe la entrada y proliferación del patógeno, y una

defensa bioquímica, que produce sustancias que son directamente tóxicas para el patógeno o crean condiciones para inhibir su crecimiento.

Todas las plantas están expuestas a cientos de diferentes tipos de hongos, bacterias, virus y nematodos. En la mayoría de ocasiones, la enfermedad es un estado inusual. La forma más común de resistencia vegetal es la denominada **resistencia “no huésped”** (“non-host resistance”), y ocurre cuando un microorganismo potencialmente patógeno es incapaz de infectar a ninguna planta de la misma especie, y éstas son resistentes a cualquier aislado de la misma especie de patógeno (Nürberger y Lipka, 2005). Esta defensa se basa en la actuación de múltiples mecanismos de protección que comprenden tanto barreras constitutivas como reacciones inducibles (Heath, 2000). También es llamada resistencia poligénica, cuantitativa u horizontal, e implica diversos mecanismos basales o generales de la planta, que incluyen múltiples genes. Por ejemplo, un manzano no es afectado por patógenos del tomate y viceversa, debido al componente genético de cada uno. Por otro lado, se dice que una planta es tolerante a un patógeno cuando éste se puede multiplicar en la misma, pero sin causar sintomatología apreciable (Bos y Parlevliet, 1995). Dicho microorganismo puede incluso ser patogénico sobre un hospedador vegetal distinto al anterior.

La presión selectiva sobre plantas hospedadoras ejercida por patógenos virulentos ha supuesto la coevolución de genes de resistencia determinantes de la llamada resistencia vertical o específica. Esta resistencia se basa en un reconocimiento genético y/o interacción funcional entre el producto de un gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno y el correspondiente producto de un gen de resistencia (*R*) en la planta (resistencia gen a gen, “gene-for-gene resistance”) (Flor, 1971). Cuando se produce este reconocimiento, el patógeno no consigue infectar a la planta, determinando lo que se conoce como **interacción incompatible**. En la interacción incompatible la planta no es resistente a todos los individuos de una especie del patógeno, sino solamente a unas determinadas cepas de la misma, portadoras del gen *avr*. En este contexto, se denomina **interacción compatible** cuando el patógeno es capaz de entrar en el hospedador y desarrollar la infección, por la presencia en alguno de los dos organismos de versiones de genes *avr* o *R* que no interactúan entre sí. El hecho de que se produzca la resistencia o la susceptibilidad, está relacionado con el tiempo necesario por la planta para el reconocimiento del patógeno y la rapidez y efectividad en la activación de los mecanismos

de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Tao *et al.*, 2003; Nimchuk *et al.*, 2003).

Cuando se produce la entrada del patógeno hay un reconocimiento entre el elicitor producido por el patógeno y el receptor de la planta, o entre el producto del gen *avr* y el producto del gen R en la planta. En ese momento se producen una serie de respuestas en la planta que inicialmente ocurren en el lugar de entrada del patógeno y en las células adyacentes. Entre las primeras respuestas de defensa locales se produce la activación de protein-quinasas y fosfatasa. Además, la alteración de las membranas celulares por degradación de sus constituyentes debida al ataque por el patógeno provoca cambios en su permeabilidad, lo que favorece la entrada de iones Ca^{2+} y H^+ , que conducen a una acidificación del citoplasma y un aumento del pH extracelular (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Zhao *et al.*, 2005).

En algunas ocasiones la respuesta de la planta a la entrada del patógeno supone la activación de la llamada **respuesta hipersensible** (HR). Este mecanismo consiste en una rápida activación de reacciones de defensa de la planta que conducen a la muerte celular en la zona de infección del patógeno, con lo que se limita el movimiento del mismo. La HR es efectiva para evitar el desarrollo de hongos biótrofos, como *Peronospora sp.* o *Erysiphe sp.*, los cuales necesitan de las células del hospedador para desarrollarse. Sin embargo, en el caso de hongos necrótrofos, como *Botrytis sp.*, *Alternaria sp.* o *Penicillium sp.* la HR no es efectiva, ya que estos patógenos obtienen del tejido muerto los nutrientes que necesitan para su desarrollo (Glazebrook, 2005). La HR se produce mediante la activación de un conjunto de respuestas rápidas de defensa, dentro de las primeras 24 horas, entre las que se encuentra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la síntesis de óxido nítrico (NO), la activación de diversas rutas metabólicas y la síntesis de proteínas. También tiene lugar una activación transcripcional de genes de defensa, mediante la fosforilación/desfosforilación de proteínas por medio de MAPKs (“mitogen-activated protein kinases”).

Señalización de repuestas de defensa

La actuación conjunta de los mecanismos de respuesta de las plantas a patógenos requiere de una precisa regulación mediada por la presencia de diferentes moléculas señalizadoras vegetales. El ácido salicílico, el ácido jasmónico, el ET y el ácido abscísico son compuestos reguladores de las plantas que participan en numerosas respuestas de defensa.

El **ácido salicílico (SA)** (ácido 2-hidroxibenzoico) es una hormona que tiene un papel importante en la activación de respuestas de la planta frente al ataque por patógenos (Dempsey *et al.*, 1999). El SA se sintetiza por dos rutas diferentes que tienen en común el corismato producido mediante la ruta del siquimato (Metraux, 2002). Inicialmente se postuló la producción de SA a partir de la fenilalanina y el ácido cinámico como parte del metabolismo de fenilpropanoides, pero se ha demostrado experimentalmente su biosíntesis a través del isocorismato, en una ruta también presente en bacterias. Las respuestas de defensa mediadas por SA incluyen la inducción de resistencia a la enfermedad, tanto de forma local como sistémica. El aumento del nivel de SA durante la infección suele estar asociado tanto con un incremento de la expresión de genes implicados en la síntesis de proteínas PR, como con la inducción de la HR y la respuesta sistémica adquirida (SAR). Para la inducción de la SAR la planta requiere la presencia de SA, y está asociada con la acumulación de proteínas PR. La SAR proporciona resistencia también en partes alejadas del lugar de penetración del patógeno en la planta (Hammerschmidt, 1999). Este mecanismo de defensa inducido, proporciona una protección duradera contra un amplio espectro de microorganismos (Durrant y Dong, 2004).

Los mecanismos por los cuales el SA actúa en las plantas son variados y pueden suponer alteraciones en la síntesis y actividad de algunas enzimas, aumento en la expresión de genes de defensa, potenciación de varias respuestas de defensa y/o generación de radicales libres. Mediante el empleo de plantas mutantes ha sido posible el aislamiento de genes implicados en las rutas de defensa mediadas por SA (Dempsey *et al.*, 1999).

El **ácido jasmónico (JA)** es una hormona derivada de oxilipina, que proviene del ácido linolénico. Tanto el JA como sus derivados,

llamados jasmonatos, tienen una función relevante en la regulación de las respuestas de la planta a patógenos y herbívoros, y al daño mecánico (Ryan, 2000). Las respuestas de defensa dependientes de JA no provocan muerte celular, y participan en los mecanismos de defensa contra organismos necrótrofos (McDowell y Dangl, 2000). Hay estudios que demuestran la importancia del JA en la defensa de la planta y que se basan en el efecto de la aplicación de jasmonatos exógenos sobre el nivel de resistencia de la planta. Se ha comprobado que la aplicación de metil jasmonato (MeJA), sintetizado a partir del JA mediante la acción de la enzima JA carboxil metiltransferasa (Cheong y Choi, 2003), induce la expresión de genes relacionados con defensa de las plantas y la acumulación de compuestos del metabolismo secundario (Gundlach *et al.*, 1992; Pozo *et al.*, 2004). La aplicación de jasmonatos sobre *A. thaliana* reduce el desarrollo de la infección por varios hongos necrótrofos, como *B. cinerea*, *A. brassicicola* y *Plectosphaerella cucumerina* (Thomma *et al.*, 2000). Además, se ha comprobado que la aplicación de JA y MeJA en plantas de patata y tomate induce defensas locales y sistémicas frente al hongo patógeno *Phytophthora infestans* (Cohen *et al.*, 1993).

El **etileno (ET)** es una hormona vegetal gaseosa asociada a distintos procesos de desarrollo, senescencia y respuesta a estrés de plantas, incluyendo el estrés biótico originado por el ataque de patógenos (Broekaert *et al.*, 2006).

La infección de una planta por parte de un patógeno supone en muchos casos la inducción en la producción de ET (Williamson, 1950; Broekaert *et al.*, 2006). El reconocimiento del ataque de los patógenos supone la activación de los genes y enzimas implicadas en la biosíntesis de esta hormona (Alonso y Stepanova, 2004). El ET activa la expresión de genes de defensa relacionados con aspectos diferenciados de la fisiología de la planta. La aplicación de ET induce la acumulación de proteínas ricas en hidroxiprolina de pared celular que refuerzan la misma (Ecker y Davis, 1987). Además, esta hormona actúa en la respuesta de oclusión del xilema que se produce en algunos casos para evitar la diseminación del patógeno (VanderMolen *et al.*, 1983). La función del ET en la producción de fitoalexinas depende del tipo de ruta metabólica implicada (Pedras *et al.*, 2000). En general, las fitoalexinas producidas a partir de las rutas de fenilpropanoides están inducidas por el ET en varias especies de plantas (Kamo y Hirai, 2000). Muchas de las llamadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (véase más adelante), además de estar asociadas a la

respuesta sistémica adquirida (SAR) mediada por SA como se ha mencionado anteriormente, se inducen como respuesta a la aplicación de ET o sus miméticos (Van Loon *et al.*, 2006b). Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que, aparte del papel en las respuestas de defensa, el ET puede estar implicado en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, influyendo en aspectos como la clorosis, senescencia y muerte celular (Matoo y Suttle, 1991; Abeles *et al.*, 1992). Estos estudios indican que el ET podría inducir el desarrollo de los síntomas y la susceptibilidad general a la enfermedad.

El empleo de técnicas de alto rendimiento permite el descubrimiento de moléculas que interaccionan con la ruta de señalización del ET en la respuesta de las plantas frente a la infección por patógenos. Este es el caso de GLIP1, una lipasa secretada por las células de *A. thaliana* que actúa como molécula antimicrobiana inhibiendo directamente la infección por el hongo necrótrofo *A. brassicicola* (Oh *et al.*, 2005). La expresión del gen que codifica esta proteína se induce con la presencia de ET, pero no con JA o SA, lo que sugiere que GLIP1, junto con la ruta de transducción de señal del ET, puede ser un componente importante en la resistencia de *A. thaliana* frente a dicho patógeno.

Las plantas han desarrollado complejos mecanismos de regulación de la biosíntesis y percepción del ET que, además, interactúan a distintos niveles con otras hormonas vegetales (Bleecker y Kende, 2000; Guo y Ecker, 2004). La regulación de la biosíntesis de ET es consecuencia, entre otros factores, de la transcripción diferencial de los genes que codifican las enzimas implicadas en los dos últimos pasos de su biosíntesis, la ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), ambas codificadas por familias multigénicas (Wang *et al.*, 2002). Asimismo, la percepción del ET desencadena respuestas variadas que se evidencian con la regulación de la transcripción de distintos genes de respuesta a ET, en función del tipo de estrés y de la interacción con otras señales (Guo y Ecker, 2004) (véase una exposición más extensa en el apartado siguiente). La función del ET en la respuesta a la infección es compleja y de alguna forma controvertida, ya que, como se ha visto, en algunos casos contribuye al incremento de defensas y la resistencia de la planta, mientras que en otros casos promueve el desarrollo de la enfermedad (Thomma *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

Distintos estudios muestran que las rutas de señalización del SA, JA y ET no funcionan de modo independiente (McDowell y Dangl, 2000; Rojo *et al.*, 2003; Pozo *et al.*, 2004; Glazebrook, 2005). La respuesta de defensa de las plantas frente al ataque por microorganismos está regulada por una red de rutas de señalización que incluye al SA, JA y ET (Thomma *et al.*, 2001; Kunkel y Brooks, 2002). Este complejo mecanismo de regulación parece haber evolucionado para permitir a las plantas la activación de una respuesta precisa ante la presencia de un determinado patógeno. En general, la ruta de señalización mediada por SA actúa en respuesta a la infección por patógenos biótrofos, mientras que las rutas de señalización mediadas por ET y JA están implicadas en la respuesta a patógenos necrótrofos y al daño mecánico (Figura 1).

La función del **ácido abscísico (ABA)** es compleja y controvertida. Esta fitohormona está implicada en procesos como el desarrollo de la semilla, la germinación o la regulación de la apertura de estomas. El ABA también participa en las respuestas a diferentes estreses abióticos, como son la sequía, las bajas temperaturas y el estrés osmótico (Seo y Koshiba, 2002; Zhu, 2002). A parte de los estudios realizados sobre la implicación de esta hormona en la respuesta a estrés abiótico, cada vez existen más evidencias que relacionan al ABA con la respuesta frente al ataque por patógenos y con la existencia de un solapamiento entre la tolerancia al estrés abiótico y la resistencia a la enfermedad, integrando las diferentes redes de señalización de respuesta a estrés (Fujita *et al.*, 2006; Asselbergh *et al.*, 2008). En general, altas concentraciones de ABA implican mayor susceptibilidad de las plantas a la infección. Este efecto negativo parece ser debido a la interferencia del ABA con las rutas de señalización de estrés biótico reguladas por el SA, JA y ET al compartir componentes de las rutas de señalización. Distintos estudios en *A. thaliana* sugieren que el ABA interfiere indirectamente con las respuestas de defensa de la planta, siendo un regulador negativo de las mismas (Mohr y Cahill, 2003; Mauch-Mani y Mauch, 2005) (Figura 1). En tomate, mutantes deficientes en ABA aumentan la resistencia a la infección por *B. cinerea*, o a la bacteria *P. syringae* *pv.* *tomato* (Audenaert *et al.*, 2002; Mohr y Cahill, 2007; De Torres-Zabala *et al.*, 2007). Uno de los mecanismos por los que el ABA aumenta la susceptibilidad del tomate a *B. cinerea* parece consistir en la modulación negativa de las rutas de defensa mediadas por SA, ya que, al contrario de *A. thaliana*, la respuesta de defensa del tomate frente a

patógenos necrótrofos depende de las respuestas mediadas por SA y no por JA/ET.

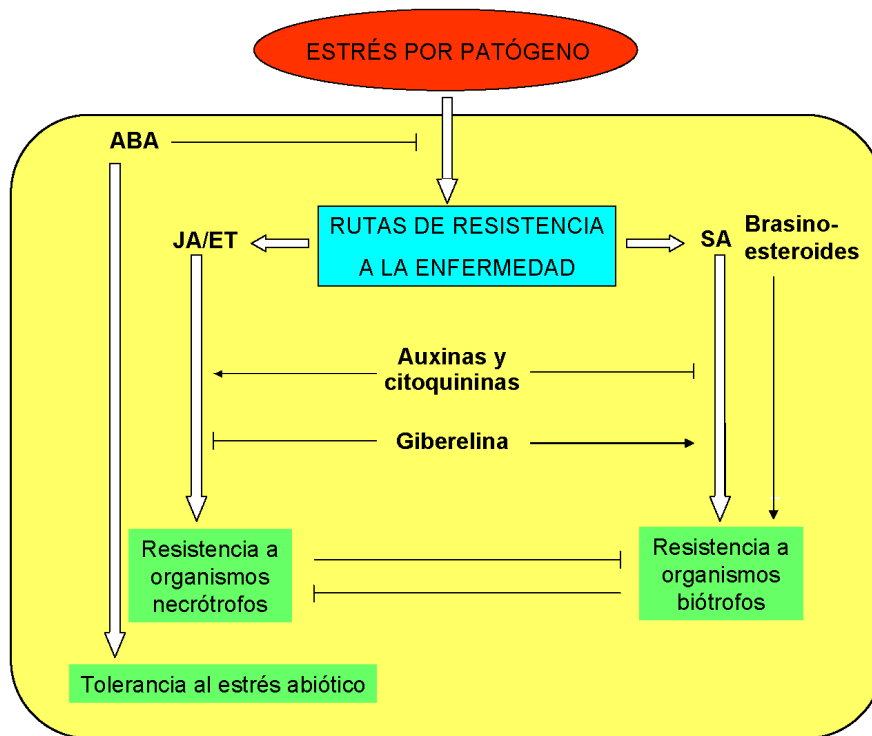


Figura 1. Modelo de interacción entre rutas de señalización hormonal durante la interacción planta-patógeno. Las flechas blancas indican rutas de señalización. Las flechas y barras negras indican inducción y represión respectivamente. ABA: ácido abscísico; JA: ácido jasmónico; ET: etileno; SA: ácido salicílico. Adaptado de Robert-Seilaniantz et al., 2007

Sin embargo, también existen ejemplos de una acción positiva del ABA en la resistencia a la enfermedad. El ABA permite la formación de una barrera física al desarrollo de patógeno, ya que se ha demostrado que es capaz de inhibir la transcripción de una β -1,3-glucanasa de la planta, responsable de la degradación de callosa (polímero de glucano), además de regular el transporte de moléculas relacionadas con la síntesis de este polímero (Rezzonico *et al.*, 1998; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Flors *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha comprobado que, en *A. thaliana*, niveles normales de ABA endógeno inhiben la biosíntesis de ET (LeNoble *et al.*, 2004), y las rutas de señalización de ABA y ET interaccionan sobre todo de modo antagonista en el desarrollo de la planta (Beaudoin *et al.*, 2000). El estudio de mutantes insensibles al ET o con sobreproducción de ABA llevan a la identificación del mismo gen: *ein2*. Este mutante es especialmente susceptible a patógenos, pero no está claro si es debido a la insensibilidad por ET y/o a la sobreproducción de ABA (Ghassemian *et al.*, 2000).

Cabe resaltar que ciertos patógenos pueden utilizar esta intrincada red de respuestas para aumentar la vulnerabilidad de la planta. Algunos organismos producen moléculas de señalización como ET y auxinas (Fukuda *et al.*, 1993; Lambrecht *et al.*, 2000), o generan compuestos miméticos de estas moléculas (Reymond y Farmer, 1998). Las interacciones entre el patógeno y la planta son complejas, y en algunos casos requieren que el patógeno además de adaptarse al ambiente de la planta, module la fisiología del hospedador (Boch *et al.*, 2002). Diferentes cepas de *Pseudomonas syringae* son capaces de producir compuestos adicionales que contribuyen en su virulencia, como exopolisacáridos, enzimas de degradación de la pared celular y hormonas vegetales. Se ha demostrado que la síntesis de estos compuestos por el patógeno, permite la modulación de determinados procesos de la planta y así se facilita su colonización (Gross y Cody, 1985).

Cada vez existen más evidencias sobre la implicación de otras hormonas en la interacción planta-patógeno. Existen estudios sobre la implicación en dicha interacción de las **auxinas** (Navarro *et al.*, 2006), las **citoquininas** (Jameson, 2000), las **giberelinas** (Hedden *et al.*, 2001), y los **brasinosteroides** (Krishna, 2003) (Figura 1). Estas hormonas vegetales están normalmente relacionadas con la regulación de procesos del crecimiento, del desarrollo de órganos o con las respuestas a distintos tipos de estrés, con un amplio efecto en la fisiología de la planta. Cuando una planta afronta un tipo de estrés, sufre una parada en su crecimiento. Este efecto puede ser debido a la implicación de las moléculas relacionadas con este proceso, en la respuesta a patógenos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

Las auxinas y citoquininas inducen la susceptibilidad a organismos biótrofos y la resistencia a necrótrofos (Jameson, 2000; Walters y

McRoberts, 2006). Varios estudios indican que ambos compuestos están relacionados con la supresión de la HR (Robinette y Matthysse, 1990; Murphy *et al.*, 1997). Las giberelinas tiene el comportamiento opuesto. Estas hormonas están implicadas en el crecimiento de la planta al inducir la degradación de unos reguladores negativos del crecimiento, las proteínas DELLA (Harberd, 2003). Estos autores sugieren que las DELLAs inducen en las plantas la resistencia a organismos necrótrofos y la susceptibilidad a biótrosos, en parte por la modulación del balance entre las rutas de señalización mediadas por SA y JA/ET. Los brasinoesteroides parecen estar implicados en la resistencia a organismos biótrosos pero por un mecanismo independiente del SA (Nakashita *et al.*, 2003).

Especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico.

La producción de **especies reactivas de oxígeno (ROS)** es una de las respuestas más tempranas de la planta tras el reconocimiento de un patógeno. Este proceso se inicia durante los primeros minutos, dando lugar a la llamada explosión oxidativa (“oxidative burst”) en las células infectadas y en las células adyacentes (Mehdy, 1994; Wojtaszek, 1997; De Gara *et al.*, 2003).

Las ROS tienen una actividad antimicrobiana directa, pero también pueden producir un aumento de la resistencia estructural de las paredes celulares por entrecruzamiento oxidativo de sus componentes, o actuar como señales para la activación de genes de defensa en las células circundantes (Levine *et al.*, 1994; Lamb y Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2006). La actuación de las ROS se produce mediante la interacción con otras rutas de señalización, especialmente las mediadas por SA y NO.

La presencia de un patógeno puede incrementar la producción de ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 se produce por la actividad de NADPH oxidasas y peroxidasas, y puede ser directamente tóxico frente a los patógenos. En presencia de Fe, el H_2O_2 libera radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) altamente reactivos. También se sabe que el H_2O_2 puede contribuir al reforzamiento estructural de las paredes celulares de la planta por oxidación y entrecruzamiento de glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina (HRGPs). Además, el H_2O_2 actúa en la síntesis de compuestos fenólicos como ligninas y suberinas por acción de la peroxidasa (POX). El H_2O_2 es eliminado de las células por conversión en H_2O y O_2 , debido a la acción de las enzimas catalasa (CAT), ascorbato

peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (GR). Las ROS actúan como intermediarios inductores de la síntesis de fitoalexinas. Se ha descrito en varias especies de plantas que la aplicación de superóxido dismutasa exógena inhibe tanto la síntesis de $O_2^{\bullet-}$ como la acumulación de fitoalexinas (Apostol *et al.*, 1989). Además, la aplicación de H_2O_2 o la exposición a un sistema de producción de ROS, como la xantina oxidasa, estimula la acumulación de fitoalexinas en ausencia de elicitores (Apostol *et al.*, 1989).

El **NO** es un potenciador de la muerte celular mediada por ROS, ya que tiene la capacidad de inhibir la acción de las enzimas CAT y APX, promoviendo la respuesta hipersensible (Delledonne *et al.*, 1998). Además, el NO tiene funciones relacionadas con la señalización de respuestas de defensa, que incluyen la inducción de genes de defensa, y en algunos casos similares a las que se encuentran en organismos animales (Klessig *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2002). Por ello, parece ser que el NO y las ROS tienen un papel sinérgico en la activación a tiempos cortos de un amplio repertorio de respuestas de defensa contra el ataque por patógenos (Delledonne *et al.*, 2001).

Barreras físicas a la infección.

La fortificación de las paredes celulares es un mecanismo para impedir la penetración de patógenos en las células de las plantas mediante la formación de una barrera física. Para ello, se produce la acumulación de callosa, que es un polímero de glucano, y de ligninas, formadas por la polimerización de compuestos fenólicos (Vance *et al.*, 1980). Además de hacer más resistentes a las paredes celulares, la **lignificación** tiene en las células de la planta otras funciones más específicas: hace que la zona de infección sea más difícil de ser degradada por las enzimas líticas del hongo y evita la difusión de enzimas y toxinas del hongo, y de agua y nutrientes de la planta. Además, los precursores fenólicos de la lignina y los radicales libres producidos durante la polimerización pueden inactivar enzimas, toxinas y elicitores del hongo; la hifa producida por el hongo es lignificada y pierde la elasticidad necesaria para su crecimiento. La deposición extracelular de HRGPs también contribuye a fortificar la pared celular. Las modificaciones de la pared celular, incluyendo la lignificación, pueden

retardar lo suficiente el desarrollo del hongo, mientras que las fitoalexinas y otros compuestos antimicrobianos van acumulándose hasta alcanzar concentraciones efectivas (Huckelhoven, 2007).

Metabolitos antimicrobianos.

Además de las moléculas implicadas en los procesos metabólicos básicos que forman parte del llamado metabolismo primario, la mayoría de las plantas poseen la capacidad de producir una gran variedad de **metabolitos secundarios**. Estas moléculas provienen fundamentalmente de compuestos del metabolismo primario por divergencia hacia diferentes rutas del metabolismo de isoprenoides, fenilpropanoides y alcaloides. Su origen se debe en parte a un proceso evolutivo para la adquisición de nuevas defensas contra el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros (Dixon, 2001). Existen diferentes clases de compuestos secundarios con actividad antimicrobiana, que pueden ser pre-existentes o inducidos como consecuencia del ataque por patógenos o insectos (Figura 2).

De forma general, se denominan **fitoalexinas** a los compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se producen como respuesta a la infección por patógenos o en respuesta a varios elicitores abióticos (Darvill y Albersheim, 1984). Las fitoalexinas, por tanto, se consideran moléculas de respuesta general a condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico. Algunos de estos compuestos se producen de forma constitutiva y se consideran inhibidores preformados o inhibidores pasivos. Otros se producen como respuesta a la entrada de patógenos y se consideran como parte de la respuesta de defensa activa (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). La defensa preformada implica la presencia en tejidos sanos de compuestos de bajo peso molecular cuya actividad supone protección contra la infección. Estas moléculas están consideradas como barreras antimicrobianas constitutivas que actúan directamente sobre factores de patogenicidad del microorganismo. Varios estudios han comprobado que diferentes compuestos preformados antifúngicos presentes en tejidos de plantas sanas, pueden ser posteriormente inducidos en el hospedador por la presencia o ataque del patógeno, así como por respuesta a otros estreses (Smith, 1996). La inducción de estos

compuestos se puede producir tanto en las células donde ya está presente como en células adyacentes.

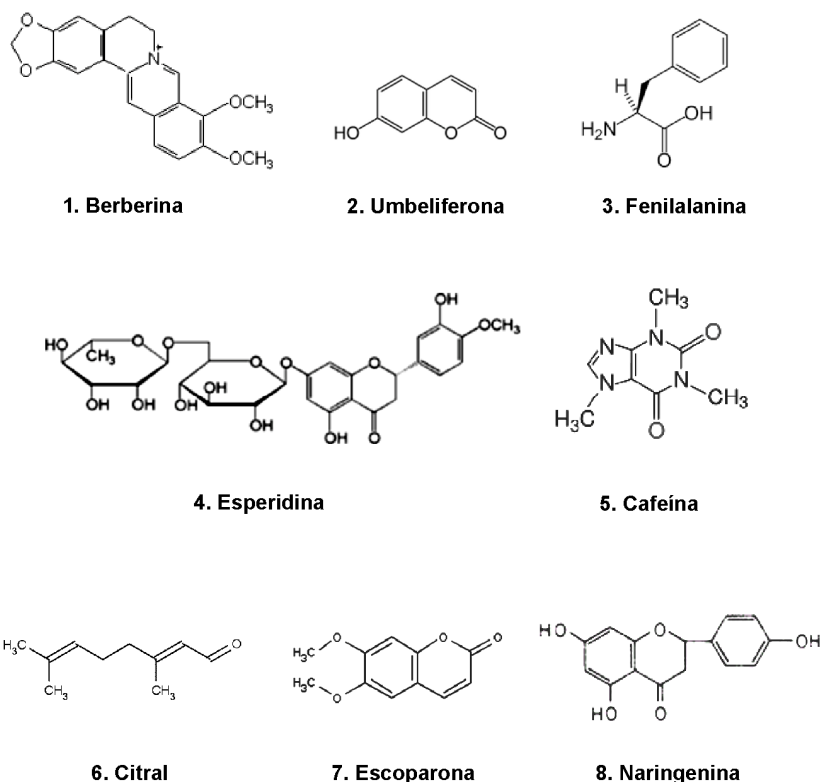


Figura 2. Estructura de algunos compuestos de interés en la respuesta de las plantas a la infección.

Un tipo paradigmático de fitoalexinas son las derivadas de fenilpropanoides, que incluyen flavonoides, isoflavonoides, o estilbenos. Se ha demostrado que la expresión heteróloga del gen de la estilbeno sintasa de vid en tabaco, da lugar a la producción en esta planta de resveratrol, lo que supone una mayor resistencia a *B. cinerea*, gracias a la síntesis de este compuesto (Hain *et al.*, 1993). Los fenilpropanoides se sintetizan a partir de la fenilalanina, y su transformación en ácido cinámico por la actuación de la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Dixon *et al.*, 2002). Se ha observado que plantas de tabaco que sobre-expresan el gen *PAL* son

menos sensibles a la infección por el hongo *Cercospora nicotianae* (Shadle *et al.*, 2003).

Otra clase relevante de fitoalexinas son los alcaloides (Facchini, 2001). Éstos son compuestos de bajo peso molecular que contienen N y que se han encontrado en al menos el 20% de las plantas. La mayoría de los alcaloides conocidos están relacionados con la defensa de las plantas a herbívoros y patógenos, aunque también se les ha otorgado otras funciones como reguladores del crecimiento y detoxificadores (Wink, 1998). A su vez, existen distintos grupos de alcaloides de acuerdo con los metabolitos de los cuales derivan. Los alcaloides terpenoides indólicos (TIA, "terpenoid indol alkaloids"), provienen de la condensación de la secologanina con triptamina, dando lugar a un tetrahydro- β -carbonilo. Incluyen más de 3.000 compuestos, algunos de los cuales parecen estar implicados en la defensa de las plantas a los patógenos. Por ejemplo, se ha confirmado la actividad antifúngica del glucoalcaloide strictosidina aislado de *Catharanthus roseus*, y de la aglicona obtenida a partir de él por acción de la enzima strictosidina glucosidasa (Luijendijk *et al.*, 1996). Los alcaloides benzilisoquinólicos (BIA, "benzylisoquinoline alkaloids") son otro grupo de alcaloides con más de 2.500 compuestos. Todos ellos provienen de la tirosina, que en los primeros pasos y por un entramado de descarboxilaciones, ortohidroxilaciones y desaminaciones se transforma en dopamina e hidroxifenilacetaldehído. La actividad antimicrobiana de algunos de estos compuestos, como la sanguinarina, sugiere su implicación en la protección contra patógenos. Algunos estudios demuestran que los BIAs berberina, sanguinarina y palmatina pueden estar implicados en la defensa química frente a herbívoros y patógenos (Schmeller *et al.*, 1997). Por otro lado, la morfina, la colchicina y la tubocurarina son otros BIAs que parecen actuar como repelente de herbívoros. Los alcaloides tropano (TPA, "tropane alkaloids") se sintetizan a partir de la arginina o de la ornitina, que se transforman en putrescina, y del que derivan todos los TPAs. Estos alcaloides son abundantes en la familia de las solanáceas, e incluye a la cocaína y otras drogas anticolinérgicas, como la atropina y escopolamina. Los alcaloides derivados de purina, como la cafeína, la teobromina y la teacrina son una serie de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

El tercer gran grupo de fitoalexinas lo constituyen los terpenoides, isoprenoides derivados del acetyl-CoA a través del monómero de isopentenil difosfato (IPP). Entre los isoprenoides se encuentran

metabolitos primarios que son esenciales para el desarrollo de la planta, como los esteroides, carotenoides y reguladores del crecimiento, y metabolitos secundarios, como determinados monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos, variables entre especies y relacionados con la interacción entre la planta y el medio ambiente (Chappell, 1995). Varios patógenos y elicitores son capaces de inducir la expresión de genes que codifican enzimas clave en la síntesis de estas fitoalexinas, como es la sesquiterpeno ciclasa (Mercke *et al.*, 1999). Durante la interacción planta-patógeno se han descrito un aumento de la síntesis de determinados terpenoides, como la risitina, lubimina, y fitoberina en la patata y capsidiol, glutinisona y vetispiradieno en tabaco (Tarchevsky, 2001). Además, existen varias fitoalexinas terpenoides de naturaleza volátil (Hopke *et al.*, 1994). La emisión de estos compuestos volátiles puede evitar la infección por patógenos antes de que éstos contacten con la planta.

Proteínas relacionadas con patogénesis (PR).

El ataque por patógenos induce la expresión de genes implicados en la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis o **proteínas PR** ("patogénesis-related proteins"). Estas proteínas, intra y extracelulares, son inducidas por la planta como respuesta a diferentes tipos de estrés y cumplen un papel importante en la respuesta de defensa frente a patógenos (Van Loon *et al.*, 2006b). Existen hasta 17 grupos diferentes de proteínas PR, numerados desde PR-1 y agrupados según sus propiedades bioquímicas y biológicas. Entre ellas se encuentran glucanohidrolasas, como quitinasas y β -1,3-glucanasas. Las quitinasas son enzimas presentes en bacterias, hongos, plantas y animales que hidrolizan el enlace β -1,4-entre residuos de N-acetilglucosamina de la quitina, un polisacárido de la pared celular de los hongos. Las β -1,3-glucanasas son enzimas presentes en muchas especies de plantas capaces de degradar la pared celular de hongos y también de liberar oligosacáridos que pueden actuar induciendo los mecanismos de respuesta de las plantas al ataque por patógenos (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Las peroxidasas (POX) son otro grupo de proteínas PR, de naturaleza glicoproteica, capaces de catalizar la oxidación de muchos compuestos orgánicos e inorgánicos. Las defensinas son péptidos de pequeño tamaño relacionados con la inhibición del crecimiento de hongos (Thomma *et al.*, 2002b). Se han descrito hasta 317

genes que codifican proteínas tipo defensina en *A. thaliana* (Silverstein *et al.*, 2005). La mayoría de los grupos de proteínas PR muestran acción antimicrobiana directa contra diferentes tipos de hongos y bacterias, destacando β -1,3-glucanasas (PR-2), quitinasas (PR-3), taumatinas (PR-5), defensinas (PR-12) o proteínas de transferencia de lípidos (PR-14) (Chakravarthy *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 2003). Se ha demostrado la actividad antimicrobiana *in vitro* de estas PR, pero en algunos casos está por determinar la implicación de la misma en la interacción planta-patógeno.

Proteínas extracelulares.

Por último, cabe mencionar la actuación de otras **proteínas extracelulares**, como las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PGIPs). Estas proteínas inhiben a una subclase específica de enzimas degradadores de pared celular, típicas de patógenos necrótrofos, llamadas poligalacturonasas (PGs). Las PGIPs posiblemente retardan la acción de las PGs a la vez que inducen el aumento en los niveles de oligogalacturónidos, los cuales activan respuestas de defensa adicionales en la planta (Howell y Davis, 2005).

1.3. Etileno: biosíntesis y ruta de señalización

Biosíntesis de etileno

En plantas superiores el ET se produce a partir del aminoácido metionina, que es convertido a S-adenosil-metionina (SAM) por la enzima SAM-sintetasa (Figura 3). La SAM es el donador de grupos metilo más importante en las plantas, estando implicado en reacciones de metilación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Fontecave *et al.*, 2004). La SAM es el sustrato de la enzima ACC sintasa (ACS), que cataliza su conversión en 5'-metil-tioadenosina (MTA) y en el aminoácido no proteico ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del ET. El MTA puede destinarse a la regeneración de metionina a través del llamado ciclo de Yang. Finalmente el ACC es oxidado por la enzima ACC oxidasa (ACO) para formar ET, cianuro de hidrógeno (HCN) y dióxido de carbono (CO₂).

La conversión de SAM a ACC es el primer paso específico en la síntesis de ET, y, en general, es el paso limitante en la biosíntesis de esta hormona (Wang *et al.*, 2002).

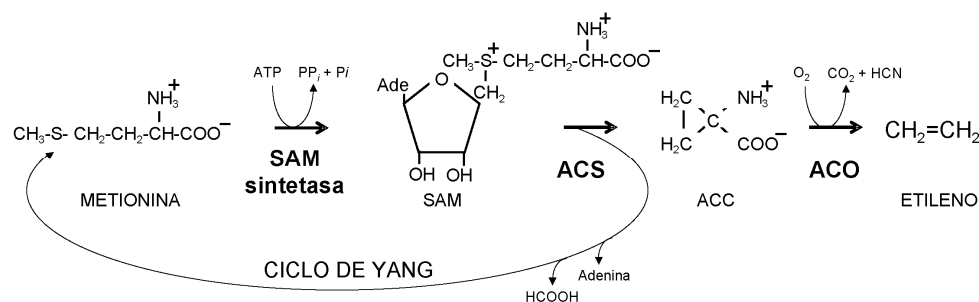


Figura 3. Ruta de biosíntesis de etileno. Abreviaturas: ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ACO, ACC oxidasa; ACS, ACC sintasa; SAM, S-adenosil-metionina.

La enzima SAM sintetasa está implicada en muchas otras rutas metabólicas a parte de la biosíntesis de ET (Ravanel *et al.*, 1998). Hasta el momento no se ha observado inducción de ninguna SAM sintetasa debido al ataque de patógenos o estreses abióticos. El estudio de los genes que codifican ACO en *A. thaliana* ha demostrado su regulación diferencial en respuesta al estrés biótico y abiótico (Wang *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2004), sugiriendo que su control transcripcional contribuye a la regulación en la producción de ET. Sin embargo, la regulación de la producción de ET está relacionada fundamentalmente con el control transcripcional de las ACS como se indica a continuación. La ACS está también codificada por una amplia familia multigénica en plantas (Johnson y Ecker, 1998; Bleecker y Kende, 2000). Debido a su importante función en la síntesis de ET, la regulación de ACS ha sido muy estudiada. Hay estudios que han demostrado la importancia de la transcripción diferencial de varios miembros de la familia de genes de ACS en la regulación de la producción de ET en respuesta a diferentes estímulos (Barry *et al.*, 2000). Además, la regulación post-transcripcional de las proteínas ACS es un punto de control fundamental en la producción de ET (Chae y Kieber, 2005).

Ruta de señalización del etileno

El ET producido tanto por estímulos internos o externos es percibido por la célula, y esta señal es seguidamente transmitida a través de una única cascada de señalización bien conservada (Guo y Ecker, 2004; Alonso y Stepanova, 2004) (Figura 4).

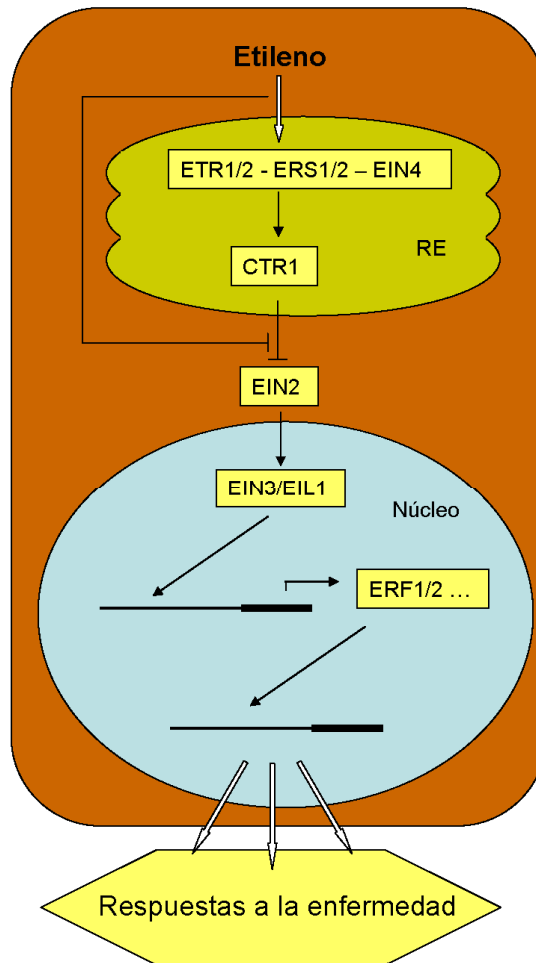


Figura 4. Esquema simplificado de la ruta de señalización de etileno. Las flechas y líneas cortadas indican regulación positiva y negativa respectivamente. Las flechas blancas indican la dirección de la ruta. Las proteínas están representadas por cuadrados. Adaptado de Broekaert *et al* 2006

En *A. thaliana* existen cinco receptores celulares de ET (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4), que comparten una región de secuencia conservada en la zona N-terminal, que se ha demostrado estar implicada en la unión con ET, al menos en ETR1 y ESR1 (Hall *et al.*, 2000). Estos receptores regulan negativamente la respuesta a ET y en ausencia de la hormona se unen a CTR1, el regulador negativo de la respuesta, manteniéndolo en una conformación activa de inhibición (Gao *et al.*, 2003). La mutación *ctr1* presenta de forma constitutiva el fenotipo de triple respuesta a ET (“Constitutive Triple Response”). La presencia de ET supone el desbloqueo de la represión causada por CTR1 y, por tanto, permite que se desencadenen las respuestas al ET.

Una de las herramientas disponibles en la actualidad para estudiar los efectos del ET consiste en la utilización de agentes inhibidores de su biosíntesis y/o de su percepción. Entre estos agentes destaca el 1-metilciclopropeno (1-MCP). El 1-MCP produce inhibición de la percepción del ET porque se une covalentemente a sus receptores celulares, de modo que la hormona no puede ser detectada por la célula, y su efecto es anulado (Blankenship y Dole, 2003). Desde el descubrimiento del efecto del 1-MCP como inhibidor de la percepción del ET, se han escrito numerosos estudios acerca de su acción, aplicación y efecto. Este regulador del crecimiento de las plantas es una buena herramienta como estrategia alternativa para el estudio del papel del ET en las plantas.

El desbloqueo de EIN2 por CTR1 permite la activación de EIN3 y otros factores de transcripción semejantes como EIL1 (“EIN3-like transcription factors”, EIL). En ausencia de ET, las proteínas EIN3/EIL1 son degradadas a través de la ruta mediada por el proteasoma. El control en la concentración de EIN3/EIL modula el flujo de señal en los siguientes pasos de transducción. Los factores de transcripción EIN3/EIL reconocen sus dianas en los promotores de los genes de respuesta al ET, entre ellos factores de transcripción de respuesta al ET (ERF) que amplifican la señal (Guo y Ecker, 2004; Gutterson y Reuber, 2004). Secuencias de DNA promotoras como las cajas GCC están presentes en los promotores de genes inducibles por ET, como los que codifican proteínas PR. Un subconjunto de proteínas ERF actúan como represores de transcripción (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). El conjunto de las diferentes acciones específicas de los factores de transcripción ERF, que pueden actuar activando o reprimiendo determinados genes de respuesta a defensa, es la

causa de que se produzca una respuesta precisa según el tipo de estrés biótico percibido por la planta.

El ET comparte con JA y SA entrecruzamientos en sus rutas de señalización. Estudios en *A. thaliana* demuestran que este cruce de rutas debe ocurrir después de EIN3/EIL (Alonso y Stepanova, 2004; Thatcher *et al.*, 2005). Se ha demostrado una expresión diferencial de genes que codifican ERFs por aplicación de ET, JA y SA durante la respuesta a la infección por patógenos. Estos hechos parecen indicar que el cruce entre las rutas de las tres hormonas ocurre a nivel de las ERFs (Wang *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004). Las rutas de señalización mediada por ET y JA actúan regulando grupos comunes de genes implicados en las respuestas de defensa (Schenk *et al.*, 2000; Glazebrook *et al.*, 2003). Otros estudios confirman que las rutas del ET y JA actúan independientemente e incluso de modo antagonista respecto a las rutas dependientes de SA (Glazebrook *et al.*, 2003). Este hecho se observa en la interacción de la rutas de señalización entre la resistencia a organismos biótrofos controlada por SA y la resistencia a organismos necrótrofos controlada por JA/ET, que ha sido esquematizada en la Figura 1.

En *A. thaliana*, *ERF1* se induce durante la infección por ciertos hongos necrótrofos como *B. cinerea*. La infección de *A. thaliana* por *Plectosphaerella cucumerina* además de inducir la ruta de señalización mediada por SA, implica una sobreexpresión de *ERF1* activando la ruta de señalización del ET, lo que le confiere resistencia a este hongo necrótrofo (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Sin embargo, la infección de *A. thaliana* por *Pseudomonas syringae tomato* DC3000 induce la respuesta de defensa mediada por SA pero no afecta la expresión de *ERF1*. Además, en este caso, la sobreexpresión de *ERF1* reduce la tolerancia frente a este patógeno. Estos son dos casos donde se produce una interacción positiva y negativa entre las rutas mediadas por ET y SA, lo que sugiere que el sinergismo o antagonismo entre ambas hormonas depende del tipo de patógeno que infecta a la planta. Por otro lado, parece ser que los factores de transcripción ERFs de respuesta a ET actúan como conectores con otras rutas de transducción de señal relacionadas con diferentes estreses. Se ha observado que existen interacciones antagonistas entre componentes de la hormona de estrés abiótico ABA y las rutas de señalización del ET y JA que modulan la expresión génica en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Chen *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004).

El tratamiento con ET ha sido ampliamente descrito como potenciador tanto de susceptibilidad como de resistencia de la planta, dependiendo del tipo de interacción entre la planta y el patógeno. Por ejemplo, el tratamiento de las plantas con ET induce la resistencia al hongo *B. cinerea* (Diaz *et al.*, 2002), mientras que en otros casos, la exposición de las plantas a ET no tiene efecto o incluso conlleva una reducción del nivel de resistencia a diferentes patógenos (Brown y Hyoun, 1993). Varios estudios con diferentes patógenos de *A. thaliana* y otras plantas demuestran que los factores de transcripción ERF están implicados en la respuesta de defensa frente a diferentes patógenos, pero sus efectos sobre la resistencia a la enfermedad depende de la interacción específica entre la planta y el patógeno (Lawton *et al.*, 1994; Berrocal-Lobo y Molina, 2004).

1.4. Respuesta de los frutos frente a la infección.

Los mecanismos de defensa de las plantas no necesariamente se corresponden con los de sus frutos. Un estudio clásico demostró que la susceptibilidad a un mismo patógeno (*B. cinerea*) en plantas de distintas variedades de fresa no se correlacionaba con la susceptibilidad a la infección postcosecha de sus frutos (Dauveny y Pepin, 1977). Las presiones de selección natural que han dado lugar a los mecanismos de defensa de las partes vegetativas o de los frutos de una planta no necesariamente tienen que ser las mismas, debido a las diferentes funciones biológicas del fruto, ya que éste es un órgano destinado a su destrucción para permitir la dispersión de las semillas.

Los frutos son más susceptibles al ataque por patógenos después de su recolección debido fundamentalmente a dos aspectos relacionados con su maduración: la pérdida de la resistencia intrínseca que los protege durante el desarrollo en la planta, y el aumento en la cantidad de agua y nutrientes fácilmente asimilables. La degradación de los principales polisacáridos de la pared celular contribuye significativamente al reblandecimiento del fruto y al incremento de sus susceptibilidad frente a patógenos (Cantu *et al.*, 2008).

La cutícula constituye una barrera de los frutos a la penetración de microorganismos. Existen varios mecanismos por los que la cutícula supone un mecanismo de resistencia del fruto frente a patógenos;

haciendo al fruto más resistente a la rotura y, por tanto, a la entrada de patógenos de herida, proporcionando una resistencia mecánica a la penetración (Howard *et al.*, 1991), presentando moléculas con actividad antimicrobiana (Figura 2) (Huckelhoven, 2007), y previniendo la difusión de soluciones celulares (Martin, 1964). La producción de algún daño sobre ella o de cualquier tratamiento que altere la cutícula supone una mayor infección por patógenos (Elad y Evensen, 1995).

En general, los daños mecánicos producidos en los frutos durante la postcosecha se caracterizan por un aumento en la respiración y en la producción de ET. En respuesta a la herida en la corteza, el tejido es capaz de inducir la producción de compuestos fenólicos, como lignina y suberina, que actúan reforzando la pared celular y previniendo su degradación por enzimas de un posible patógeno (Mohan y Kolattukudy, 1990). La suberización de la zona herida supone la formación de una capa de compuestos fenólicos y alifáticos que actúan como un importante mecanismo de defensa. Además, como resultado de la herida, se induce la producción de fitoalexinas alrededor de la zona lesionada para prevenir del desarrollo de posibles patógenos.

La infección de los frutos por parte de microorganismos durante el periodo de almacenamiento postcosecha provoca una serie de cambios o alteraciones como resultado de la interacción entre la planta y el patógeno (Barkai-Golan, 2001). Algunos de estos cambios implican alteraciones fisiológicas, de expresión génica o de producción de proteínas, como son el aumento en la producción de ET, la estimulación de la actividad de enzimas respiratorias, la inducción de la actividad antioxidante, etc. También se producen cambios en los componentes celulares, como el aumento en las pectinas de la pared celular, y la alteración en el contenido de azúcares y ácidos orgánicos. Se ha descrito que muchos hongos tienen actividad poligalacturonasa con actividad pectolítica, pero además se ha observado que en ciertos casos el patógeno puede inducir la producción de estas enzimas por la planta (Barkai-Golan, 1986).

La infección puede, además, suponer la acumulación de compuestos de defensa de bajo peso molecular o estimular la sobreproducción de compuestos antimicrobianos preformados en la planta (Pedras *et al.*, 2000). Los frutos producen compuestos fenólicos de forma constitutiva, mientras que otros son formados por el fruto como respuesta a la penetración del patógeno (Kurosaki *et al.*, 1986; Nicholson y

Hammerschmidt, 1992). Aunque la acumulación de fitoalexinas en frutos no es exclusiva de la respuesta a la infección, éstas juegan un papel importante frente al ataque por patógenos. Un ejemplo es el estudio de la resistencia de bananas inmaduras a antracnosis, producida por *Colletotrichum musae* (Brown y Swinburne, 1980). La acción antifúngica en estos frutos ha sido atribuida a la acumulación de cinco fitoalexinas no presentes en frutos sanos.

Una vez ha penetrado el patógeno en el interior del fruto, su desarrollo depende muchas veces de la actividad de enzimas de degradación de pared celular, que son responsables de la muerte de la célula y de la liberación de nutrientes necesarios para su desarrollo. Por ello, la planta dispone de compuestos inhibidores de estas enzimas capaces de suprimir o reducir su actividad. Existen proteínas inhibidoras que actúan sobre la actividad de poligalacturonidasas de *B. cinerea* pero no afectan a la actividad de poligalacturonidasas endógenas de la pera (Abugoukh y Labavitch, 1983) y de la manzana (Yao *et al.*, 1995). Otros estudios muestran la correlación entre los niveles de epicatequina, compuesto polifenólico presente en la piel del aguacate, y la inhibición de la actividad de enzimas pectolíticas de *Colletotrichum gloeosporioides*, lo que sugiere que esta molécula contribuye a la quiescencia del hongo al inhibir la actividad de factores patogénicos (Ardi *et al.*, 1998).

Las ROS, como el $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y el OH^{\bullet} , afectan a muchos procesos celulares implicados en la interacción entre el patógeno y la planta (Baker y Orlandi, 1995). Un estudio en aguacate muestra como los frutos inmaduros, que contienen grandes cantidades de ROS, son más resistentes a las infecciones que los frutos maduros, cuyos niveles de ROS son muy inferiores (Beno-Moualem y Prusky, 2000). Además, la inoculación de frutos resistentes con *C. gloeosporioides* incrementó sus niveles de ROS, mientras que la inoculación de frutos sensibles al patógeno no tuvo el mismo efecto.

Respecto a la acción de proteínas PR en frutos, algunos autores sugieren que la estimulación y activación de proteínas PR en los frutos, mediante la adición de elicitores, puede conducir a la supresión de la enfermedad al potenciar la resistencia del fruto a la infección. Por ejemplo, estudios realizados sobre el fruto de la pimienta han mostrado cómo la aplicación de quitosano, un polímero de β -1,4-glucosamina presente en la

pared celular de muchos hongos supone la inducción de la actividad quitinasa, quitosanasa y β -1,3-glucanasa (El Ghaouth et al., 1994).

2. Podredumbres postcosecha de frutos cítricos.

Durante la manipulación y el almacenamiento postcosecha de los frutos cítricos se producen una serie de alteraciones que pueden suponer la pérdida de una parte importante de la producción anual. Los hongos son los principales patógenos de los frutos cítricos durante su conservación y comercialización. Aunque las pérdidas producidas por estos microorganismos son muy variables, se estima que las pérdidas habituales por podredumbres suponen entre el 3 y el 5% de las pérdidas anuales, pudiendo llegar hasta el 12% en años de condiciones climáticas desfavorables (Tuset, 1987; Tuset 1999).

2.1. Hongos fitopatógenos de frutos cítricos.

P. digitatum y *P. italicum* son los principales patógenos durante la postcosecha de frutos cítricos en nuestras zonas productoras (Figura 5). Otros hongos causantes de infección en frutos cítricos son *Geotrichum candidum*, especialmente importante después de estaciones húmedas prolongadas, *Alternaria citri*, cuya infección puede ocurrir sólo si el fruto ha sido herido o debilitado debido a condiciones de cultivo desfavorables, *C. gloeosporioides*, hongo causante de la antracnosis, *Rhizopus estolonifer*, *Phytophthora citrophthora*, *Cladosporium herbarum*, *B. cinerea* y *Phomopsis citri* (Agrios, 2007).

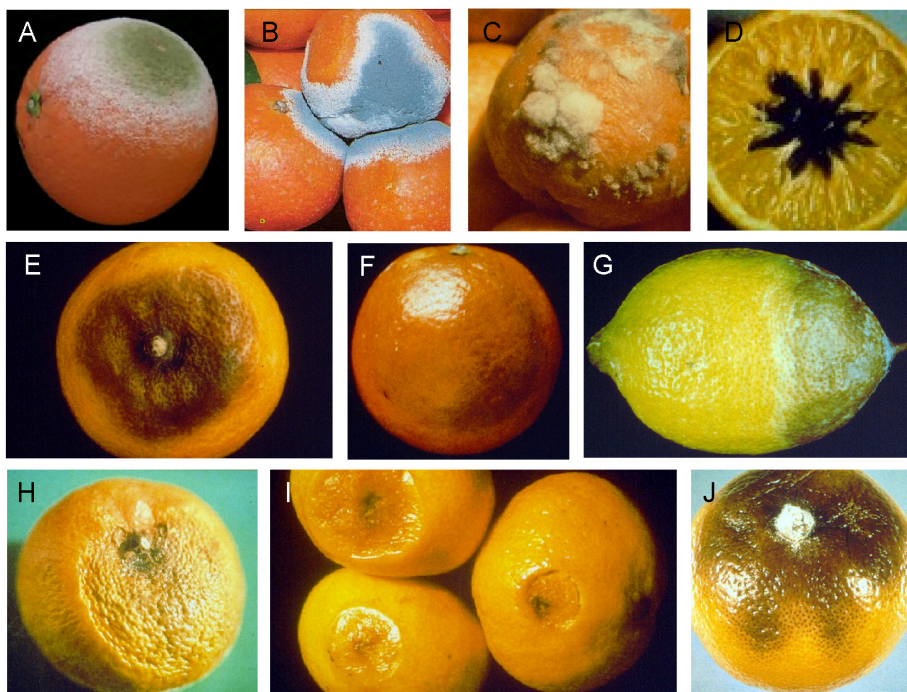


Figura 5 Síntomas sobre frutos cítricos de podredumbres postcosecha causadas por: A) *Penicillium digitatum*, B) *Penicillium italicum* C) *Botrytis cinerea*, D) *Alternaria citri*, E) *Colletotrichum gloeosporioides*, F) *Phytophthora* spp., G) *Diplodia natalensis*, H) *Phomopsis citri*, I) *Galactomyces citri-aurantii*, J) *Trichoderma viride*.

***P. digitatum* Sacc.** es el principal hongo patógeno de frutos cítricos, sobre los que produce la llamada podredumbre verde, siendo responsable de hasta el 80% de las pérdidas causadas por podredumbres postcosecha (Figura 5). Es un deuteromiceto u hongo imperfecto de fase sexual desconocida (Agris, 2007). Su forma de reproducción es mediante esporas asexuales, también llamadas conidios. Es específico de frutos cítricos, no descrito en otros sistemas vegetales. Es un patógeno de herida, por lo que necesita de pequeñas lesiones en la piel para penetrar en el tejido vegetal (Kavanagh y Wood, 1967). La contaminación de este hongo tiene lugar durante la recolección, confección, transporte y manipulación, aunque el inóculo mayoritario procede del campo (Tuset, 1987).

A pesar de su importancia, poco se conoce acerca de los mecanismos de patogénesis de *P. digitatum*. La inoculación con este hongo afecta considerablemente el contenido en ácido galacturónico en la piel (Achilea *et al.*, 1985a). Durante el proceso de infección, *P. digitatum* produce exo-poligalacturonasa que hidroliza la pectina de la pared celular formando monómeros de ácido galacturónico (Barmore y Brown, 1979). Además, el desarrollo del hongo induce la producción de ciertos metabolitos del fruto, como algunos monoterpenos, y otros compuestos volátiles del hongo que se liberan tanto durante la infección del fruto como en crecimiento *in vitro* (Ariza *et al.*, 2002). El agua no es un buen medio para la inducción de la germinación de *P. digitatum*, sin embargo los azúcares presentes en el zumo de fruta, glucosa, fructosa y sacarosa, estimulan su germinación (Pelser y Eckert, 1977). Además, la emisión de ciertos volátiles de la corteza del fruto también induce la germinación del hongo (Eckert y Ratnayake, 1994).

***P. italicum* Wehmer** es el segundo hongo fitopatógeno más importante en la postcosecha de frutos cítricos, causante de la podredumbre azul (Tuset, 1987). Además de infectar a frutos cítricos, *P. italicum* es capaz de atacar a otros frutos y vegetales. La temperatura óptima de crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum* es entre 20-27 °C. Sin embargo, *P. italicum* es capaz de desarrollarse a temperaturas próximas a los 5 °C, por lo que es especialmente importante durante la frigoconservación.

P. expansum no es patógeno de cítricos, sin embargo es el principal agente causal de podredumbres en fruta de pepita. Este hongo es causante de la podredumbre azul de manzanas. Además de producir múltiples pérdidas en frutas, *P. expansum* es uno de los mayores productores de patulina, toxina con intensa actividad antibiótica que puede estar presente en diferentes frutas, hortalizas, cereales enmohecidos y piensos (Bennett y Klich, 2003).

Geotrichum candidum es un patógeno de herida, y es el causante de la podredumbre amarga de frutos cítricos. Este hongo necesita una delgada capa de agua sobre la superficie del fruto para que se produzca la estimulación de la germinación. Junto con *Rhizopus stolonifer* representan una importante fuente de contaminación en las centrales hortofrutícolas.

P. citrophthora es el agente causante de la podredumbre marrón. Es un patógeno que penetra en el fruto cítrico cuando está todavía en el árbol. Durante la estación de lluvia, las zoosporas del hongo descienden desde el árbol al fruto y lo infectan. Si el hongo empieza a desarrollarse unos días antes de la recolección, los síntomas no son visibles durante la misma y se desarrollará en el almacenamiento pudiendo causar serios problemas e incluso comprometer la cosecha.

Otro tipo de infección quiescente es la antracnosis, causada por *C. gloeosporioides* en muchos frutos tropicales y subtropicales y en frutos cítricos (Brown, 1975). Los conidios se encuentran en la piel del fruto. En presencia de agua, las esporas germinan y forman el apresorio en el extremo del tubo germinal. Después de la cosecha, cuando el fruto comienza a madurar, la infección quiescente pasa a estado activo e inicia el desarrollo de la enfermedad.

A diferencia de los patógenos que actúan en el campo, la mayoría de patógenos de almacenamiento son incapaces de penetrar directamente a través de la cutícula o de la epidermis del fruto. Estos requieren la presencia de heridas o daños que faciliten su penetración. Este es el caso de los hongos *P. digitatum* y *P. italicum*, en los que la presencia de heridas junto a una humedad ambiental alta, pueden provocar el desarrollo de la infección durante el almacenamiento (Kavanagh y Wood, 1967). La inoculación del hongo sobre una herida suele acabar con el desarrollo de la infección. Si al penetrar el hongo contacta con una glándula de aceite del fruto maduro la infección se produce más fácilmente que si su inserción se produce entre glándulas. Esto no es así en el caso de frutos inmaduros. Se ha observado que la presencia de fitoalexinas, como el citral y otros compuestos antifúngicos, en las glándulas de aceite de limones inmaduros suponen una primera respuesta de defensa frente al ataque por patógenos (Rodov *et al.*, 1995). Los frutos que no han sido infectados durante la cosecha pueden hacerlo durante el almacenamiento a través del contacto con otros frutos ya infectados. Este método de infección es especialmente común en la podredumbre azul, pudiendo llegar a destruir cosechas enteras.

La alta humedad relativa necesaria para la prevención de la deshidratación y pérdida de peso de los frutos durante el almacenamiento estimula el desarrollo de patógenos indeseados. Es sabido que la acumulación de agua en la superficie de los cítricos estimula el desarrollo

de la podredumbre verde, por lo que un ligero secado del fruto podría reducir su susceptibilidad al podrido (Eckert, 1978).

2.2. Medidas de control de enfermedades en frutos cítricos.

Para el control de las enfermedades se pueden utilizar bien compuestos letales sobre patógenos (fungicidas y bactericidas) o compuestos que inhiben su crecimiento (fungistáticos y bacteriostáticos). Por otra parte, los tratamientos se pueden hacer previamente al cosechado o ya en postcosecha como parte de los tratamientos de lavado, confección, y conservación. Un ejemplo clásico de la eficacia de los **tratamientos precosecha** en cítricos es la pulverización de compuestos de cobre para prevenir el desarrollo de la podredumbre marrón (*P. citrophthora*) en la piel del fruto. La eficacia de estos tratamientos depende de su aplicación con respecto al estado de la infección. Debido a que la germinación de las esporas depende de la presencia de agua, los sprays deben ser aplicados antes de las lluvias (Timmer y Fucik, 1975). Para controlar los patógenos de herida, los tratamientos en el campo son generalmente menos efectivos que los tratamientos postcosecha. Sin embargo, los tratamientos precosecha son un buen medio de control cuando se producen daños considerables durante la recogida y los tratamientos postcosecha no se pueden realizar pronto (Eckert y Ogawa, 1985).

El control de los principales patógenos postcosecha de los frutos cítricos se realiza mediante el empleo de **fungicidas sintéticos**. Los derivados del benzimidazol: tiabendazol (TBZ), benomilo y carbendazima se empezaron a utilizar como fungicidas a finales de los años sesenta. Estos compuestos son activos frente a un amplio espectro de hongos patógenos, entre ellos *P. digitatum* y *P. italicum*. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la tubulina del citoesqueleto, previniendo su polimerización y la elongación de los microtúbulos, e interfiriendo en los procesos de división y movimiento celular (Davidse, 1986). El problema más importante de estos compuestos es que el uso continuado provoca la aparición de cepas resistentes (Kinay *et al.*, 2007). Este es el caso de *P. digitatum* y *P. italicum* en frutos cítricos, lo que ha hecho que su eficacia sea cada vez menor. Otros fungicidas introducidos a finales de los setenta son los derivados del imidazol, como el imazalil (IMZ) y el prochloraz. Estos compuestos inhiben la biosíntesis del ergosterol, componente esencial de la membrana celular de los hongos. Son fungicidas con

espectro de acción similar al de los benzimidazoles, siendo eficaces en el control de la podredumbre verde y azul, incluso para aislados que son resistentes a otros fungicidas, como TBZ, benomilo, etc. (Eckert y Ogawa, 1985).

A pesar de su efectividad, el empleo de fungicidas conlleva una serie de problemas; su uso continuado supone la aparición de cepas resistentes, el espectro de acción de los fungicidas utilizados es limitado, y además, el uso de ciertos fungicidas en frutos y vegetales no procesados y de consumo en fresco puede causar toxicidad. Todo ello, junto con el aumento del interés de los consumidores en aspectos relacionados con la salud y el medio ambiente han motivado la creación de una legislación más estricta respecto a la utilización de fungicidas y los residuos tóxicos presentes en los productos hortofrutícolas.

Existen varias **estrategias alternativas** al empleo de los fungicidas, que permiten reducir el desarrollo de las enfermedades postcosecha. Estos tratamientos se clasifican según su naturaleza en físicos, químicos o biológicos. Entre los tratamientos físicos, la aplicación de calor es un método efectivo para el control de frutos cítricos, mediante inmersión de los frutos en baños de agua caliente o corrientes de aire caliente en el interior de cámaras (Lurie, 1998). El efecto del tratamiento térmico se basa por un lado en una actuación directa sobre el desarrollo del patógeno (Schirra *et al.*, 2000), y por otro lado en una activación de diversos mecanismos de defensa de los cítricos, como la síntesis de proteínas relacionadas con defensa o la formación de compuestos antifúngicos (Pavoncello *et al.*, 2001). En general, para el control del desarrollo de patógenos se requieren unas temperaturas de almacenamiento entre 4 y 7 °C. Sin embargo, varios frutos cítricos como pomelos, limones o ciertos híbridos, son sensibles a las bajas temperaturas y desarrollan heridas por frío. Estos frutos sensibles al frío deben ser mantenidos a mayores temperaturas. Mediante el tratamiento de curado, consistente en un mantenimiento a 37 °C durante 3 días a alta humedad relativa, se puede retrasar los “daños por frío” de los frutos que se mantienen almacenados a bajas temperaturas (Lafuente *et al.*, 1997). La aplicación de luz UV puede evitar el deterioro de frutos actuando directamente sobre las esporas y las hifas de los hongos. Además, este tratamiento induce respuestas de defensa en los frutos, como la síntesis de fitoalexinas (Kim *et al.*, 1991b; Rodov *et al.*, 1992). Sin embargo, su aplicación está limitada por la tolerancia del fruto a la radiación. Por ello la combinación de las

radiaciones con otros tratamientos físicos permite reducir la dosis de radiación y controlar eficazmente el efecto de los patógenos. En frutos cítricos infectados con *P. digitatum*, un tratamiento combinado de agua caliente (52 °C, 5 min) e irradiación gamma (0.5 kGy) retrasa la aparición de podredumbre verde entre 33-40 días (Barkai-Golan *et al.*, 1969).

Existen tratamientos químicos, como la aplicación de aditivos alimentarios, entre los que se incluyen sales inorgánicas como el bicarbonato sódico, el carbonato sódico o el cloruro de calcio (Smilanick *et al.*, 1999; Palou *et al.*, 2001), y sales orgánicas de benzoato sódico, sorbato potásico o acetato sódico. El tratamiento de frutos cítricos con baños en soluciones acuosas de estas sales ha permitido obtener niveles aceptables de control de las infecciones por *P. digitatum* y *P. italicum* (Smilanick *et al.*, 1999; Usall *et al.*, 1999; Palou *et al.*, 2001).

La aplicación de microorganismos antagonistas del patógeno postcosecha es un tratamiento biológico alternativo para el control de enfermedades, ya que reduce la incidencia a la infección. La competencia entre microorganismos es un proceso que ocurre de forma natural muy frecuentemente, siendo una de las razones principales por las que los cultivos están tan protegidos durante su cultivo (Andrews, 1992). Entre los mecanismos de acción de estos agentes de biocontrol se han propuesto la competición por el espacio y los nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis, la inducción de resistencia y la producción de enzimas líticas de pared celular (Arras, 1996; El-Ghaouth *et al.*, 2000; Bonaterra *et al.*, 2003; Poppe *et al.*, 2003). La acción de estos microorganismos puede potenciarse si éstos son aplicados junto con algunos métodos físicos o químicos como tratamientos térmicos y sales inorgánicas (Obagwu y Korsten, 2003; Plaza *et al.*, 2004; Mari *et al.*, 2007). *Candida famata* es capaz de reducir la podredumbre verde entre el 90-100% en frutos cítricos inoculados artificialmente, estimulando en ellos la producción de ciertas fitoalexinas, como la escoparona y la escopoletina, tanto en presencia como en ausencia del patógeno (Arras, 1996). Cuando el biocontrol es compatible con los fungicidas sintéticos la combinación de ambos supone una buena reducción de los niveles de fungicidas. *Candida sake* es un microorganismo efectivo para el control de la infección por *P. expansum* o *B. cinerea* en peras de la variedad 'Blanquilla', y su efecto se ve potenciado mediante el uso de Amonio-molibdato (Nunes *et al.*, 2002). La aplicación de la levadura antagonista *Pichia guilliermondii* en frutos cítricos en combinación con concentraciones bajas de tiabendazol reduce la

podredumbre verde a un nivel similar a la alcanzada con los máximos niveles permitidos del fungicida aplicado sólo (Droby *et al.*, 1993b).

Sin embargo, y hasta la fecha, no existen compuestos alternativos que puedan sustituir la eficacia de control conseguida con los fungicidas. Una solución intermedia es la combinación de fungicidas con tratamientos físicos o biológicos que permita mantener la efectividad de control con unas dosis menores de fungicida. Así, la aplicación de fungicidas en baños de agua caliente permite reducir la cantidad necesaria de fungicida (Lurie, 1998) Este proceso ha sido particularmente efectivo en el caso de frutos cítricos tratados con tiabendazol e imazalil (McDonald *et al.*, 1991). Otros compuestos, como dióxido de sulfuro, etanol o carbonato sódico también han sido aplicados en soluciones acuosas calientes (45 °C) para el control de la podredumbre verde (Smilanick *et al.*, 1995).

2.3. Respuestas de los frutos cítricos.

La corteza de los frutos cítricos está formada por dos capas, una más externa coloreada, llamada flavedo de aproximadamente 1,5 mm de espesor, y otra capa interna de color blanco más gruesa, llamada albedo. La inoculación con esporas de *P. digitatum* en heridas de menos de 2 mm. de profundidad generalmente tiene más dificultades de progresar y desarrollar la infección, lo que indica que el flavedo es un tejido más resistente a la infección (Kavanagh y Wood, 1967). Esta mayor resistencia del flavedo ha sido asociada con una mayor concentración de compuestos antifúngicos pre-existentes (Rodov *et al.*, 1995). Estos compuestos se localizan en los aceites esenciales presentes en las glándulas de la corteza del fruto. Así, se vio que limones inmaduros infectados en las glándulas eran más resistentes que los que eran infectados entre las glándulas, pero esta característica se perdía al madurar los frutos. Este hecho se correlacionó con la presencia del monoterpeno citral y las cumarinas o furanocumarinas limetina, isopimpinolina y 5-geranoxi-7-metoxicumarina en las glándulas de aceite de los frutos inmaduros. También parecen estar implicados otros mecanismos de defensa del fruto. Se ha detectado que en el flavedo, a diferencia del albedo, existe un potencial antioxidante debido a la acción de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), CAT, GR y APX que sugieren que el fruto es capaz de mantener una alta

concentración de H₂O₂ con actividad antimicrobiana en la primera barrera de la corteza (Ballester *et al.*, 2006).

El fruto es capaz de inducir la producción de metabolitos con potencial actividad antimicrobiana en respuesta a la infección por patógenos. La escoparona (6,7-dimetoxicumarina) es una fitoalexina presente en altas cantidades en limones inoculados con *P. digitatum* o frutos irradiados con luz U.V. (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). Los cambios en la concentración de escoparona se correlacionaron con la actividad antifúngica de extractos de los frutos (Kim *et al.*, 1991b). Tanto la escoparona como la escopoletina y la 7-geranoxicumarina son cumarinas que han sido aisladas en cítricos y presentan actividad antifúngica contra *P. digitatum* y *P. italicum* en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Angioni *et al.*, 1998). Otra cumarina, la umbeliferona (7-hidroxycumarina), es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de varios patógenos y está presente en el albedo de pomelos inmaduros. Su concentración aumenta en gran medida debido al proceso de infección por *P. digitatum* en frutos maduros, pero especialmente en frutos inmaduros, lo que sugiere que la umbeliferona está implicada en defensa (Afek *et al.*, 1999). Además de las cumarinas, los flavonoides son otro tipo de fenilpropanoides implicados en la respuesta de los frutos cítricos a la infección. Entre estos compuestos, se han estudiado la implicación de varias flavanonas y flavonas polimetoxiladas con la resistencia de los frutos cítricos frente al ataque por patógenos (Del Rio *et al.*, 1998; Arcas *et al.*, 2000; Ortuño *et al.*, 2006). Estos trabajos muestran cómo la adición de estos compuestos en medios de cultivo supone la reducción del crecimiento de hongos como *P. digitatum*, *P. citrophthora* y *Geotrichum sp.* Además, se ha observado que la infección con *P. citrophthora* produce un descenso de la cantidad de las flavononas hesperidina e isonaringina, pero sin embargo aumenta la de sus agliconas hesperitina y naringenina. Las polimetoxiflavonas sinensetina, nobiletina, tangeretina y heptametoxiflavona también aumentaron su concentración después de la infección, sugiriendo su implicación en la respuesta a la infección. Experimentos *in vitro* confirmaron la actividad antifúngica de estos compuestos (Del Rio *et al.*, 2004).

Los frutos cítricos, como el resto de frutos, aumentan la actividad respiratoria y la producción de ET después de sufrir una herida o la exposición a otros estreses, como bajas temperaturas, radiaciones gamma, o la invasión por patógenos. A principios de los años cuarenta se

hicieron los primeros estudios sobre el efecto de la infección por *P. digitatum* en el aumento de la tasa respiratoria y la producción de ET (Biale, 1940; Biale y Shepheid, 1941). El ET producido durante los primeros estadios del desarrollo de la infección proviene del fruto. Sin embargo, *P. digitatum* también es capaz de producir ET, aunque por una ruta de biosíntesis diferente al de la planta (Ilag y Curtis, 1968). Conforme avanza la infección, el incremento de su biomasa conlleva a que el hongo sea responsable de prácticamente la totalidad de la producción del ET en estadios más avanzados. (Achilea *et al.*, 1985a; Achilea *et al.*, 1985b). Posteriores estudios con otros hongos patógenos sobre frutos cítricos confirmaron este comportamiento. A semejanza de los hongos, algunas bacterias patógenas, como *Pseudomonas syringae*, también provocan aumento de la producción de ET en frutos cítricos (Cohen *et al.*, 1978).

El ET, aplicado de forma exógena, es capaz de inducir cambios en la expresión de genes y síntesis de proteínas en los frutos cítricos (Alonso *et al.*, 1992). La aplicación exógena de ET induce proteínas/genes potencialmente implicados en respuestas de defensa, algunos de los cuales también se inducen durante la infección por *P. digitatum* o como consecuencia de tratamientos que disminuyen la susceptibilidad frente a dicha infección (Mullins *et al.*, 2000; McCollum, 2000; Porat *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 2005), como es el caso de β -1,3-glucanasas, quitinasas o PAL. Además, el ET aumenta la acumulación de carotenoides (Stewart y Whitaker, 1972) e induce la degradación de clorofila (Purvis y Barmore, 1981) en frutos cítricos. Por ello, el tratamiento con ET es una práctica común en la industria de cítricos para producir el desverdizamiento de los frutos durante la postcosecha.

Como ya hemos visto, la PAL es un enzima clave en la biosíntesis de fenilpropanoides, fitoalexinas y lignina (Dixon y Paiva, 1995). La expresión del gen que codifica esta enzima está inducida en frutos cítricos durante el proceso de infección por *P. digitatum* en la zona próxima a la inoculación, sin embargo no se ha observado en frutos sanos (McCollum, 2000; Ballester *et al.*, 2006). Diversos autores sugieren que la infección de frutos cítricos con *P. digitatum* no supone un aumento de la actividad PAL en el fruto (Ismail y Brown, 1979; Poppe *et al.*, 2003). Estudios posteriores han mostrado que la infección por *P. digitatum* induce la expresión de PAL en la piel de frutos cítricos, pero, aunque hay un aumento de la actividad PAL, ésta aumenta en menor medida que la expresión del gen (Ballester, 2007). Estos resultados parecen sugerir la capacidad del hongo en inhibir

la actividad de PAL, como ya han propuesto otros autores (Ismail y Brown, 1979; Lisker *et al.*, 1983).

Por otro lado, en cítricos, tanto la actividad enzimática de PAL como la expresión génica del gen que la codifica parecen estar regulados positivamente por el ET (Lafuente *et al.*, 2001, Marcos *et al.*, 2005). Sin embargo, el bloqueo de la percepción del ET con 1-MCP reduce, pero no elimina, la transcripción de *PAL* durante la infección (Marcos *et al.*, 2005). De hecho, la aplicación de 1-MCP supone un descenso de la expresión de este gen sólo a tiempos largos. Este hecho sugiere que la inducción inicial de *PAL* no depende del ET, por lo tanto debe estar regulada por otros mecanismos, mientras que el ET induciría su expresión una vez la respuesta ha sido iniciada.

La infección por *P. digitatum*, la aplicación de agentes elicitors como la luz U.V., o la aplicación de ácido jasmónico supone la inducción de genes de determinadas proteínas PR o la acumulación de las mismas, entre ellas quitinasas, β -1,3-glucanasas y peroxidasas (Fajardo *et al.*, 1998; McCollum, 2000; Porat *et al.*, 2001) Diferentes elicitors, seguidos de infección por *P. digitatum*, producen la inducción de la expresión del gen *gnsI* que codifica una β -1,3-endoglucanasa implicada en la resistencia de frutos de *Citrus sinensis* frente al hongo (Porat *et al.*, 2002). El gen *chil*, que codifica una quitinasa, está muy inducido por varios tratamientos que promueven la respuesta de resistencia frente a *P. digitatum*. Estos tratamientos consistieron en la irradiación del fruto con luz U.V., el cepillado con agua caliente, la aplicación de ácido β -aminobutírico (BABA) y la aplicación de la levadura antagonista *Candida oleophilla* (Porat *et al.*, 2001). Otra quitinasa de frutos cítricos mostró inducción de la expresión debido al daño por la herida pero no aumentó su expresión a causa de la infección por *P. digitatum* (Marcos *et al.*, 2005).

Los estudios realizados mediante el tratamiento de frutos cítricos con 1-MCP, potente inhibidor de la percepción del ET, parecen contradictorios, ya que aunque en un caso el tratamiento continuo con el inhibidor parece no afectar la incidencia y velocidad de desarrollo de la infección en pomelos inoculados artificialmente con *P. digitatum* (Mullins *et al.*, 2000), en otros estudios parece que el pretratamiento con 1-MCP aumenta la incidencia de infecciones naturales (Porat *et al.*, 1999; Mullins *et al.*, 2000) o experimentales (Marcos *et al.*, 2005).

3. Herramientas genómicas en la caracterización de la interacción planta-patógeno.

El control de la expresión génica es uno de los mecanismos de regulación más importantes de la actividad biológica, para el mantenimiento de la actividad, desarrollo e interacción con el entorno de células y organismos. Durante varias décadas las técnicas para el estudio de los cambios en la acumulación de mRNA de un organismo permitían la determinación de la expresión de uno o pocos genes al mismo tiempo. Esto suponía una información muy limitada de los mecanismos globales que acontecen en el interior de la célula. En los últimos años se ha producido una revolución con la aplicación de herramientas de genómica funcional para la determinación de los cambios globales de expresión génica (Koltai y Volpin, 2003).

3.1. Desarrollo de proyectos de genómica funcional en plantas.

Existen varios proyectos de genómica en plantas modelo y en plantas de relevancia en agricultura, en los que está en marcha o ya se ha terminado la secuenciación de sus genomas. Entre estos cabe destacar los dedicados a *A. thaliana* (AGI, <http://www.arabidopsis.org>, http://www.genomenetwork.org/articles/04_00/what_makes_chart.shtml), (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), arroz ("The Rice Center" (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/intro.shtml>) (Yu *et al.*, 2002), tomate ("Tomato Center"; <http://www.sgn.cornell.edu>), Medicago ("Medicago truncatula Center"; <http://www.medicago.org>), plátano ("Banana Center" (<http://www.promusa.org>) y eucalipto ("Eucalipto Center"; http://www.agrf.org.au/future_initiatives.html). Al contrario de los genomas relativamente pequeños que están ya secuenciados o en vías de serlo, la secuenciación completa de plantas con grandes genomas, como la cebada (5.000 Mb) o el maíz (16.000 Mb), son más difíciles de abordar. Para estos casos, o en aquellos en los que no existe todavía un proyecto definido de secuenciación del genoma, una alternativa razonable consiste en el desarrollo de bases de datos de ESTs ("Expressed Sequence Tags"), con la que obtener de forma relativamente rápida una gran riqueza de información sobre secuencias génicas implicadas en procesos biológicos. Una EST es una secuencia de cDNA obtenida a partir de un mRNA del tejido de un organismo. Entre las colecciones de ESTs de plantas más

importantes, bien por su importancia agrícola o por su uso como planta modelo, están las de: *Glycine max* (soja), *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* (cebada), *A. thaliana*, *Triticum aestivum* (trigo), *Zea mays* (maíz), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Oryza sativa* (arroz), *Sorghum bicolor* (sorgo) y *Solanum tuberosum* (patata) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>).

La capacidad de obtener secuencias de genomas completos o bases de datos de ESTs a escala genómica, ha propiciado el desarrollo de técnicas de alto rendimiento para la monitorización simultánea de los cambios en la acumulación de miles de mRNAs distintos (el llamado transcriptoma de un organismo), lo que permite determinar aquellos genes cuya expresión se induce o reprime en unas condiciones determinadas. La metodología más extendida para ello se basa en la hibridación de ácidos nucleicos fijados en un soporte sólido, las denominadas matrices de DNA ("DNA arrays" o "chips" de DNA). Como resultado, a partir de los noventa se realizaron hibridaciones conteniendo varias decenas de genes de *A. thaliana* (Schena *et al.*, 1995). Gracias a la posibilidad de sintetizar matrices conteniendo miles de oligonucleótidos determinados, estos métodos pueden permitir el estudio rápido de genomas con decenas de miles de genes, como el de los humanos (Lockhart *et al.*, 1996). Esta tecnología no sólo proporciona información funcional sobre nuevos genes, además supone una potente herramienta para el estudio de la expresión génica global de un organismo, con muchas y muy importantes aplicaciones en el estudio de la biología de las plantas (Desprez *et al.*, 1998).

Las macro- y micromatrices de DNA son un elemento fundamental de la genómica funcional para el estudio de los cambios de expresión génica a escala global (Aharoni y Vorst, 2002). El poder de estos métodos radica en la miniaturización y automatización, que permite la obtención de resultados a gran escala. Hasta el momento, las principales aplicaciones de estas técnicas son el estudio de la expresión génica, así como la identificación y genotipado de mutaciones y polimorfismos.

Los estudios de hibridación con matrices de DNA han comenzado a aplicarse a diferentes aspectos de la interacción planta-patógeno. Por razones obvias, los primeros estudios de este tipo se han abordado en *A. thaliana*. En un ensayo se determinaron los cambios de expresión, de una selección de 2.375 genes, en respuesta a la infección con el hongo

patógeno incompatible *Alternaria brassicicola*, y a la exposición a diferentes moléculas de señalización relacionadas con defensa, como son el SA, MeJA o ET (Schenk *et al.*, 2000). A partir de esta limitada base de datos se identificaron genes con expresión diferencial en respuesta a cada tratamiento, pero también sorprendentemente un elevado número de genes co-regulados por SA, MeJA y ET, aportando nuevos datos sobre la interacción de las diferentes rutas de señalización en defensa, por ejemplo, sobre la coordinación entre las señalizaciones por SA y JA, que anteriormente se asumían como únicamente antagónicas. Estudios independientes también apuntan a una convergencia, en determinados aspectos, de la respuesta a patógenos y a otros estreses abióticos como el estrés hídrico, salino o de temperatura (Scheideler *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). Además, estos autores sugieren que las respuestas a diferentes patógenos pueden compartir ciertas características, ya que la infección de *A. thaliana* con una bacteria (*P. syriange*), un hongo (*B. cinerea*) y un virus (*Cauliflower mosaic virus*) activaban preferencialmente un cierto grupo de factores de transcripción comunes en todas las respuestas (Chen *et al.*, 2002).

En un trabajo relevante para nuestros resultados, el uso de una micromatriz de cDNA en *A. thaliana* formada por 13.000 ESTs permitió el estudio de los cambios del transcriptoma en la interacción incompatible con la bacteria *P. syriange* pv. *tomato* (Scheideler *et al.*, 2002). Se observó que la planta sufría un cambio masivo de expresión génica desde el metabolismo primario al metabolismo secundario relacionado con defensa durante las primeras 24 horas posteriores a la inoculación. Entre los genes con expresión diferencial se observaron varios que codifican enzimas metabólicos, proteínas de organización celular, proteínas de transducción de señal y proteínas implicadas en el control de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés. Estos cambios de expresión génica suponían importantes cambios en el metabolismo de la planta, algunos de los cuales no se sospechaba previamente que estuvieran relacionados con las respuestas de defensa. Hay que destacar que en el momento del estudio, en torno al 50% de los genes con expresión diferencial eran de función desconocida.

Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios de genómica funcional en plantas se han llevado a cabo en especies modelo como *A. thaliana* (Schena *et al.*, 1995; Girke *et al.*, 2000) y arroz (Yamamoto y Sasaki, 1997; Yuan *et al.*, 2001). Por este motivo, la gran cantidad de

información disponible en *A. thaliana* hace de ella la mejor herramienta para la anotación de la función de genes de plantas. Sin embargo, existe una conservación limitada en el repertorio de genes entre *A. thaliana* y otras especies (Mysore *et al.*, 2001; Brendel *et al.*, 2002). Este hecho sugiere que en algunos casos puede ser difícil establecer semejanzas entre genomas de especies divergentes, sobre todo en procesos en los que como acabamos de comentar, un gran número de genes permanecen sin función anotada. Además, muchos genes ortólogos no muestran los mismos patrones de expresión entre diferentes especies de plantas y, aunque tengan la misma función bioquímica, no es descartable que no estén relacionados con los mismos procesos. Sin embargo, y a pesar de estos inconvenientes, la mayoría de los estudios de alto rendimiento en fitopatología han usado *A. thaliana* como planta modelo. La tarea de analizar los cambios de expresión génica implicados en la interacción planta-patógeno sobre especies vegetales de interés agronómico es, desde luego, más complicada, pero también necesaria en vista de las particularidades de cada tipo de interacción planta-patógeno.

3.2. El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos

Debido a su interés económico, existen cada vez mayor número de laboratorios implicados en la realización de estudios de genómica funcional en plantas de interés económico más directo. Entre otros, hace unos años varios grupos valencianos se plantearon el inicio de un proyecto de genómica funcional de cítricos.

El "Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos" (CFGP) empezó en el año 2001 gracias a la financiación de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana y del Ministerio de Educación y Ciencia (Acciones estratégicas de genómica y proteómica), y en él participan diferentes grupos de investigación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA) (Forment *et al.*, 2005) ().

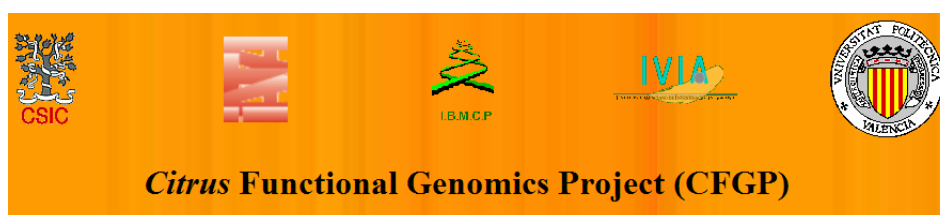


Figura 6. El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) “<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB>”.

El objetivo general cuando se concibió este proyecto era la caracterización del transcriptoma de cítricos, así como de sus cambios durante los procesos biológicos básicos (crecimiento y desarrollo de las partes vegetativas y reproductivas, desarrollo del fruto y maduración), o durante otros procesos de especial relevancia en citricultura que afectan a la producción y a la calidad del fruto (respuesta a estreses bióticos y abióticos, y procesos relacionados con el almacenamiento postcosecha de frutos). Se pretende, además, el desarrollo de nuevas herramientas genómicas para la caracterización de las diferentes variedades de cítricos y para la determinación de la función de los genes, con el fin de aumentar las capacidades científicas y tecnológicas para el desarrollo de la citricultura española.

Este objetivo general se desdobra en varios objetivos específicos, entre los que se encuentra, en primer lugar, la generación de una amplia colección de ESTs a partir de la construcción de bibliotecas de cDNA de diferentes tejidos y estados de desarrollo, así como en respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos, y en la que han participado todos los grupos del proyecto. La subsiguiente secuenciación de un número amplio de clones de cada una de las bibliotecas, así como su análisis bioinformático, anotación funcional y estructuración en una base de datos con la que se puede trabajar y extraer información vía Internet, han aportado herramientas de trabajo a escala genómica. Finalmente, con este material y herramientas se han diseñado y producido varias generaciones de micromatrices de cDNA, con las que abordar estudios de caracterización del transcriptoma.

Durante el tiempo que lleva en marcha el proyecto se han elaborado un total de 53 colecciones de cDNA, sustractivas y no sustractivas. A partir de ellas se han creado tres generaciones de micromatrices. La primera, denominada 7k, fue empleada durante el presente trabajo de tesis, y contiene un total de 12.672 ESTs agrupados en 6.333 unigenes provenientes de 18 bibliotecas de cDNA (Forment *et al.*, 2005). La segunda generación de micromatrices, denominada 12k o de segunda generación, fue creada posteriormente a la realización de este trabajo, elaborándose a partir de la mayoría de las 53 bibliotecas. En la actualidad ya está disponible una micromatriz de tercera generación, denominada 20k, que contiene la mayor parte de los genes de los cítricos.

‘Clementina de Nules’ (o ‘Clemenules’) (*Citrus clementina*) fue la variedad de cítrico escogida para la realización de la mayor parte de los estudios debido a su gran importancia económica. El grupo de cultivares de ‘Clementina’ es el más representativo en la industria española por su calidad y aceptación, y supone entre el 50 y 60% de las nuevas plantaciones de cítricos de los últimos 10 años. De ellos, más de la mitad corresponden a ‘Clemenules’.

El “Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha” del IATA contribuyó al CFGP con la elaboración de tres bibliotecas de cDNA diferentes: RindPdig24 es una colección de cDNAs obtenidos a partir de la corteza de mandarinas ‘Clemenules’ infectadas por el hongo *P. digitatum* a las 24 horas después de la inoculación. PostharvP1 es una colección de cDNAs, enriquecida en fragmentos de longitud completa, obtenidos a partir de la corteza de mandarinas ‘Clemenules’ heridas e inoculadas con agua o infectadas por el hongo *P. digitatum*, a las 8, 16 y 24 horas después de la inoculación. Ambas bibliotecas se realizaron dentro de esta tesis doctoral en el marco del proyecto “Estudio de las respuestas de los frutos cítricos a las bajas temperaturas de conservación y a la infección por *Penicillium* mediante genómica funcional” financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia en el marco de una acción estratégica de genómica. La realización de estas colecciones de cDNA y el análisis bioinformático de sus secuencias es uno de los objetivos de este trabajo (véase Objetivo 1). Por otro lado, FlavCurFr1 es una colección de cDNAs obtenidos a partir de la corteza de mandarinas ‘Fortune’ pretratadas a 37 °C y almacenadas posteriormente a 2 °C, realizada también en nuestro laboratorio en el marco de otra línea de trabajo del grupo. Adicionalmente, se incluyó en el CFGP secuencias pertenecientes a la biblioteca sustractiva RindPdigS,

realizada previamente en el “Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha” del IATA. Esta biblioteca de cDNA está enriquecida en EST que se expresan más abundantemente en la corteza de naranja Navelina (*Citrus sinensis L. Osbeck*) a las 24 h después de la inoculación por *P. digitatum* con respecto a un control de respuesta a herida mecánica. (Gonzalez-Candelas *et al.*, 2005). Las secuencias de esta colección se imprimieron en macromatrices para llevar a cabo otro de los objetivos de la tesis, el estudio de los cambios en la expresión génica de frutos cítricos frente al tratamiento con ET, la herida y la infección por *P. digitatum* (véase Objetivo 2).

OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca en la caracterización molecular de la interacción entre frutos cítricos y hongos fitopatógenos de postcosecha del género *Penicillium*, en especial de *Penicillium digitatum*, mediante el empleo de diferentes aproximaciones de genómica funcional.

El objetivo principal de este trabajo de tesis es identificar y caracterizar genes de frutos cítricos implicados en la respuesta a la infección por hongos del género *Penicillium*, y analizar el papel del ET como mediador de dicha respuesta. Este objetivo será abordado en varios objetivos específicos:

1. Generación de distintas colecciones de ESTs, procedentes de la corteza de frutos cítricos infectados por *P. digitatum*, y análisis de las secuencias de DNA de un número representativo de clones. Estos resultados se depositarán en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos, lo que contribuirá a la generación de micromatrices de DNA representativas del conjunto de clones obtenidos por el Proyecto.
2. Determinación y caracterización de los cambios globales en el transcriptoma de frutos cítricos asociados a la infección por *P. digitatum*, mediante el uso de macro- y micromatrices de DNA. Análisis detallado de la expresión en distintas condiciones de aquellos genes que sean identificados como relevantes.
3. Estudio de la implicación del ET en la susceptibilidad a la infección y en los cambios de la expresión génica en frutos cítricos asociados a la infección por *Penicillium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Organismos:

1.1. Material vegetal.

Para la realización de los diferentes experimentos se utilizaron las siguientes variedades de frutos cítricos: frutos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de la variedad 'Navelate' recolectados de un campo comercial de Liria (Figura 7, A). Frutos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de la variedad 'Navelina' procedentes de la cooperativa citrícola de Liria (Figura 7, B). Frutos de mandarina (*Citrus clementina*) de la variedad 'Clemenules'. Estos frutos maduros se recolectaron de varios campos comerciales de Liria (Figura 7, C).

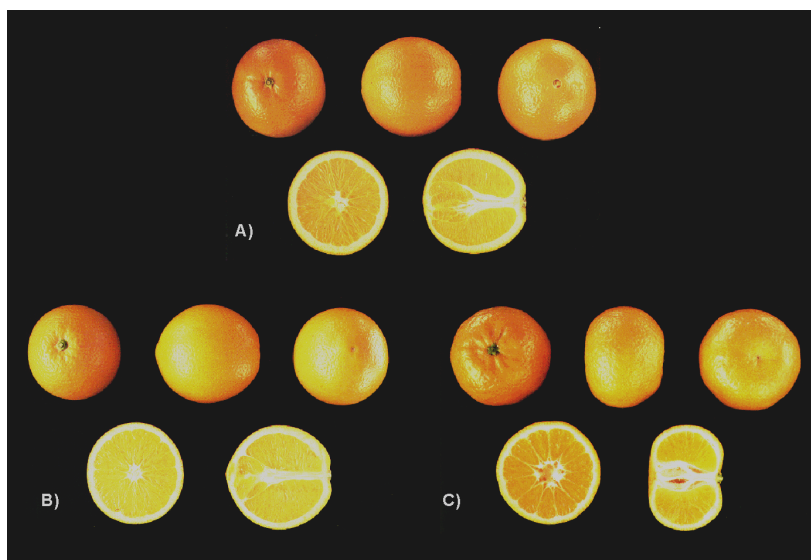


Figura 7. Variedades de frutos cítricos utilizados durante el trabajo de tesis. A) *Citrus sinensis* L. Osbeck de la variedad 'Navelate' B) *Citrus sinensis* L. Osbeck de la variedad 'Navelina'. C) *Citrus clementina* de la variedad 'Clemenules'.

Todos los frutos se procesaron en el mismo día de su recolección y no fueron sometidos a ningún tratamiento postcosecha. Se hizo una selección de aquellos frutos sanos que no presentaban daños visibles. Seguidamente se lavaron con una solución de lejía al 5% durante 5 min

para su desinfección, se enjuagaron con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente durante una noche.

1.2. Microorganismos.

Hongos.

Las infecciones se realizaron con el hongo *Penicillium digitatum* Sacc., agente causal de la podredumbre verde de cítricos (Figura 8). Se utilizó el aislado PHI-26, procedente de una naranja infectada, y aislado en nuestro laboratorio (Lopez-Garcia *et al.*, 2000).

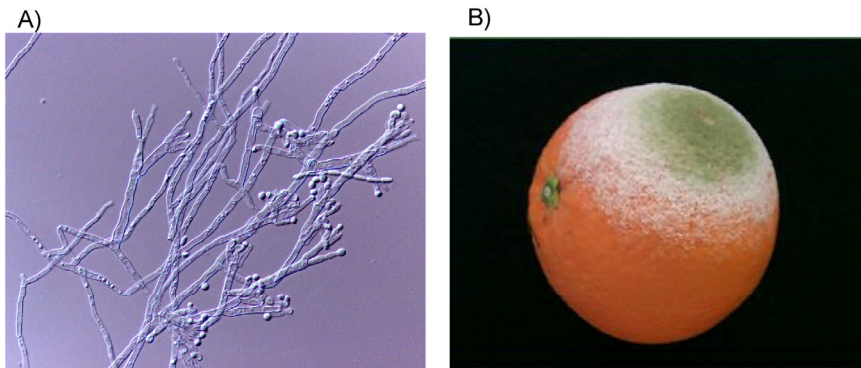


Figura 8. *Penicillium digitatum*. A) Visualización microscópica de un micelio de *P. digitatum*. (Microscopía óptica, contraste Nomarsky). B) Fruto cítrico infectado por *P. digitatum*.

Para el estudio comparativo de las respuestas a la infección de frutos cítricos con hongos patógenos y no patógenos se utilizaron además los siguientes aislados de hongos del género *Penicillium*, también obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Lopez-Garcia *et al.*, 2000; Lopez-Garcia *et al.*, 2003): aislado PHI-1 de *P. italicum* Wehmer, patógeno de cítricos, procedente de una naranja infectada; aislado PHI-8 de *Penicillium brevicompactum*, con pobre capacidad infectiva de frutos cítricos, obtenido a partir de una placa de contacto de la cooperativa hortofrutícola de La Poble de Vallbona que se aisló en nuestro laboratorio; aislado PHI-65 de *Penicillium expansum*, patógeno de frutos de pepita y

causante de la podredumbre azul de manzanas, obtenido a partir de un limón podrido y aislado en nuestro laboratorio.

Todos ellos fueron cultivados en placas Petri con medio de cultivo PDA (“agar de patata dextrosa”, Difco Laboratorios Inc.) a partir de muestras glicerinadas conservadas a -80 °C. Una vez sembrados se incubaron a 24 °C durante 7 días. Los conidios para cada experimento se obtuvieron el mismo día de la infección rascando la superficie del medio de cultivo con una espátula estéril. Se añadieron a un tubo con agua y se filtraron a través de lana de vidrio para eliminar las hifas y restos de agar. El recuento de conidios se realizó con un hematócitosmetro en un microscopio y se diluyeron hasta la concentración deseada.

Bacterias.

Escherichia coli XL1-Blue MRF (Stratagene): se utilizó para el empaquetamiento de los fagos Uni-ZAP XR en la construcción de la biblioteca de cDNA RindPdig24. *Escherichia coli* SOLR (Stratagene): se utilizó para la transfección de los fagésmidos pBluescript escindidos a partir de XL1-Blue MRF mediante el uso del fago “ayudante” “ExAssistant interference-resistant helper phage”. *Escherichia. coli* TOP10 (Invitrogen) se utilizó para la clonación de los plásmidos derivados de pENTRA durante la elaboración de la biblioteca de cDNA PostharvP1.

2. Inoculaciones y toma de muestra

2.1. Inoculaciones.

Para las infecciones de las mandarinas ‘Clemenules’ empleadas en la construcción de las bibliotecas de cDNA y la construcción e hibridación de las micromatrices se efectuaron 8 heridas por fruto en la zona ecuatorial de la corteza con un clavo de 2,5 mm de diámetro y 4 mm de longitud. La herida se inoculó con 10 µL de una suspensión de conidios del aislado PHI-26 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁶ conidios/mL. Los frutos se almacenaron en cámaras de conservación a 20 °C y una humedad relativa superior al 90%. Esta alta concentración del hongo se escogió para que el desarrollo de la infección fuese uniforme en todas las heridas.

En los diferentes experimentos sobre el estudio del desarrollo de la infección y producción de ET, se utilizaron mandarinas 'Clemenules' realizando cuatro heridas por fruto con un clavo de 2,5 mm de diámetro y 4 mm de longitud e inoculando 10 µL de una suspensión de conidios del aislado PHI-26 de *P digitatum* a una concentración de 5×10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 , conidios/mL según el experimento.

En el estudio comparativo con diferentes hongos patógenos y no patógenos, se infectaron 15 naranjas 'Navelate' por condición y se realizaron cuatro heridas por fruto con un clavo de 2,5 mm de diámetro y 5 mm de longitud e inocularon 10 µL de una suspensión de conidios de los aislados PHI-1, PHI-8, PHI-26 y PHI-65 del género *Penicillium* a una concentración de 10^6 conidios/mL.

Análisis estadístico.

Los datos de incidencia de la infección correspondieron al valor medio de tres réplicas de cinco frutos con cuatro heridas por fruto. El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico "Statgraphics Plus 5.1" (Manugistics, Inc.) aplicando el análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó un estudio de la homogeneidad de la varianza y, si ésta era homogénea, se empleó el test LSD, considerándose significativas diferencias de $p < 0,05$.

2.2. Toma de muestra.

Para la toma de muestra de frutos se extrajo tejido de la corteza con un sacabocados de 5 mm de diámetro centrado en el punto de la herida en los tratamientos de infección y herida, o en la zona ecuatorial en los tratamientos control, conteniendo tanto el flavedo, parte externa coloreada de los frutos cítricos, como el albedo, parte interna de la corteza, de color blanquecina y con amplios espacios intercelulares. Las muestras, dependiendo del experimento, se tomaron a las 0, 8, 16, 24 y 48 horas después de la inoculación. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se trituró con un molinillo hasta conseguir un polvo congelado. Seguidamente se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

3. Tratamientos y medida de etileno.

3.1. Tratamiento con etileno, 1-metilciclopropeno (1-MCP) y aire.

En algunos experimentos los frutos fueron pre-tratados con ET, 1-MCP o aire, con anterioridad a la inoculación. Estos tratamientos se llevaron a cabo a 20 °C durante 16 horas en jarras de vidrio de 25 L. (máximo 30 frutos/jarra). El ET fue inyectado hasta alcanzar una concentración de 10 ppm, a partir de una mezcla de calibración de Azethyl ($C_2H_4.N_2$). El 1-MCP fue liberado disolviendo la cantidad apropiada de Ethylbloc (1-MCP 0,43%) para obtener una concentración final de 100 ó 500 ppb según el experimento, en 2 mL de agua destilada calentada a 65 °C y colocándolo inmediatamente dentro de las jarras. Los tratamientos con aire se usaron como control de los experimentos tratando los frutos con aire atmosférico. En todos los casos se colocó hidróxido cálcico dentro de las jarras para absorber el CO_2 procedente de la respiración de los frutos. Después de los tratamientos los frutos se airearon durante 30-60 min.

3.2. Determinación de la producción de etileno y estudio del desarrollo de la infección.

Se hizo dos estudios sobre producción de ET. Por un lado se midió en frutos de mandarina 'Clemenules' intactos, heridos o infectados con *P. digitatum* a 10^6 conidios/mL. Por otro lado se midió la producción de ET en frutos de 'Clemenules' tratados con dos concentraciones de 1-MCP (100 ppb y 500 ppb) y en frutos tratados con aire, que posteriormente fueron infectados con *P. digitatum* (5×10^3 con/mL). A todos los frutos heridos e infectados se les practicó 4 heridas por fruto.

Los frutos se mantuvieron en cámara a 20 °C y 90% de humedad. A diferentes tiempos 15 frutos fueron introducidos de tres en tres en jarras de 1,6 L. y cerrados herméticamente. A las 3 horas se tomó muestra de los gases de las jarras con jeringuillas de 1 mL y se realizó un análisis visual del desarrollo de la infección sobre ellos.

El ET se determinó por cromatografía inyectando las muestras en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 3920 (Perkin Elmer, Norwalk, Conn., USA) con un detector de ionización de llama. Se utilizó una

columna de alúmina (óxido de aluminio activado) de 1 m de longitud y 2 mm de diámetro interno (Supelco, Barcelona), un flujo de gas portador (N₂) de 45 mL/min y una temperatura de columna, inyector y detector de 140 °C, 160 °C y 160 °C respectivamente. La concentración de ET se calculó a partir de la comparación entre la altura de los picos obtenidos con las diferentes muestras respecto al de un estándar de ET de concentración conocida (1,01 ppm), sustrayendo previamente el valor ambiental de muestras tomadas a partir de botes vacíos.



Figura 9. Estudio del desarrollo de la infección en frutos previamente pretratados en jarras.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de la producción de ET en frutos de 'Clemenules' tratados con dos concentraciones de 1-MCP e infectados con *P. digitatum* frente a frutos tratados con aire, se realizó utilizando el paquete estadístico 'Statgraphics Plus 5.1' (Manugistics, Inc.) aplicando el análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó un estudio de la homogeneidad de la varianza y, si ésta era homogénea, se empleó el test LSD, considerándose significativas diferencias de $p < 0,05$.

4. Purificación y cuantificación de RNA total y mRNA

4.1. Extracción de RNA total de tejido de naranja.

A partir de tejido de naranja triturado y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tomaron 2 g y se añadieron a una mezcla conteniendo 10 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8, sarcosyl 2% (p/v), polivinil pirrolidona 40 (PVP-40) 1% (p/v)), 5 mL de fenol y 100 μL de β -mercaptoetanol, previamente calentada durante 5 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se homogeneizó 1 min en politrón PT 45/80 (Kinematica AG, Littay-Lucerne) a velocidad media, y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Después de dejar enfriar en hielo se añadió 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v). El homogeneizado se centrifugó a 3.900 x g durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recogió la fase acuosa, se extrajo con 10 mL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1 v/v/v) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se recogió nuevamente la fase acuosa y se añadió 1,5 volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó y se centrifugó a 27.200 x g durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 5 mL de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó nuevamente a 27.200 x g durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante procurando no dejar restos de etanol. El precipitado resultante se resuspendió con 7,5 mL de TESa (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, sarkosyl 0,1% (p/v), pH 7,5) calentando a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitando hasta su completa disolución. Se añadió 7,5 mL de agua y se agitó de nuevo. Se añadió 5 mL de LiCl 12 M y se dejó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas para permitir la precipitación del RNA. Se centrifugó a 27.200 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 min. El precipitado resultante se lavó con 700 μL de etanol 70% (v/v) y se transfirió a un tubo "eppendorf". Se centrifugó durante 5 min a 17.900 x g a temperatura ambiente y se eliminó totalmente el sobrenadante. Se añadió 1.000 μL de acetato sódico 3 M pH 6,0 y se fragmentó lo máximo posible el precipitado para facilitar su máxima disolución. Se centrifugó durante 5 min a 17.900 x g y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 500 μL de etanol 70% (v/v) fragmentándolo al máximo y se centrifugó 5 min a 17.900 x g . Se resuspendió el precipitado en 40-80 μL de agua milliQ estéril. Se calentó durante 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, se agitó hasta su completa disolución y se centrifugó 5 min a 17.900 x g . Finalmente se separó el sobrenadante y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

4.2. Medida de la cantidad y calidad del RNA.

Para cuantificar el RNA se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Se midió la absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nanómetros de una dilución 1/400 de las muestras extraídas. A partir del valor de la ($A_{260} - A_{320}$) y del cociente $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$ se determinó la cantidad y la calidad del RNA. Además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 2 mM, pH 8,0) conteniendo EtBr (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), de 2 μL de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con 0,1 volúmenes de tampón de carga 10X (glicerol 50% (p/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v)). La electroforesis se desarrolló en tampón TAE a 5 V/cm.

4.3. Purificación de mRNA

La purificación de mRNA se realizó mediante el uso del *kit* "MicroPoly(A) Purist" (Ambion Inc.) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El mecanismo de purificación se basa en la unión selectiva de las colas poly A del mRNA a los residuos del oligonucleótido (dT) unido covalentemente a la superficie de la matriz de las columnas. El mRNA se cuantificó mediante el empleo del fluoróforo RiboGreen (Molecular probes Inc.) que se basa en la detección sensible y cuantitativa de la fluorescencia emitida por el reactivo tras su unión a ácidos nucleicos.

5. Análisis Northern

5.1. Electroforesis y transferencia del RNA a membranas de nailon.

Las muestras de RNA desnaturalizadas, 10 μg por muestra, fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v) en tampón ácido 3-morfolino-propano-sulfónico (MOPS: MOPS 0,02 M, acetato sódico 10 mM, pH 7,0) conteniendo formaldehído 2,2 M (Sambrook *et al.*, 1989). Finalizada la electroforesis, se transfirió el RNA a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences) empleando como solución de transferencia 20X SSC (cloruro sódico 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0). El RNA se fijó de forma covalente a la membrana irradiando con una dosis de 120.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de luz UV en un Crosslinker UVC 500 (Hoefer).

5.2. Síntesis y marcaje de las sondas

Para cada sonda, a partir de los plásmidos guardados a -20 °C se hizo una amplificación por PCR tomando 5 µL del plásmido (1 ng/µL) y añadiendo 45 µL de mezcla de reacción (MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primer FOR17 0,4 µM, primer REV17 0,4 µM, Taq DNA polimerasa (Ecotaq, Ecogen, España) (1 U/µL), 1X Buffer (Ecogen). Se incubó 3 min a 94 °C y se realizaron 30 ciclos de 94 °C 3 min, 56 °C 45 segundos y 72 °C 2 min. Se incubó 10 min a 72 °C y se mantuvo a 10 °C. Se cuantificó la cantidad de sonda con un espectrofluorímetro (Fluoroskan Ascent FL. Labsystems) mediante el empleo del fluoróforo RiboGreen (Molecular probes Inc.).

El DNA obtenido se marcó radiactivamente con [α^{32} P] dATP (10 µCi/µL) (Invitrogen) siguiendo el método de marcaje por PCR lineal de DNA monocatenario incluido en el *kit* "Strip-EZ™ PCR" (Ambion Inc.). Se utilizaron en cada caso cebadores que priman la elongación de la cadena complementaria al mRNA. Los ciclos de PCR que se utilizaron fueron los anteriormente citados. La eliminación de los nucleótidos no incorporados se realizó usando las columnas "MicroSpin™ S-300 HR" (Amersham-Pharmacia Biotech.), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. La cuantificación de la radiactividad se realizó empleando un contador de centelleo líquido 1409 Rackbeta LKB (LKB Wallack).

5.3. Hibridación y análisis de datos.

Las membranas se prehibridaron en tubos de hibridación durante 1 hora con 10 mL de la solución "Ultrasensitive Hybridization Buffer" (Ambion Inc.) a 42 °C. Seguidamente se cambió la solución por otros 10 mL de solución precalentada y se añadió la sonda radiactiva a una concentración final de 10⁶ dpm/mL y se dejó hibridar durante 16 horas a 42 °C.

Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 min a temperatura ambiente con una solución SSC 2X, SDS 0,1% (p/v), seguidos de un lavado de 30 min a 55 °C con una solución SSC 0,1X, SDS 0,1% (p/v). Finalmente se realizó otro lavado de 30 min a 65 °C con SSC 0,1X, SDS 0,1% (p/v).

Una vez lavadas las membranas, se sellaron en plástico, se expusieron en pantallas "BAS MP 2040 Imaging Plate" (Fuji Photo Film Co., LTD.), que fueron posteriormente densitometradas en un equipo FLA-3000 (Fuji Photo Film Co., LTD.). La intensidad de las señales de hibridación se cuantificó con el programa Image Gauge V4.0 (Science Lab 98, Fuji Photo Film Co., LTD.). La eliminación de las sondas radiactivas de las membranas se llevó a cabo mediante el uso de las soluciones provistas en el *kit* de marcaje "Strip-EZ PCR" (Ambion Inc.) según las instrucciones del proveedor y se guardaron a 4 °C para nuevas hibridaciones.

Para la normalización de los resultados de hibridación, los filtros se hibridaron con sondas obtenidas a partir de un fragmento del gen ribosómico 26S de *C. sinensis* a una concentración de 10⁵ dpm/mL. Las membranas se procesaron de la forma descrita anteriormente. Se cuantificó el nivel de intensidad de los pixels dentro del área correspondiente a la banda o bandas de mRNA para un determinado filtro y sonda y se dividió entre la obtenida utilizando como sonda el fragmento ribosómico de naranja.

6. Construcción de bibliotecas génicas y análisis de sus secuencias:

Se han construido dos bibliotecas de cDNA diferentes según las necesidades del proyecto.

6.1. Biblioteca de ESTs (RindPdig24).

Se obtuvo a partir de RNA de muestras de frutos (flavado y albedo) de mandarina Clemenules, heridos e infectados con *P. digitatum*, a las 24 horas después de la inoculación según se describe en el apartado 2.

A partir del RNA inicial se realizó una purificación del mRNA según se describe en el apartado 4.3. Seguidamente se cuantificó en un espectrofluorímetro (Fluoroskan Ascent FL. Labsystem) mediante el empleo del fluoróforo RiboGreen (Molecular probes Inc.). Para comprobar la integridad del mRNA se realizó un análisis Northern (véase Resultados, apartado 3.1). La síntesis de cDNA se llevó a cabo con la transcriptasa

reversa StrataScript RT (“cDNA Síntesis kit” y “ZAP-cDNA síntesis kit” Stratagene Cat#200450). El cebador empleado en la síntesis de la primera hebra del cDNA posee una secuencia poly(dT) de 18 nucleótidos que hibrida con las colas poly(A) de los mRNA, y un sitio de restricción *Xho*I que permite la clonación direccional de los cDNAs obtenidos. Finalizada la síntesis de la segunda cadena de cDNA se añadió un adaptador conteniendo el sitio de restricción *Eco*RI de forma que los cDNAs pudieron ser clonados direccionalmente en el vector Uni-ZAP XR. A continuación se procedió al fraccionamiento del cDNA por tamaño mediante cromatografía de exclusión molecular, usando las columnas “Size stepTM 400 spin columns”, (Amersham Pharmacia Biotech).

Para el ligamiento del cDNA inserto con el vector Uni-ZAP XR se utilizó la DNA ligasa del fago T4, que fue añadida a una solución conteniendo los cDNAs, el vector Uni-ZAP XR y un tampón adecuado para la ligasa, y se incubó en las condiciones para obtener máximo rendimiento de ligamiento.

El empaquetamiento y la transfección se llevaron a cabo mediante el uso del *kit* “ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning” (Stratagene) según las indicaciones del fabricante. Se usó la bacteria *Escherichia coli* XL1-Blue MRF para la reacción de empaquetamiento. Además se realizó un control de empaquetamiento usando λ DNA y la cepa de *E. coli* VCS257 (Stratagene) para determinar la eficiencia del empaquetamiento. Para el empaquetamiento del vector en las células hospedadoras se incubó los fagos lambda conteniendo el inserto con el extracto de empaquetamiento XL1-Blue MRF a 22 °C durante 2 horas. La titulación se realizó por recuento de “calvas” al crecer XL1-Blue MRF sobre placas de agar NZY (NaCl 0,5% (p/v), MgSO₄ 0,2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), hidrolizado de caseína 1% (p/v), agar ,5% (p/v), agarosa 0,7% (p/v), pH 7,5). Se realizó un estudio del porcentaje de fagos recombinantes que contenían inserto por determinación de colonias azules y blancas incubando la reacción de empaquetamiento con XL1-Blue MRF y luego creciendo las células en medio NZY agar con X-gal 0,01% (p/v) e IPTG (0,002M). Una vez llevada a cabo la titulación primaria de la biblioteca de cDNA se procedió a realizar un paso de amplificación. Par ello, se realizó una escisión en masa con el fin de obtener el fagémido pBluescript. Se incubaron las células XL1-Blue MRF, conteniendo el fago lambda, con el fago “ayudante” “ExAssist[®] interference-resistant helper phage” produciéndose la escisión de pBluescript, y se incubó el sobrenadante con

células SOLR para que fueran transfectadas por el fagémido. Para la obtención de los plásmidos se incubaron las células SOLR transfectadas con pBluescript en placas de LB (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), agar bacteriológico 1,5% (p/v)) con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante 16 horas. A partir de las placas de crecimiento, se seleccionaron las colonias al azar y se crecieron en placas de 96 pocillos con medio 2X LB y kanamicina (50 µg/mL) a 37 °C durante 1 día. Una vez crecidas las colonias, se realizó la purificación de los plásmidos a gran escala en placas de 96 pocillos. Para ello, se utilizó el método de la lisis alcalina, mediante el uso del *kit* “Montage plasmid miniprep₉₆” (Millipore) adaptado a placas de microtítulo de 96 pocillos, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó la cantidad de plásmido obtenido mediante el empleo del fluoróforo RiboGreen (Molecular probes Inc.). La secuenciación de DNA se realizó en el Servicio de secuenciación del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC) utilizando un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystem).

6.2. Biblioteca de cDNAs de longitud completa (PostharvP1).

Esta parte del trabajo se realizó en el IBMCP con la colaboración y asesoramiento del Dr. Miguel Ángel Pérez Amador, y dentro de las tareas previstas en el CFGP que contemplaban la construcción en paralelo de una serie de bibliotecas de cDNA de longitud completa.

La biblioteca de cDNA se sintetizó a partir de una mezcla de RNA obtenida reuniendo en una misma solución muestras de RNA total de corteza de frutos (flavado y albedo) de mandarina *Clemenules* heridos y de frutos heridos e infectados con *P. digitatum*, y recogidas a las 8, 16 ó 24 horas después de la inoculación, según se describe en el apartado 2. A partir de estas muestras se purificó el mRNA según se describe en el apartado 4.3. Las muestras se cuantificaron mediante el empleo del fluoróforo RiboGreen (Molecular probes Inc.). La integridad del RNA se confirmó mediante hibridación Northern (véase Resultados, apartado 3.1).

La síntesis de cDNA de longitud completa se llevó a cabo mediante el empleo del *kit* “BD smart PCR cDNA síntesis” (BD biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 10).

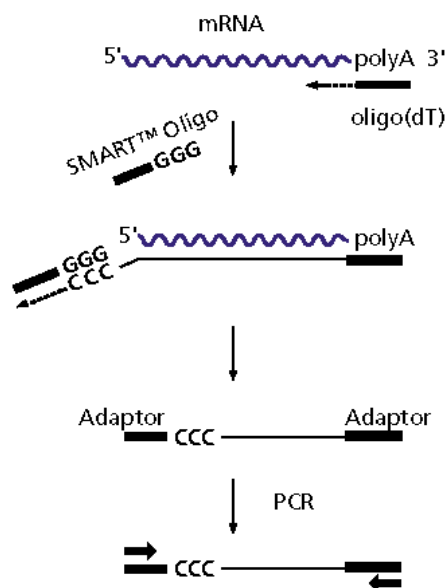


Figura 10. Esquema de la síntesis de cDNA mediante el kit “BD smart™ PCR cDNA síntesis”.

Como cebador se añadió un oligo(dT), que se unió a la cola poly(A) para la síntesis de la primera hebra. La transcriptasa reversa (RT) posee procesividad incrementada y está adaptada para la síntesis de largas moléculas de cDNA. Cuando la RT llega al extremo 5' del mRNA, debido a su actividad transferasa terminal, añade a la cadena de cDNA unos nucleótidos adicionales, principalmente desoxicitidina. El oligonucleótido SMART™ (BD biosciences), que contiene una secuencia oligo(dG) en el extremo 3', se unió, por complementariedad de bases, a la cadena de desoxicitidina y sirvió como molde a la RT, que continuó replicando a partir de la segunda hebra de cDNA (Zhu *et al.*, 2001). En aquellos mRNA que no llegaron a transcribirse hasta el extremo 5', la adición de nucleótidos de desoxicitidina fue mucho menor, por lo que se dificultó el apareamiento del oligonucleótido SMART™, lo que incrementó la proporción de cDNAs de longitud completa. Los cDNAs que contuvieron los adaptadores en ambos extremos fueron amplificados exponencialmente. Los cebadores contienen

una secuencia de restricción *Sfi*I para poder ser insertados en plásmidos pENTR.

Para la inserción de los cDNAs, se sometió al vector pENTR a una digestión con *Sfi*I. Se purificaron mediante electroforesis en gel de bajo punto de fusión, recortando el gel por el tamaño de 1 Kb, para obtener los cDNAs de más de 1 Kb (Figura 11), y posteriormente se empleó el *kit* "QIAquick gel extraction" (Qiagen), según las instrucciones del proveedor. Seguidamente se hizo una segunda digestión con *Sfi*I. Para el ligamiento se mezclaron cDNA y vector en proporción 1:3, y se dejaron reaccionar en presencia de ligasa y el tampón adecuado a 16 °C durante 16 horas.

Para la transformación se emplearon células competentes TOP10 (Invitrogen). Después de la transformación se crecieron en placas de LB agar con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante 16 horas. La selección de las colonias y la purificación de los plásmidos se hicieron del mismo modo que en el caso de la biblioteca de cDNA RindPdig24.

Posteriormente se realizó una estimación cualitativa, a partir de electroforesis en gel de agarosa, de 24 clones de cada placa. La secuenciación se realizó en el "servicio de secuenciación" del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC) del mismo modo que en el caso de la biblioteca de cDNA RindPdig24.

En la Tabla 1 se muestran las características generales de las tres colecciones de cDNA utilizadas durante la tesis.

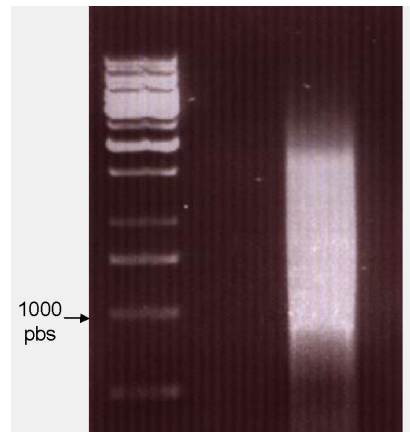


Figura 11. Electroforesis de los cDNAs obtenidos tras la digestión con *Sfi* I previo a la inserción en el vector pENTR.

Tabla 1. Resumen de las características de las bibliotecas de cDNA utilizadas durante este trabajo.

Nombre	Vector de clonación	Variedad	Tejido	Método de clonación	Tipo de biblioteca
RindPdig24	Uni-ZAP XR vector	Clemenules	Piel (flavado + albedo)	Stratagene cDNA Synt	cDNA
PostharvP1	pENTR1A	Clemenules	Piel (flavado + albedo)	SMART Clontech	cDNA longitud completa
RindPdigS	T/A cloning vector	Navelina	Piel (flavado + albedo)	SSH Clontech	cDNA

6.3. Análisis de las secuencias de las bibliotecas.

Las secuencias obtenidas de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1 fueron analizadas mediante el programa informático Seqtools (<http://www.dnatoools.org/seqtools.html>). Para ello, a partir de la secuencia obtenida en los cromatogramas, se eliminaron las regiones correspondientes al vector y los adaptadores. Las secuencias que presentaban más de una pareja de adaptadores fueron examinadas para determinar la presencia de quimeras. Las secuencias que contenían menos de 50 pb, sin tener en cuenta los nucleótidos correspondientes a la cola poly (A) fueron descartadas. A continuación se realizó una búsqueda de secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) en una base de datos de proteínas (GenBank non-redundant (nr) protein database). Además se realizó un análisis de agrupamiento de las secuencias de las bibliotecas de cDNA para determinar cuáles de ellas constituyen una copia única del gen (“singleton”), y cuáles son secuencias solapantes de un mismo gen (“contig” o agrupamiento).

El estudio de la anotación funcional se realizó mediante la búsqueda de secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX contra la base de datos de proteínas de *A. thaliana* del MIPS (Munich information center for protein sequences, <http://mips.gsf.de>). A cada unigen con ortólogo en *A. thaliana* se le asignó una anotación funcional por ontologías génicas (“Gene Ontology”, GO) (<http://www.geneontology.org>). Estos unigenes fueron clasificados según el modelo propuesto por la base de

datos Kegg (<http://genome.ad.jp/kegg/pathway.html>) (Kanehisa *et al.*, 2006). Además, a aquellas que lo tuvieran, se les asignó el número de clasificación E.C.

7. Análisis de expresión génica mediante el empleo de macromatrices de cDNA.

7.1. Descripción de la macromatriz.

Previamente a este trabajo, en el laboratorio de postcosecha del IATA se elaboró una biblioteca sustractiva, denominada RindPdigS, obtenida mediante el método de la hibridación sustractiva mediada por PCR supresiva (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996). Esta biblioteca está enriquecida en genes de naranja que se expresan más abundantemente en respuesta a la infección por *P. digitatum* que en respuesta al daño mecánico, herida, a las 24 h después de la inoculación. A partir de esta colección se amplificó por PCR el inserto presente en 1.436 clones seleccionados al azar, utilizando como cebadores oligonucleótidos presentes en el vector pBluescript que flanquean el inserto. Los productos de PCR fueron impresos en una macromatriz de nailon formada por 96 bloques de 16 clones, distribuidos en 12 columnas y 8 filas, de modo que cada bloque contenía un clon de cada una de las 16 placas iniciales (Figura 12). En la macromatriz se añadieron, además, 100 controles de amplificación, impresión y expresión génica conocida. En cada una de las 16 placas de 96 pocillos se había introducido al menos dos controles negativos y tres positivos. Los controles negativos consistieron en una amplificación sin DNA molde (posición B02), o empleando el vector pBluescript como molde de amplificación (posición G11). Como controles positivos de expresión se añadió en cada placa una región de las secuencias de *Cr-ACO* (AJ871090) (en posición G02), *Cr-ACS1* (AJ871088) (en posición B11) y *PAL* (en posición E07). Además se introdujeron en algunas placas clones de varios genes con expresión conocida durante la infección ya caracterizada por nuestro grupo: glucanasa (*GLU*), acetiltransferasa (*3c1*), dehidrina (*LEA*) y un gen que codifica una proteína de transferencia de lípidos ("lipid transfer protein") (*LTP*).

Esta macromatriz fue utilizada durante el trabajo de la tesis para el estudio de la expresión de genes implicados durante la respuesta del fruto

cítico a la infección, en las condiciones de herida, infección y tratamiento con ET.

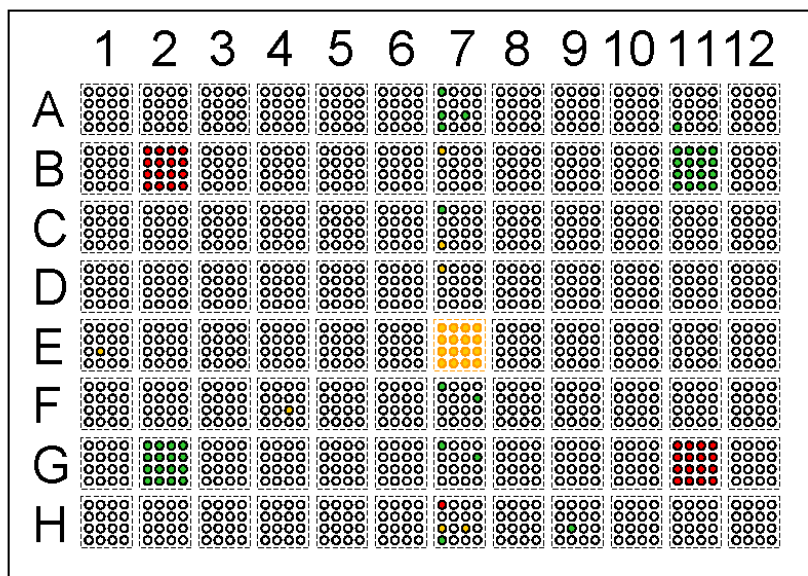


Figura 12. Diseño de la macromatriz de cDNA elaborada a partir de clones procedentes de la biblioteca RindPdigS (SCSIE, Universidad de Valencia). En color se indica la posición de los controles.

7.2. Marcaje con ^{33}P de la primera cadena de cDNA por transcripción reversa.

Para la hibridación de las macromatrices se sintetizó cDNA a partir de 20 μg de RNA total por transcripción reversa. Se añadió al RNA 1,5 μL de cebador “anchored oligo (dT)₂₀” (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Invitrogen), se incubó a 70 °C durante 5 min, y se transfirió a hielo. Posteriormente se añadió 6 μL de tampón 5X de primera hebra, 1,5 μL de ditiotreitól (DTT) 0,1M (Invitrogen), 1,5 μL de una mezcla de dNTPs (16 mM cada dATP, dGTP, dTTP y 100 μM el dCTP) (Sigma), 4,5 μL de [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP (10 mCi/ μL), 1 μL de inhibidor de ribonucleasas (10 U/ μL) (Invitrogen) y 2 μL de Superscript III reverse transcriptase (400 U) (Invitrogen). La incubación tuvo lugar durante 120 min a 50 °C y luego inactivada a 70 °C durante 15 min. El RNA se degradó añadiendo 3,5 μL de NaOH 3 N a 70 °C durante

15 min. El pH se neutralizó con 10 μ L de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y 10,5 μ L de HCl 1N en un volumen final de 54 μ L. La eliminación del [α^{33} P] dCTP no incorporado se realizó mediante el *kit* de purificación “MiniElute PCR Purification” (Qiagen) según las instrucciones del proveedor. La eficiencia de la síntesis se determinó espectrofotométricamente.

7.3. Hibridación de la macromatriz de cDNA y análisis informático de las imágenes.

El diseño del experimento consistió en cuatro condiciones de trabajo (frutos heridos, frutos heridos e inoculados con *P. digitatum*, frutos tratados con ET en ausencia de herida e inoculación, y frutos tratados con aire) y tres réplicas técnicas para cada condición, lo que supuso un total de 12 hibridaciones con los filtros. Se utilizaron un total de 4 filtros, por lo que cada uno fue reutilizado 3 veces.

La hibridación de la macromatriz y la posterior eliminación de la sonda radiactiva para reutilizar la membrana se llevó a cabo como ya está descrito (Alberola *et al.*, 2004). Después de la hibridación, las membranas se lavaron con 50 mL de 2X SSC y SDS 0,1% (p/v) a 65 °C, y posteriormente dos lavados con 50 mL de 0,2X SSC, SDS 0,1% (p/v) durante 30 min a 65 °C. Tras el último lavado, se envolvieron los filtros en film de plástico y se expusieron 2 días para detección de radiación en pantalla “BAS MP 2040 Imaging Plate” (Fuji Photo Film Co., LTD). El densitometrado de la imagen se realizó con un equipo FLA-3000 (Fuji Photo Film Co., LTD). La eliminación de las sondas radiactivas para la reutilización de las membranas se realizó mediante el empleo de las soluciones provistas en el *kit* de marcaje “Strip-EZ PCR” (Ambion, Inc.) según las instrucciones del proveedor.

La intensidad de la señal fue cuantificada empleando el software ArrayVision (Imaging Research Inc.). Aquellos valores menores de 1,5 veces el ruido de fondo o que eran menores que el valor de pBluescript más dos veces su desviación estándar fueron eliminados. Además, para cada tratamiento sólo se procesaron aquellos clones que presentaron señal de hibridación en al menos dos de las réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa ArrayStat (Imaging research, inc.). Se realizaron dos tipos de normalizaciones, dentro de cada condición y entre condiciones. Para identificar clones que tuvieran expresión diferencial entre

las condiciones de estudio se realizó un “z-test” por parejas. Este test dio como resultado el estadístico “valor-Z” que se calcula como la diferencia entre las medias dividido por el error estándar. Se usó la corrección de falsos positivos (FDR) al 5% (valor nominal alpha de 0.05). Esto implica que hay una probabilidad del 5% de que clones que se declarasen como diferenciales, realmente no lo fueran {Benjamini, 2000 428 /id}. Este tipo de corrección permite abordar el problema de las comparaciones múltiples de un modo diferente a las técnicas Bonferroni (Bland y Altman, 1995). Es un método menos restrictivo, y por lo tanto permite detectar mayor cantidad de diferencias biológicas dentro de los datos.

7.4. Secuenciación de una selección de clones de la macromatriz.

A partir del análisis informático de los resultados de expresión, se hizo una selección de los clones de mayor interés según su expresión diferencial en cada una de las condiciones de estudio. Se seleccionaron un total de 371 clones. Una alícuota de cada glicerinado se creció en medio líquido 2X YT (16 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 10 g/L extracto de levadura) con ampicilina (50 µg/mL). Después de dejarlos crecer 24 horas a 37 °C en agitación, se obtuvo los plásmidos de cada clon mediante lisis alcalina (minipreps) en placa de 96 pocillos (Millipore). Se enviaron 300 ng de DNA plasmídico de cada clon al Servicio de secuenciación de DNA de la Universidad de Valencia.

8. Análisis global de expresión génica mediante el empleo de micromatrices de cDNA.

Dentro del proyecto español de genómica funcional de cítricos CFGP (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) se diseñó una micromatriz con clones procedentes de 18 colecciones de cDNAs obtenidas a partir de distintos tejidos, en diferentes estadios fisiológicos y en respuesta a diferentes tipos de estrés, comentadas en la Introducción. La micromatriz utilizada, denominada 7k, contiene 12.671 y al menos 6.333 unigenes, ya que no todos los clones de la matriz han sido secuenciados (Forment *et al.*, 2005). Una alícuota de entre 100 y 400 µg de estas muestras se imprimió en los cristales con un robot microGridIII (Biorobotics)

con un tamaño de impresión de 120 micras de diámetro, junto con controles de DNA, tanto positivos (DNA genómico) como negativos (vector de clonaje, control de PCR...). La macromatriz se diseñó con 48 bloques (4 columnas por doce filas) conteniendo 272 clones (16 columnas por 17 filas).

8.1. Diseño experimental.

Para abordar el estudio de la expresión diferencial de genes del fruto en respuesta a las condiciones de herida, infección, tratamiento con ET y tratamiento con aire, se tuvo muy en cuenta la importancia de las réplicas. Los experimentos con micromatrices son realizados a menudo con un número insuficiente de réplicas biológicas lo que supone unos resultados con bajo poder estadístico para la detección de genes con expresión diferencial. Si se amplía a un número considerado la cantidad de réplicas biológicas, se puede disminuir significativamente los falsos positivos y aumentar, de este modo, el poder estadístico del trabajo (Wei *et al.*, 2004).

Se trabajó con 4 condiciones diferentes: (i) Frutos de 'Clemenules' tratados con ET (10 ppm) durante 16 horas, en ausencia de infección (E); (ii) frutos de 'Clemenules' heridos y procesados a las 24 horas (W); (iii) frutos de 'Clemenules' heridos e inoculados con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) y procesados a las 24 horas (I); (iv) frutos de 'Clemenules' control mantenidos 24 horas en las mismas condiciones de conservación (A). Para cada una de las condiciones se analizaron tres réplicas biológicas procedentes de dos campañas diferentes. Una fue tomada en diciembre del 2003, mientras que las otras dos se tomaron en diciembre del 2004 y en enero del 2005. A partir de cada una de las réplicas biológicas se hicieron dos réplicas técnicas consistentes en hibridaciones diferentes realizadas a partir de los mismos RNAs (Figura 13).

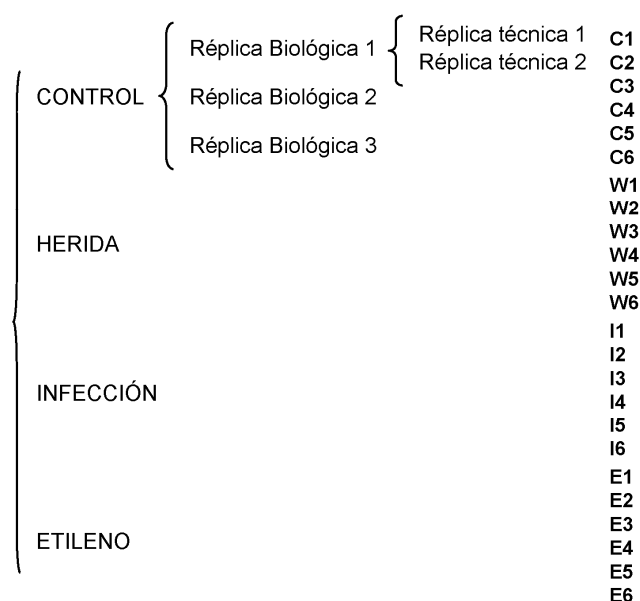


Figura 13. Diseño experimental de las hibridaciones a realizar con las micromatrices

La muestra de referencia para todas las hibridaciones de las micromatrices se elaboró a partir de una mezcla de RNA extraídos de frutos control, heridos e infectados, a diferentes tiempos y pertenecientes a dos campañas diferentes, como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Esquema de las muestras de RNA utilizadas para la elaboración de la muestra de referencia.

Campaña	Tratamiento	Tiempos (horas)
2003	Control	0, 8, 16, 24, 48
	Herida	8, 16, 24, 48
	Infección	8, 16, 24, 48
2005	Control	0, 8, 16, 24, 48
	Herida	8, 16, 24, 48
	Infección	8, 16, 24, 48

Para comprobar la calidad de todos los RNAs utilizados en la muestra de referencia, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Se mezclaron 75 µg de cada RNA en un mismo tubo. De la mezcla se estudió con un espectrofotómetro la calidad del RNA. Antes de ser guardada a -80 °C se alicuotó en tubos de PCR con la cantidad suficiente para 4 experimentos.

8.2. Síntesis y purificación de aminoalil-cDNA (AA-cDNA).

Para la hibridación de la micromatriz se siguió el método de marcaje indirecto con los fluoróforos Cy5 y Cy3. Se partió de 20 µg de RNA total tanto para la muestra problema como para la muestra de referencia. Se añadió al RNA 1,5 µL de cebador “anchored oligo (dT)₂₀” (2,5 µg/ µL) (Invitrogen), se incubó a 70 °C durante 5 min y se dejó en hielo. Se añadió 12,5 µL de una mezcla que contenía por reacción: tampón de primera hebra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM y MgCl₂ 3 mM) (Invitrogen), DTT 20 mM (Invitrogen), dATP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,16 mM, 5-[3-aminoalil]-2'-deoxiuridina 5'- trifosfato (aa-dUTP) (Sigma) 0,33 mM, inhibidor de ribonucleasa (Invitrogen) 10 U y transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) 400 U. Se centrifugó para asegurar la mezcla completa de todos los reactivos y se incubó a 50 °C 16 horas en horno de hibridación.

Transcurrido el tiempo de síntesis se inactivó la enzima por calor a 70 °C durante 10 min. Para hidrolizar el RNA se añadió 10 µL de NaOH 1 M, y 10 µL EDTA 0.5 M pH 8.0. Se mezcló suavemente y se incubó a 70 °C durante 15 min. Se añadió 10 µL de HCl 1 M para neutralizar el pH. El AA-cDNA se purificó mediante el *kit* “MiniElute PCR Purification” (Qiagen) según las especificaciones del proveedor, pero empleando un tampón de lavado (K₃PO₄ 5 mM pH 8,5 y etanol al 80%) diferente al del *kit*, ya que éste contiene Tris e interferiría en la unión de los fluoróforos al extremo amino de la cadena aminoalil. Seguidamente se comprobó la eficiencia de la síntesis del AA-cDNA por espectrofotometría. Para ello se llevaron las muestras a un volumen final de 100 µL con 40 µL de tampón de elución y se colocaron en una placa de 96 pocillos transparente a la luz UV. Se introdujo la placa en un espectrofotómetro “MultiSkan spectrum” (Termo Scientific) y se midió la absorbancias entre 200 y 350 nm. La cantidad obtenida de dicho AA-cDNA se determinó a partir de la fórmula:

$$\text{cDNA [ng]} = A_{260} \times 37 \text{ (ng/}\mu\text{L)} \times 100$$

Finalmente se recogieron los 100 μL de la placa, se secaron a vacío y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

8.3. Acoplamiento de los fluoróforos al AA-cDNA y purificación de los Cy's-cDNA.

Los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Amersham Biosciences) se resuspendieron con 70 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), se alicuotaron 4 μL del fluoróforo resuspendido en diversos tubos, se secaron a vacío y se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y en presencia de un desecante hasta su uso.

En el momento de su uso se resuspendió una alícuota de cada uno de los dos fluoróforos por separado en 9 μL de Na_2CO_3 0,1 M pH 9, recién preparado. Se transfirieron estos 9 μL a cada uno de los tubos con el cDNA previamente secado y se resuspendieron con la pipeta. Se incubaron 2 horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad para permitir la incorporación de los fluoróforos.

Se añadieron 35 μL de Na_2CO_3 100 mM pH 5,2 a los 9 μL del marcaje y se mezcló bien para detener la reacción de acoplamiento. La purificación de los Cy's-cDNA se realizó con el *kit* de purificación "MiniElute PCR Purification". (Qiagen) empleando los tampones proporcionados en el mismo. La eficiencia del proceso y el estado de la muestra se calcularon mediante electroforesis (Bittner *et al.*, 2003). Las muestras se concentraron por centrifugación a vacío hasta 5 μL y se conservaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.4. Preparación de las sondas e hibridación de las micromatrices de cDNA.

Se introdujo la micromatriz en un tubo con solución de prehibridación (3X SSC, SDS 0,1% (p/v), 0,1 mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA)) precalentado a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se dejó incubando durante 60 min. Se transfirió a contenedor portaobjetos con H_2O milliQ estéril y se dejó durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se transfirió a otro

contenedor con isopropanol durante 2 segundos. Finalmente se transfirió a un contenedor con H₂O milliQ durante 2 segundos e inmediatamente se secó la micromatriz por centrifugación a 1.200 rpm y 10 min.

Se introdujo 40 µL de la solución de hibridación (formamida al 50% (v/v), 3X SSC, SDS 0,2% (p/v), 0,1 mg/mL de DNA de esperma de salmón) en los tubos de los cDNAs marcados con Cy3 y Cy5, y se agitó con pipeta para su redisolución. Se mezcló el contenido de ambos tubos y se calentó a 95 °C durante 1 min. Se centrifugó y se dejó a temperatura ambiente 5 min. Mientras, se preparó la cámara de hibridación "Gene Machines Hyb Chamber" (Genomic Solutions) añadiendo 10 µL de H₂O milliQ en las cuatro esquinas de la cámara de hibridación, y 10 µL en el centro para que el medio donde se encuentre la micromatriz durante la hibridación no pierda la humedad y no se seque. Se colocó el microarray en la cámara de hibridación y se le depositó encima el cubreobjetos (Erie Scientific Company), orientándolo bien para permitir el paso correcto de la muestra de hibridación. Se añadió lentamente la mezcla de hibridación atemperada, por capilaridad, hasta verter todo el volumen y se cerró la cámara de hibridación. Se introdujo la cámara en un baño de agua a 42 °C y se dejó incubar durante 16 horas.

Seguidamente, se sumergió el cristal en 2X SSC, SDS 0,1% (p/v) a 42 °C hasta soltar el cubreobjetos. Se transfirió a otro contenedor y se lavó nuevamente con 2X SSC, SDS 0,1% (p/v) a 42 °C durante 5 min. Se transfirió a contenedor con 0,1X SSC, SDS 0,1% (p/v) y se lavó a 25 °C durante 10 min. Se transfirió a contenedor con 0,1X SSC, a 25 °C durante 1 min. Este paso se repitió 5 veces. Finalmente se enjuagó con 0,01X SSC durante 5 segundos y se secó inmediatamente centrifugando a 280 x g durante 15 min a temperatura ambiente. La micromatriz se guardó en envases que lo protegían del polvo y la luz hasta su escaneado.

8.5. Adquisición y procesado de las imágenes.

Una vez obtenida cada micromatriz, se escanearon inmediatamente, para minimizar la pérdida de señal con el tiempo, en un escáner con láser confocal GenePix 4100A o 4000B (Axon Instruments). Se utilizaron las longitudes de onda de 635 nm y 532 nm, correspondientes a los fluoróforos Cy5 y Cy3 respectivamente, utilizados para el marcaje de los cDNAs. Durante el escaneado se ajustaron las ganancias para que el

cociente de las intensidades totales fuera lo más cercana posible a 1. El escaneado se llevó a cabo con una resolución de 10 μm realizando dos pases de lector.

Las imágenes de hibridación se capturaron y cuantificaron con el programa "GenePix Pro 6.0" (Axon Instruments). A partir de la imagen obtenida tras el escaneado se utilizó un fichero ".gal" con el fin de poder identificar todas las señales de hibridación con sus correspondientes sondas. El programa realizó una sustracción de ruido de fondo local para los valores de la mediana del total de intensidades. Aquellas sondas que, al menos en un canal, su valor era inferior al doble de la desviación estándar del ruido de fondo local fueron eliminados. A partir de los resultados restantes, el programa determinó el valor medio y la desviación típica para cada uno de ellos, expresados como logaritmo en base 2 del cociente entre las intensidades de los fluoróforos Cy5 y Cy3.

Mediante el uso del programa DNMAD (Vaquerizas *et al.*, 2004) del paquete informático GEPAS ("Gene Expression Pattern Analysis Suite v3.1") (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>) (Montaner *et al.*, 2006) se realizaron dos tipos de normalizaciones. La normalización "Lowess" se aplicó para corregir la variación dependiente de la intensidad de señal dentro de cada hibridación. En nuestro análisis esta normalización se aplicó entre bloques ya que podía haber diferencias entre zonas de una misma matriz. La normalización por desviación estándar se realizó para conseguir que la desviación estándar de los puntos sea la misma entre diferentes bloques y entre diferentes cristales.

Una vez analizada la intensidad de los puntos de las micromatrices se procedió a agrupar aquellos clones que son realmente un mismo unigen, siendo considerado cada clon como diferentes réplicas de un mismo unigen. El programa GEPAS, dentro de la opción "preprocessing" reconoció la información asignada a cada punto de la micromatriz y de este modo agrupó aquellos clones de la micromatriz cuya secuencia son realmente parte de un mismo gen. En cada análisis el programa realizó un histograma de la intensidad de las réplicas y eliminó aquellos valores que estaban fuera del intervalo de confianza del 95%. Por lo tanto, a partir de este momento el análisis de resultados ya no se hizo sobre clones sino sobre unigenes.

Se transfirieron los valores a un archivo excel (Microsoft), y para cada condición sólo se procesaron aquellos unigenes que tuvieran al menos cuatro de los seis posibles datos (tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas de cada réplica biológica).

A partir de los resultados obtenidos se realizó un análisis de expresión diferencial usando la herramienta SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher *et al.*, 2001) con el programa informático MeV (<http://www.tm4.org>) (Saeed *et al.*, 2003). Se hizo SAM entre todos los tratamientos (Multi-class) y SAM por parejas (Two-class unpaired) entre todas las condiciones. Para estos análisis se utilizó un FDR menor del 1%, que corresponde a la probabilidad de que un resultado se de cómo diferencial cuando realmente no lo es (falso positivo). Con el fin de evaluar la probabilidad de que las diferencias de expresión observadas sean aleatorias, dentro de este análisis se llevaron a cabo 1.000 permutaciones entre las distintas columnas de datos, el máximo permitido por el programa.

Las categorías funcionales de los diferentes genes presentes en la micromatriz fueron automáticamente asignadas a partir de la comparación con genes homólogos de *A. thaliana* (Forment *et al.*, 2005).

8.6. Ontologías génicas (GO).

El estudio de las ontologías génicas se realizó mediante el programa informático FatiGO+ del paquete GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>) (Al-Shahrour *et al.*, 2005). Este programa permite encontrar distribuciones diferenciales entre dos grupos de genes en términos de ontologías génicas (GO) y “KEGG pathways” mediante un test de Fisher (Rajko y Heberger, 2001).

GO es probablemente el mejor método para la estandarización de la nomenclatura de las funciones moleculares (las tareas realizadas por los productos de los genes), procesos biológicos (el fin biológico que pretende alcanzar con la función), y localización subcelular (estructuras subcelulares, localización y complejos macromoleculares), sus tres ontologías fundamentales. GO representa el conocimiento biológico en estructura de árbol, pero donde un nivel puede tener más de un “padre”. Los niveles superiores representan conceptos más generales y al

aumentar los niveles, las definiciones son cada vez más precisas (Ej.: ciclo celular>regulación del ciclo celular> regulación positiva del ciclo celular, etc.). Se utilizó el "Nested Inclusive Análisis" (NIA) en el que el análisis se hace hasta el nivel más profundo donde se tiene significancia estadística y es éste el resultado que se describió. De este modo se optimizó la eficiencia del test y la alta precisión del resultado. El análisis se realizó a partir de aquellos genes de cítricos que presentaron ortólogo en *A. thaliana*. Esto supone un doble inconveniente, ya que por un lado se eliminan del análisis aquellos que no tienen ortólogo, y por otro, son considerados como uno aquellos genes de cítricos que comparten mismo ortólogo de *A. thaliana*. Se comparó los resultados provenientes entre dos condiciones distintas, se seleccionaron aquellas anotaciones que eran diferenciales entre ambas condiciones y se compararon respecto al total de genes con ortólogo en *A. thaliana* de la micromatriz. Para corregir el error de los falsos negativos inherentes a los ensayos múltiples, todos los valores del estadístico p fueron ajustados por FDR. Muchos de los resultados obtenidos eran redundantes, ya que hacían referencia a un mismo proceso a diferentes niveles.

A continuación se utilizó la herramienta "OMICS Viewer" del paquete informático "AraCyc 4.0" para la visualización de las rutas metabólicas más representadas en las condiciones de estudio (Mueller *et al.*, 2003) (www.arabidopsis.org). Se emplearon aquellos genes con homólogo en *A. thaliana* cuya expresión fue significativa en una de las condiciones frente a aire, según el análisis SAM realizado con anterioridad. También se emplearon aquellos genes cuya expresión no se detectó en una de las condiciones analizadas, asignándoles un + ó - según si la ausencia de expresión era en aire o en la condición respectivamente.

RESULTADOS

1. Estudio de la implicación del etileno en la respuesta de frutos cítricos a la infección por el hongo *P. digitatum*.

1.1. Progreso de la podredumbre verde causada por *P. digitatum* en frutos de mandarina 'Clemenules'.

El progreso de la infección está condicionado por diferentes factores ambientales y biológicos, entre los cuales destaca la cantidad de inóculo. Por ello, el primer paso en la caracterización de la interacción entre el hongo *P. digitatum* y los frutos de mandarina de 'Clemenules' fue el estudio del desarrollo de la infección con diferentes concentraciones del hongo.

En la Figura 14 se muestra la evolución del desarrollo de la infección con diferentes dosis de inóculo fúngico. Dosis altas, de 10^6 conidios/mL, supusieron prácticamente la totalidad de frutos afectados a los dos días después de la inoculación (dpi), lo cual es de interés cuando se pretende la sincronización de las repuestas de los frutos a la infección.

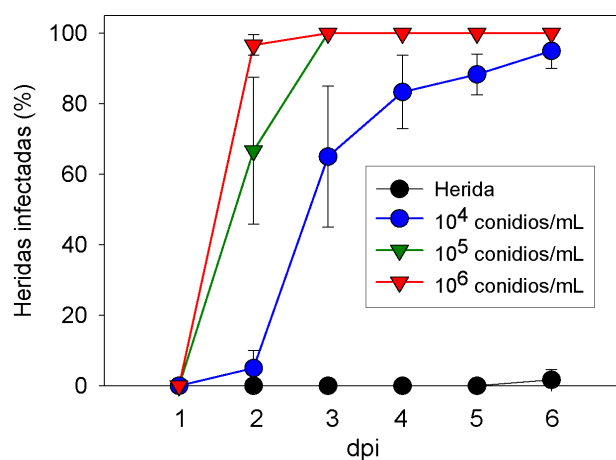


Figura 14. Incidencia de la infección en frutos de mandarina 'Clemenules' inoculadas con 3 concentraciones (10^4 , 10^5 y 10^6 conidios/mL) del hongo *P. digitatum*. Se muestra también el control de frutos heridos pero no infectados. Los resultados se representan como valores medios del porcentaje de infección \pm SD para cada tratamiento y día. Se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto).

Las dosis bajas de inóculo (10^4 conidios/mL), ocasionaron una cinética de infección lo suficientemente lenta para observar el avance de la misma, y para hacer estudios comparativos del efecto de distintos tratamientos sobre la infección de los frutos.

La Figura 15 muestra ejemplos representativos de frutos de la mandarina 'Clemenules' con 4 heridas, infectadas con el hongo *P. digitatum* a una dosis de 10^4 conidios/mL. A los dos dpi un pequeño porcentaje de frutos empezaron a mostrar los primeros síntomas de la infección, coincidiendo con los resultados de la Figura 14,

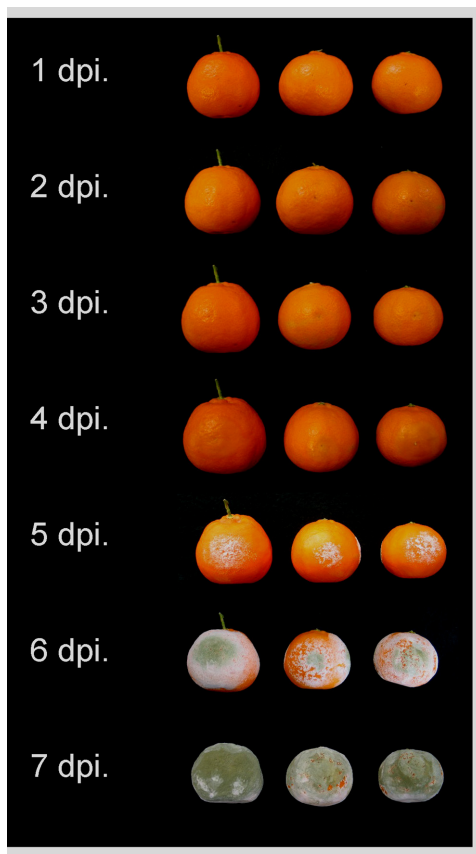


Figura 15. Fotografías representativas de la evolución de la podredumbre verde causada por *P. digitatum* a 10^4 conidios/mL, tomadas a diferentes días después de la infección (dpi), en frutos de mandarinas 'Clemenules'.

con un ablandamiento alrededor del punto de inoculación. A partir del tercer día se detecta visualmente en más de la mitad de los frutos un halo de maceración alrededor de la herida de hasta 1 cm de diámetro. A los cuatro dpi la mayoría de las heridas mostraron un desarrollo apreciable de la infección, siendo algunos halos de hasta 5 cm de diámetro. A partir del quinto día se puede apreciar cómo el micelio del hongo empieza a cubrir el fruto, mostrando manchas blancas en la superficie. Al sexto día la esporulación es evidente, observándose el color verde característico de esta podredumbre. Al séptimo día los frutos estuvieron prácticamente en su totalidad cubiertos por esporas del hongo.

1.2. Producción de etileno durante las fases iniciales de la infección de frutos de mandarina con *P. digitatum*.

Como se ha descrito en la Introducción, el ET es una hormona vegetal que actúa, entre otros procesos, como mediador de las respuestas de defensa de la planta a la infección por patógenos. La producción de ET durante la infección en frutos de naranja de la variedad 'Navelate' es un proceso ya estudiado por nuestro grupo (Marcos *et al.*, 2005). Inicialmente se hizo un estudio sobre la generación de ET como respuesta a la infección con el hongo *P. digitatum* en frutos de mandarina 'Clemenules'.

En este experimento se determinó la producción de ET en frutos de la mandarina 'Clemenules' heridos, y en frutos heridos e infectados con 10^6 conidios/mL de *P. digitatum*, comparándola con la de frutos intactos (Figura 16).

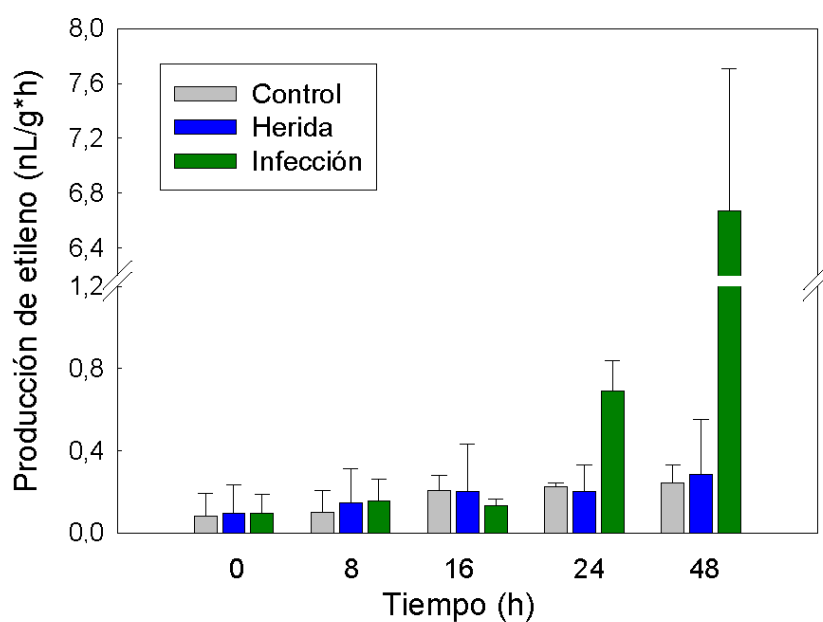


Figura 16. Producción de ET en frutos de mandarina 'Clemenules' heridos o infectados con *P. digitatum* a 10^6 conidios/mL y en frutos control intactos. Los resultados se representan como valores medios de producción de ET \pm SD para cada tiempo. En cada tratamiento se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto).

A estas dosis de inóculo, como ya se ha observado en la Figura 14, el progreso de la infección fue muy rápido, por lo que asumimos que existe sincronía entre todas las heridas infectadas. Después de un dpi (24 horas), los frutos no mostraron ningún síntoma todavía, pero a los dos dpi (48 horas) ya se manifestó desarrollo de la infección en casi el 100% de las heridas. Este inicio de la infección coincide con un incremento evidente en la producción de ET (Figura 16).

La producción de ET de los frutos fue semejante en las tres condiciones durante las 16 primeras horas, sin superar los 0,3 nL/(g x h). Es a partir de las 24 horas cuando se aprecia un aumento en la producción de esta hormona en frutos infectados, mientras que los frutos control y heridos no hay aumento. La producción de ET en frutos infectados aumentó de forma sustancial a partir de las 48 horas, donde los niveles de ET superan los 6 nL/(g x h). Los frutos heridos continuaron con unos niveles bajos de producción de ET, similares a los frutos control, sin superar los 0,5 nL/(g x h).

1.3. Cambios en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de etileno durante la infección de frutos de mandarina con *P. digitatum*.

Los dos últimos pasos en la ruta de síntesis de ET consisten en la conversión de S-adenosil-L-metionina en 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), catalizada por la enzima ACC sintasa (ACS), y una siguiente oxidación de ACC a ET, catalizada por la ACC oxidasa (ACO). Tanto ACS como ACO son enzimas sintetizadas por familias multigénicas. En cítricos se han descrito dos genes ACS, ACC sintasa1 (*CsACS1*) y ACC sintasa2 (*CsACS2*), cuya regulación diferencial parece ser la causa de los diferentes patrones de biosíntesis de ET (Katz *et al.*, 2004). En el caso de ACO se ha descrito hasta el momento un gen, *CsACO1*. Tanto ACS como ACO son enzimas sintetizadas por familias multigénicas. En cítricos se han descrito dos genes ACS, ACC sintasa1 (*CsACS1*) y ACC sintasa2 (*CsACS2*), cuya regulación diferencial parece ser la causa de los diferentes patrones de biosíntesis de ET (Katz *et al.*, 2004). En el caso de ACO se ha descrito hasta el momento un gen, *CsACO*.

Al mismo tiempo que se realizó el estudio de la producción de ET durante la infección (Figura 16), se recogió tejido de estos mismos frutos

para la realización de hibridaciones Northern con sondas obtenidas a partir de los genes implicados en los últimos pasos de la síntesis de ET, *CsACS1*, *CsACS2* y *CsACO* (Figura 17). Los resultados obtenidos confirman la implicación de estos tres genes en la respuesta de frutos de 'Clemenules' a la herida y a la infección, ya que todos ellos mostraron expresión diferencial en respuesta al daño mecánico y a la infección por *P. digitatum* respecto de frutos control, donde apenas se observa expresión de ninguno de ellos.

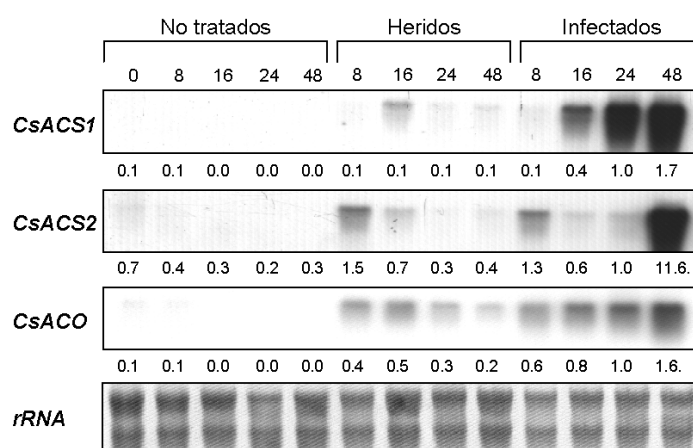


Figura 17. Análisis Northern de *CsACS1*, *CsACS2* y *CsACO* en corteza de frutos de mandarina 'Clemenules' después de la herida y durante el desarrollo de la infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) a 8, 16, 24 y 48 horas respecto al control. La tinción con azul de metileno mostró las bandas de RNA total. Para cada uno de los genes analizados, la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto al de la sonda 26S rRNA de *C. sinensis*. Al pie de cada figura se indica la acumulación relativa.

CsACS1 y *CsACS2* mostraron un perfil de expresión temporal diferente. Así, se observó una expresión temprana de *CsACS2* a las 8 horas, tanto en frutos heridos como en frutos inoculados con el patógeno, por lo que esta expresión parece estar relacionada más bien con el daño mecánico. Sin embargo, en frutos infectados se detecta un segundo pico de acumulación de transcrito a las 48 hpi que es de mayor magnitud que el primero. Esta segunda inducción no se detecta en frutos heridos (Figura 17).

CsACS1 muestra un máximo de expresión en respuesta a la herida a las 16 horas, sin embargo su expresión es mayor durante la infección, alcanzando el máximo a las 48 hpi. Su perfil de expresión precede a la producción de ET. La expresión del gen CsACO se induce en respuesta a la herida desde las 8 horas, siendo máxima a las 16 horas. En frutos heridos e infectados la expresión de CsACO aumentó progresivamente hasta las 48 horas. Cabe destacar que las diferencias de niveles de expresión entre frutos heridos y frutos infectados son mayores en los genes CsACS1 y CsACS2 que en CsACO, donde los niveles de expresión en respuesta al patógeno no fueron mucho más altos de los que se producen en respuesta a la herida.

1.4. Efecto del pretratamiento con un inhibidor de la acción del etileno (1-MCP) sobre el desarrollo de la infección y la producción de etileno.

Trabajos previos de nuestro grupo en naranjas 'Navelate' mostraron que el tratamiento con ET producía un ligero descenso en el desarrollo de la infección (Marcos *et al.*, 2005). En experimentos realizados con mandarinas 'Clemenules', los frutos fueron tratados con ET a una dosis de 10 ppm y, posteriormente, infectados con *P. digitatum* a una concentración de 5×10^3 con/mL. En estos experimentos no se observó una disminución de la incidencia de infección respecto a frutos no tratados (datos no mostrados).

Otra aproximación para el estudio de la implicación del ET en los mecanismos de respuesta de los frutos cítricos a la infección consiste en el uso del inhibidor de la acción del ET, 1-metilciclopropeno (1-MCP), el cual se une irreversiblemente a los receptores de ET, bloqueando su percepción y la transmisión de la señal (Blankenship y Dole, 2003). Experimentos con naranjas 'Navelate' han demostrado que el bloqueo de la percepción de ET, mediante el tratamiento con 1-MCP, provoca un aumento de la susceptibilidad a la infección, además de un incremento de la producción de ET (Marcos *et al.*, 2005). Para comprobar este efecto en las mandarinas 'Clemenules' los frutos fueron tratados con 1-MCP a dos concentraciones diferentes, 100 ppb y 500 ppb, y con aire. Seguidamente, fueron infectados con una dosis baja de *P. digitatum* (5×10^3 con/mL) para poder hacer un seguimiento efectivo de los posibles cambios en el desarrollo de la infección. Los resultados mostraron un incremento en la

incidencia de la infección en los frutos tratados por 1-MCP a ambas concentraciones, que fue estadísticamente significativa a los 4 y 5 días (Figura 18).

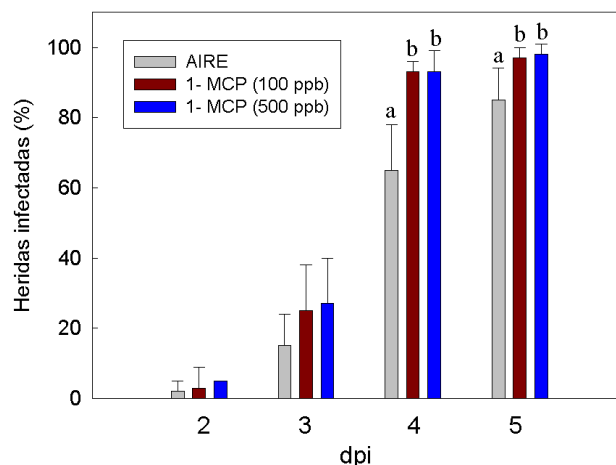


Figura 18. Incidencia de la infección en frutos de 'Clemenules' tratados con diferentes concentraciones de 1-MCP e inoculados con *P. digitatum* a 5×10^3 con/mL, frente a frutos tratados con aire. El seguimiento de la infección se realizó a los 2, 3, 4 y 5 días después de la infección (dpi). Los resultados se representan como valores medios del porcentaje de infección \pm SD para cada tratamiento y día. En cada tratamiento se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Para cada día se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Actividades con distintas letras fueron consideradas significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En diferentes experimentos realizados con mandarinas 'Clemenules' y dosis mayores de hongo, aunque se apreció un aumento modesto de la incidencia de la infección con el pretratamiento con 1-MCP, dicha diferencia no alcanzó significación estadística. La causa de que no se obtuvieran resultados significativos a mayores dosis de hongo podría deberse al hecho de que los frutos de 'Clemenules' son muy sensibles a la infección, por lo que el desarrollo de la podredumbre es muy rápido, y sólo permite observar diferencias significativas entre muestras tratadas y no tratadas a concentraciones reducidas del hongo.

Por otro lado, el tratamiento con 1-MCP en frutos que posteriormente fueron infectados con *P. digitatum* supuso la sobreproducción de ET frente a frutos que no habían sido pretratados (Figura 19). Este aumento en la producción de ET puede ser debido tanto al fruto, por detenerse el mecanismo de autoinhibición que el ET tiene sobre su propia síntesis, como por el hongo, ya que al inhibir el 1-MCP los mecanismos de defensa del fruto se facilitarían el desarrollo del patógeno.

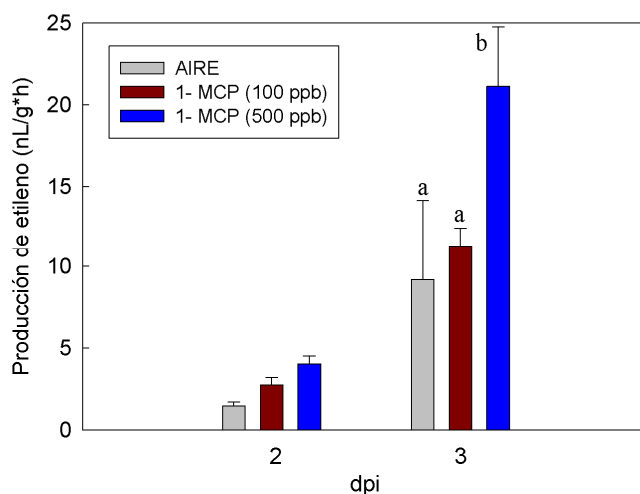


Figura 19. Producción de ET en frutos de 'Clemenules' tratados con dos concentraciones de 1-MCP e infectados con *P. digitatum* (5×10^3 con/mL) frente a frutos tratados con aire. El análisis se realizó a los 2 y 3 días después de la infección (dpi). Los resultados se presentan como valores medios de la producción de ET \pm SD para cada tratamiento y día. En cada tratamiento se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto). Para cada día se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Valores con distintas letras fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

2. Análisis de una biblioteca sustractiva enriquecida en genes inducidos durante la infección de frutos de naranja 'Navelina' por el hongo *P. digitatum*.

Como primera aproximación experimental para el estudio de la expresión diferencial de los genes del fruto en respuesta al proceso de infección, se hizo uso de una macromatriz de cDNA elaborada a partir de una colección de cDNAs enriquecida en genes inducidos en respuesta a la infección.

2.1. Utilización de una biblioteca de cDNA con expresión diferencial durante la infección elaborada mediante la técnica de Hibridación Sustractiva mediada por PCR Supresiva (SSH) y de una macromatriz de cDNA generada a partir de ella.

Previamente, en nuestro grupo se construyó una biblioteca sustractiva de cDNA, llamada RindPdigS, enriquecida en genes que se expresan más abundantemente en la corteza de naranja 'Navelina' a las 24^oh después de la inoculación por *P. digitatum* con respecto a un control de respuesta a herida mecánica (Gonzalez-Candelas *et al.*, 2005).

Se seleccionaron al azar 1.436 clones individuales de la biblioteca RindPdigS para la construcción de una macromatriz de cDNA. Estos clones fueron amplificados por PCR y depositados en una membrana de nailon. Además, se añadieron 100 controles (véase "Materiales y Métodos"), entre los que se encuentran tanto controles negativos de amplificación de PCR y de vector, como controles positivos, correspondientes a genes cuya expresión había sido previamente estudiada por nuestro grupo. En este último caso destacan los genes *CsACO*, *CsACS1* y *PAL* cuya inducción diferencial durante la infección había sido confirmada y que, por lo tanto, fueron incluidos en la macromatriz como controles positivos.

2.2. Hibridación diferencial de la macromatriz con muestras de infección y de herida.

En un primer experimento, la macromatriz fue hibridada con sondas obtenidas a partir de las mismas poblaciones de mRNA empleadas en la construcción de la biblioteca. La comparación entre las imágenes de hibridación de ambas sondas reveló la presencia en RindPdigS de clones con expresión diferencial en respuesta a la infección (Figura 20). Así, el análisis de los datos de hibridación con el paquete informático ArrayVision y ArrayStat reveló que 338 (23 % del total) clones se inducían en infección (I) respecto a herida (W) (Figura 21). No obstante, también se detectó la existencia de 58 clones que mostraban represión durante la infección respecto a la herida.

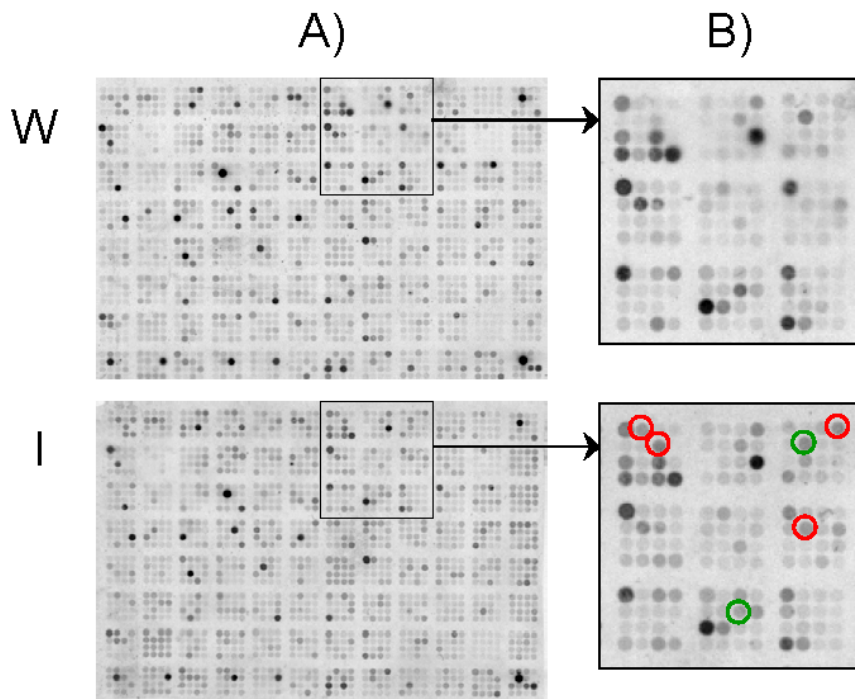


Figura 20. Imágenes comparadas de la hibridación de la macromatriz generada a partir de la biblioteca RindPdigS. A) Imagen comparativa de las hibridaciones con tejido de naranjas heridas (W) o infectadas con *P. digitatum* (I). B) detalle de las hibridaciones donde se muestra la presencia de 4 clones que se inducen durante la infección (○) y dos clones que se reprimen (○).

Globalmente, 396 clones de la macromatriz (el 27% del total) mostraron expresión diferencial durante el proceso de infección. Estos resultados preliminares indicaban que la genoteca RindPdigS estaba enriquecida en clones con mayor expresión en infección que en herida. Además, se confirmó que el uso de macromatrices a partir de una biblioteca sustractiva es una herramienta efectiva para el análisis de la respuesta del fruto cítrico a la infección por *P. digitatum*.

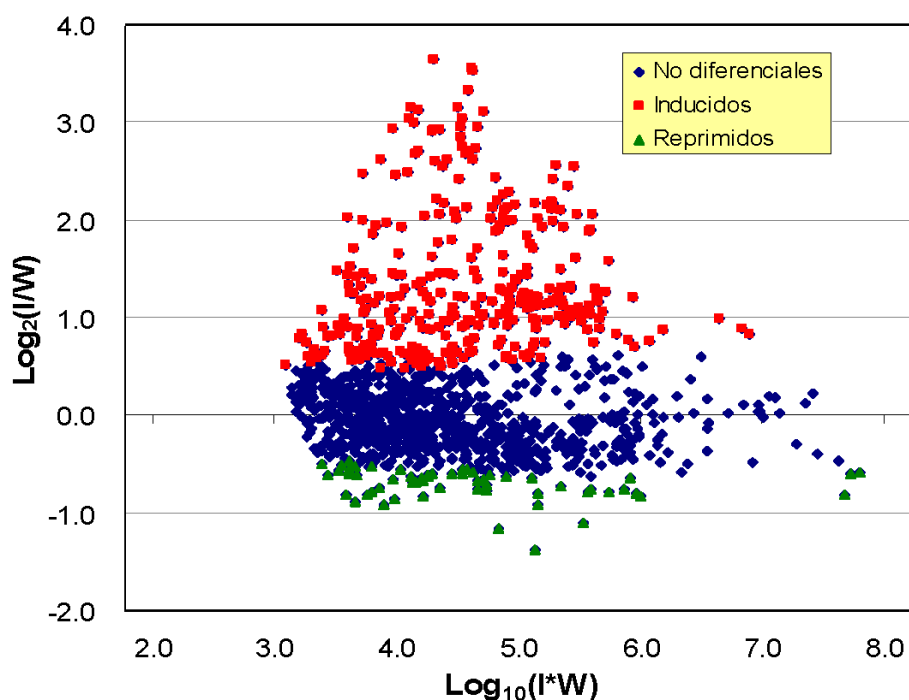


Figura 21. Gráfico obtenido con el programa ArrayStat a partir del análisis de expresión que relaciona la intensidad de señal ($\text{Log}_{10}(I \times W)$) frente a la expresión diferencial ($\text{Log}_2(I/W)$) para cada clon de la macromatriz.

2.3. Identificación de cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta de los frutos cítricos al etileno, la herida y/o la infección.

A partir de estos resultados, se diseñó una serie de experimentos para estudiar la posible implicación del ET como mediador de la expresión de genes relacionados con la respuesta a la infección. Para ello, se

obtuvieron muestras de RNA procedentes de frutos de naranja 'Navelina' tratados con ET (10 ppm) y frutos tratados con aire como control, siempre en ausencia de infección. En el estudio comparativo de la expresión de los clones de la macromatriz en cada una de las cuatro condiciones; aire (A), ET (E) herida (W) e infección (I), se realizaron un total de 3 réplicas técnicas para cada una de las condiciones. Los valores de las señales de hibridación obtenidos fueron cuantificados y procesados mediante los programas Array Vision y Array Stat, respectivamente, y así se pudo determinar los cambios estadísticamente significativos entre las distintas condiciones mediante análisis por parejas. De este modo, se obtuvieron seis comparaciones diferentes E/A, W/A, I/A, W/E, I/E e I/W. Los resultados se expresaron en forma de \log_2 de los cocientes para los 1.536 clones individuales de la macromatriz (véase material adicional).

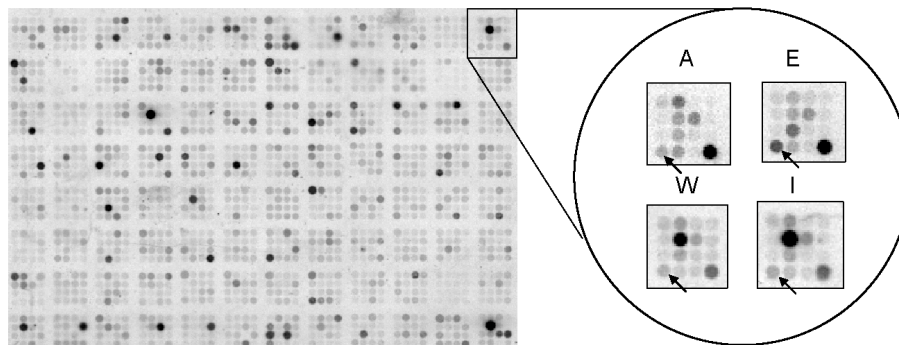


Figura 22. Detalle representativo de la hibridación de las macromatrices. En el cuadrante 12A, se aprecia un clon con expresión diferencial en la condición de tratamiento con ET (E) respecto de las condiciones de aire (A), herida (W) e infección (I)

A partir de las imágenes de hibridación se detectó la presencia de clones con expresión inducida por la aplicación de ET (Figura 22). De este modo, se pudo observar que 300 clones de la macromatriz se indujeron por el tratamiento con ET (21% del total), de los cuales 166 se indujeron también por la infección (55% de los clones inducidos por ET) (Figura 23 y material adicional). Es de destacar que el 44% de los clones que se indujeron por la infección no lo hacían por la herida, lo que sugiere que tienen una expresión diferencial en la respuesta a patógenos. Hay 24 clones con expresión específica durante la infección, entre los cuales destaca la presencia de un gen con homología a cafeína sintasa

(agrupamiento P-62). Respecto a los clones que se reprimen durante las diferentes condiciones se observa que, en general, son menos abundantes que los que se inducen, siendo la categoría de infección la que tiene más representantes.

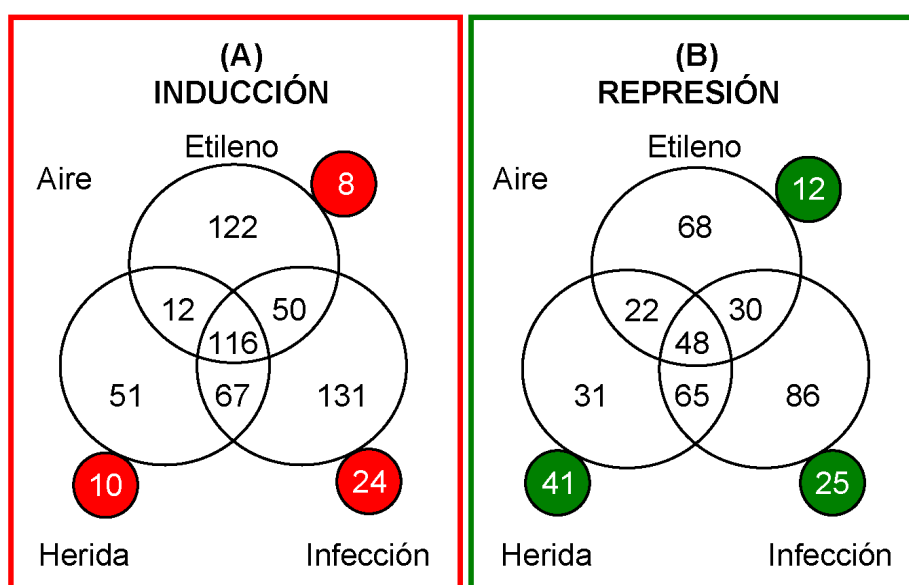


Figura 23. Diagramas de Venn que muestran la distribución de los clones de RindPdigS presentes en la macromatriz según sus patrones de expresión diferencial, inducidos (A) o reprimidos (B) respecto a aire para las condiciones de herida, infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) o aplicación de ET exógeno (10 ppm). En la categoría de inducción, los círculos rojos indican el número de clones que sólo se expresan en la categoría a la que van unidos. Para el caso de represión, los círculos verdes indican el número de clones que solamente no se expresan en la categoría a la que van unidos. El análisis de los datos de hibridación se realizó con el programa informático ArrayStat. El análisis estadístico se realizó con la herramienta SAM (Significance Analysis of Microarrays) con un FDR del 1%.

Hay que tener en cuenta que el estudio se circunscribe a un momento puntual y temprano del desarrollo de la infección (24 horas después de la inoculación) y que, previsiblemente, la mayoría de los genes pueden tener además una regulación temporal. Estos resultados, por lo tanto, solamente nos proporcionan una perspectiva temporal limitada del desarrollo de la infección. Por ello, consideramos necesario hacer un estudio temporal de los genes más relevantes por su comportamiento o su

anotación funcional mediante hibridaciones Northern (véase apartado 5 de Resultados). De todos modos, los resultados obtenidos de la hibridación de las macromatrices indican la alta complejidad de la regulación de la expresión génica del fruto durante el proceso de infección y la importancia del ET como mediador de al menos una parte de esta respuesta.

2.4. Secuenciación y análisis de las secuencias de RindPdigS.

A partir de los resultados obtenidos con las hibridaciones de la macromatriz, se decidió proceder a la secuenciación de un número significativo de clones. Para ello, nos basamos en dos criterios de selección; por un lado, todos aquellos clones que mostraron una alta señal de hibridación o aquellos que mostraron una inducción de al menos tres veces en infección respecto a herida. Además, todas y cada una de las categorías de expresión, tanto por inducción como por represión, debían tener algún representante secuenciado en una proporción similar.

Se seleccionaron un total de 371 clones para su secuenciación. El análisis de sus secuencias reveló que sólo 15 de los clones secuenciados contenían 2 insertos y 1 clon contenía 3 insertos, lo que significa una baja proporción de concatémeros (4,3 % del total). El análisis de agrupamientos de secuencias con el programa SEQtools (<http://www.seqtools.dk>) mostró la presencia de 229 ESTs distintas designadas como unigenes. De estos 229 unigenes 167 correspondían a secuencias únicas y 198 secuencias estaban reunidas en 62 clusters o agrupamientos, que van desde el P-01 al P-62 (Tabla 3 y material adicional). Por lo tanto, la biblioteca mostró una redundancia del 37,3%.

Tabla 3. Características generales del agrupamiento de las ESTs de la colección RindPdigS después de su secuenciación.

Datos de agrupamiento de RindPdigS	
Secuencias totales	388
Secuencias válidas (ESTs)	365
ESTs en agrupamientos	198
Nº total de agrupamientos	62
ESTs únicas	167
ESTs distintas (unigenes)	229
Redundancia (%)	37,3

$$\text{Redundancia} = (1 - (\text{unigenes} / \text{ESTs})) \times 100$$

Mediante el uso del algoritmo BLASTX, las secuencias de DNA fueron traducidas en secuencias de aminoácidos en las seis posibles pautas de lectura y se compararon con la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI (centro nacional para la información biotecnológica) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hay casos en los que diferentes unigenes mostraron homología con diferentes regiones de una misma proteína sin llegar a compartir entre ellos ninguna región solapante. Para detectar este hecho se realizó un alineamiento con secuencias de genes homólogos en bases de datos. De este modo se descubrió que los agrupamientos P-07 y P-08 alinean en dos regiones contiguas del gen *ACO* de *C. sinensis*, estando separados por un sitio de restricción *RsaI*. Lo mismo ocurrió con los unigenes N14G04, P-03 y P-27, que tienen alineamientos adyacentes con una misma proteína de unión a FAD, con homología a Nectarina 5.

Para la asignación de las categorías funcionales correspondientes a cada secuencia de acuerdo con sus homólogos en *A. thaliana*, se utilizó la base de datos del MIPS (centro de información de secuencias de proteínas -Munich) (<http://mips.gsf.de>). La Tabla 4 resume la distribución entre las diferentes categorías funcionales de los clones secuenciados de RindPdigS. La mayoría de dichas proteínas putativas están relacionadas

con el metabolismo (15% del total), seguido por las proteínas de localización en orgánulos celulares (9%) y proteínas estructurales o catalíticas (7%). La distribución de las ESTs dentro de la categoría de metabolismo reveló que el metabolismo secundario y el metabolismo de aminoácidos (38% y 27%, respectivamente, de las ESTs implicadas en metabolismo) son las dos subcategorías más representadas y, por lo tanto, estos resultados pueden ser indicativos de un direccionamiento del metabolismo general del fruto hacia estas rutas, que pueden estar relacionadas con la respuesta a estrés de las plantas.

Tabla 4. Distribución de las ESTs de la biblioteca RindPdigS con homólogos en *A. thaliana* en categorías funcionales, usando la base de datos del MIPS.

Categoría funcional	%
Sin clasificación funcional	30
Metabolismo:	15
Metabolismo secundario	38
Aminoácidos	27
Carbohidratos	17
Nucleótidos	6
Lípidos, ácidos grasos e isoprenoides	6
Metabolismo general	4
Vitaminas, cofactores y grupos prostéticos	1
Nitrógeno y azufre	1
Localización en orgánulos celulares	9
Proteína estructural o catalítica	7
Sin proteína similar en <i>Arabidopsis</i>	6
Síntesis de proteínas	5
Transporte celular	5
Biogénesis de componentes celulares	4
Destino de proteínas	3
Energía	3

Defensa de la célula	2
Regulación de la actividad proteica	2
Interacción con el medio ambiente	1
Transcripción	1
Comunicación celular/Transducción de señal	1
Destino celular	1
Diferenciación de órganos	1
Ciclo celular y procesamiento del DNA	1
Desarrollo sistémico	1
Otros	2

2.5. Caracterización transcripcional de la respuesta de frutos de naranja 'Navelina' a la infección por *P. digitatum*.

A partir de los datos de secuencia y de hibridación, se realizaron dos tipos de aproximaciones diferentes para caracterizar el perfil transcripcional de los frutos bajo nuestras condiciones de estudio, teniendo en cuenta, por un lado, la abundancia de las ESTs y por otro la expresión diferencial de sus correspondientes genes.

Análisis de la abundancia de las ESTs secuenciadas.

La Tabla 5 muestra los agrupamientos formados por 4 o más ESTs dentro del conjunto de los ESTs secuenciados, e ilustra la respuesta global de los cambios de expresión de los frutos cítricos específicamente como respuesta a la infección, ya que provienen de una biblioteca sustraída.

Una vez determinados los unigenes más abundantes, se hizo un estudio de su comportamiento durante la infección a partir de los resultados de hibridación. Para ello, se determinó el logaritmo en base 2 del cociente de las intensidades en infección y en herida, así como el perfil más representado entre los clones que forman parte del cluster. La expresión durante la infección de los 5 unigenes más abundantes (una proteína sin homólogo en *A. thaliana* (P-02), una proteína con dominio de unión a FAD (P-03), una DAHP sintasa (*DAHP*) (P-01), una ACC oxidasa

Resultados

(P-07) y una proteína abundante embrionaria (EMB) (P-10) es superior al doble de la expresión en respuesta a la herida, hecho que se refleja en la tabla con un valor de logaritmo en base dos mayor que 1. En los casos de la proteína ribosomal de *Aspergillus* (P-09) y en la cafeína sintasa (P-62) no se ha podido calcular el cociente debido a que no se detectó expresión en respuesta a la herida.

Tabla 5. Anotación de los unigenes que contienen 4 o más ESTs de la colección RindPdigS.

Cluster	Anotación	Nº Acceso	Valor E	Nº ESTs	Log ₂ (I/W)	Perfil transcripcional
P-02	Sin homología	-	-	11	1.97±0.87	I>EWA
P-03	Proteína de unión a FAD	NP_181025.1	1.E-08	11	2.63±0.43	I>EW>A
P-01	DAHP sintasa	AAN77866.1	3E-26	10	1.09±0.24	I>W>E>A
P-07	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	AAG49361.1	5E-36	9	1.97±0.25	I>EW>A
P-10	Proteína abundante embrionaria	NP_181669.1	3E-25	7	2.55±0.42	I>E>WA
P-09	Proteína ribosomal de la familia L18ae	EAA66532.1	9E-32	6	-	I>EWA
P-04	Cistinosina	P57758	5E-35	5	0.15±0.16	E>IWA
P-05	Sin homología	-	-	5	0.47±0.54	I>EWA
P-11	Ácido homogentísico geranilgeranil transferasa	AAP43912.1	8E-12	5	1.14±0.32	I>EW>A
P-06	Proteína de la familia de los transportadores ABC	NP_181179.2	1E-19	4	1.24±0.23	I>EWA
P-08	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	AAG49361.1	2E-60	4	1.92±0.18	I>EW>A
P-14	Proteína de la familia de las ciclasas	NP_567957.1	2E-37	4	0.02±0.37	E>IWA
P-15	Proteína ribosomal 40S S5	XP_658447.1	3E-30	4	1.20±0.18	I>EWA
P-46	Dicianina	AAF66242.1	3E-33	4	1.15±0.36	I>W>EA
P-53	Sin homología	-	-	4	0.03±0.13	EA>IW
P-62	Cafeína sintasa	BAE79730.1	2E-20	4	-	I

El perfil general de expresión de los genes más abundantes fue de inducción con la infección y en menor nivel, pero también de forma significativa, con la herida y el tratamiento con ET. Sin embargo, 3 agrupamientos de los más abundantes tienen un comportamiento diferente al comportamiento general. En estos casos, la expresión en respuesta al tratamiento con ET es mayor que en el resto de condiciones, como es el caso de una cistinosina (P-04) y una proteína perteneciente a la familia de las ciclasas (P-14). En el caso del agrupamiento P-53, sin homología con secuencias conocidas, su expresión presentó una regulación negativa tanto por herida como por infección.

Análisis de expresión.

Otro tipo de aproximación para la caracterización del perfil transcripcional consistió en el estudio de los genes con mayor expresión diferencial. Para ello, se hizo un análisis de los genes con mayor nivel de inducción en infección respecto a herida (.). Los cinco primeros genes que codifican una proteína hipotética (P-18), una cafeína sintasa (P-62), dos proteínas sin homólogas en *A. thaliana* (N14G12 y N17C02) y una proteína expresada (N17E10), no tuvieron expresión en las condiciones de tratamiento con aire y herida; sin embargo, su expresión en infección fue considerablemente alta. Por ello, aunque no se pueda medir su expresión relativa, son de gran interés, tanto por su alta expresión durante la infección, como por su especificidad respecto a las demás condiciones. Uno de ellos, el que codifica una cafeína sintasa, es de especial interés por su relación con el metabolismo de alcaloides. Entre los genes con mayor expresión diferencial en infección respecto a herida se encuentra un citocromo P450 79A1 (P-43), con baja expresión en respuesta a ET y herida, y dos nectarinas (P-27 y N14G04), con expresión fundamentalmente en respuesta a la infección. De los genes con mayor expresión durante la infección, existen algunos cuya expresión inducida por ET fue también alta respecto a aire. Este es el caso de varios genes que codifican una proteína expresada (N07B09), una EMB (P-10), una tropinona reductasa (N08F02) y una proteína celular implicada en apoptosis (N13E10). Por otro lado, en este análisis hay tres ESTs con homología con genes fúngicos y que, por lo tanto, es de suponer que proceden del hongo y no del fruto (P-18, P-31 y N06E04). La presencia de estos transcritos sólo es esperable en la muestra de infección, pues es la única con presencia del hongo, sin embargo, los resultados de las

hibridaciones de las macromatrices mostraron que los unigenes P-31 y N06E04, con homología a proteínas de hongo, tenían una expresión significativa en muestras que no habían sido infectadas. Esto puede explicarse porque estos genes presentan alta similitud con los genes homólogos de plantas.

La Tabla 5 y la muestran, por tanto, los resultados de dos aproximaciones diferentes para el estudio comparativo de la respuesta transcripcional del fruto frente a la infección, a la herida o al tratamiento con ET. En ambos análisis es de resaltar la alta abundancia de ESTs con homología a genes de plantas implicados en metabolismo secundario.

Tabla 6. Unigenes con mayor inducción en infección respecto a herida de la biblioteca RindPdIgS.

Clon/ Cluster	Anotación	Nº Acceso	Valor E	Nº ESTs	Log ₂ (E/C)	Log ₂ (W/C)	Log ₂ (I/C)	Log ₂ (I/W)	I/W
P-18	Hipoaléctico proteína AN7411.2	BAE61782.1	2E-28	3	-	-	-	-	-
P-62	Cafeína sintasa	BAE79730.1	2E-20	4	-	-	-	-	-
N14G12	Sin homología	-	-	1	-	-	-	-	-
N17C.02	Sin homología	-	-	1	-	-	-	-	-
N17E11	Proteína expresada	NP_190988.1	3E-06	1	-	-	-	-	-
P-43	Citocromo P450 79A1	Q43135	3E-29	2	0,36	0,24	3,71	3,0	3,0
P-27	Nectarina 5	AAAP30841.1	7E-15	3	0,60±0,21	0,12±0,34	3,24±0,23	3,16±0,12	8,97±0,76
N06C.12	Secuencia de baja calidad	-	-	1	2,34	-0,27	2,82	3,13	8,74
P-31	Proteína transportadora ADP/ATP	BA C82547.1	1E-16	2	0,48	-1,39	1,66	3,09	8,50
N14G.04	Nectarina 5	AA P30841.1	4E-46	1	0,25	0,30	3,17	2,92	7,55
P-26	Proteína desconocida	AA L32635.1	2E-24	2	-0,67	-0,25	2,60	2,88	7,36
N07B.09	Proteína expresada	NP_565660.1	2E-13	1	2,17	0,05	2,71	2,70	6,49
N06E.04	Poli galacturonasa	BAA77297.1	5E-22	1	-0,55	0,22	2,81	2,63	6,17
P-10	"Embryo-abundant protein"	NP_181669.1	3E-25	7	1,90±0,26	-	2,49±0,40	2,55±0,42	6,03±1,62
N11D.06	Factor de elongación EF1	CAA65435.1	3E-24	1	-	-	-	2,53	5,76
P-03	Proteína con dominio de unión a FAD	NP_181025.1	1E-08	11	0,64±0,21	0,54±0,55	1,95±0,28	2,17±1,26	5,63±0,70
N08F.02	Probable tropinona reductasa	C84693	2E-21	1	1,65	0,23	2,46	2,26	4,80
N07E.06	Proteína relacionada con deshidratación	NP_174468.1	4E-83	1	0,39	0,61	2,80	2,22	4,67
P-16	Proteína de resistencia pleiotrópica a otro gas	BA B92011.1	2E-15	3	-1,05±0,25	-0,07±0,16	1,99±0,07	2,17±1,26	4,50±5,46
P-21	P046807.6	NP_915910.1	7E-06	2	-1,05±0,25	-0,07±0,16	1,99±0,07	2,10±0,08	4,29±0,25
N13E10	Proteína de apoptosis celular	NP_182175.1	2E-15	1	1,36	1,76	3,76	2,04	4,12
N12G.08	Transportador de fosfato mitocondrial	AH59632.1	2E-57	1	0,84	-0,23	1,75	2,02	4,05

3. Generación de bibliotecas de cDNA de genes expresados durante la infección.

Durante este trabajo de tesis se han empleado tres bibliotecas de cDNA. Además de RindPdigS, elaborada previamente al inicio de esta tesis, dentro del marco del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP), se procedió a la construcción de dos bibliotecas más de cDNA, RindPdig24 y PostharvP1.

3.1. Construcción de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1.

En primer lugar, se determinó la calidad del RNA que se iba a utilizar para la síntesis de cada biblioteca, mediante hibridación Northern, empleando como sonda el gen *ACO* previamente caracterizado por nuestro grupo (véase Figura 17). Como ejemplo representativo, en la Figura 24 se observa la hibridación Northern de las diferentes muestras de RNA utilizadas en la elaboración de PostharvP1, procedentes de frutos infectados y heridos, a diferentes tiempos.

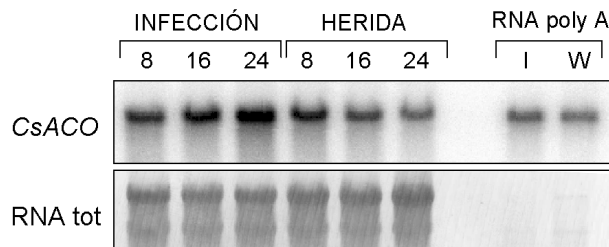


Figura 24. Análisis Northern del material utilizado en la síntesis de la biblioteca de cDNA PostharvP1. Las muestras corresponden a RNA total de corteza de frutos de mandarina 'Clemenules' después de ser inoculados con agua (HERIDA) o con 10^6 conidios/mL de *P. digitatum* (INFECCIÓN) a las 8, 16 ó 24 horas después de la inoculación, y a los RNA polyA obtenidos a partir de la mezcla de estas mismas muestras, hibridadas con una sonda del gen *CsACO*. La tinción con azul de metileno mostró el RNA total.

Las muestras de herida e infección fueron mezcladas en cantidades equimoleculares, y sometidas a una purificación del RNA Poly A. De este modo, se comprobó la calidad de cada uno de los RNAs que formaron la mezcla de RNAs utilizada para la síntesis de PostharvP1.

La biblioteca RindPdig24 se construyó con el fago λ Zap, por lo que la titulación se realizó por recuento de “calvas” de lisis de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF en placas de agar NZY. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de la solución de empaquetamiento, se sembraron en placas de NZY agar, después de 16 horas y se hizo recuento de las “calvas”. La titulación de la biblioteca primaria de RindPdig24 fue de $2,0 \times 10^6$ pfu.

En la colección PostharvP1, construida en un plásmido derivado de pENTR 1A, la titulación se hizo por crecimiento en placas de $2 \times$ LB suplementadas con kanamicina de diluciones seriadas de células transformadas. El título de esta biblioteca primaria fue de $1,0 \times 10^6$ cfu.

El porcentaje de fagos recombinantes en la colección RindPdig24 se determinó a partir del recuento de “calvas” azules y blancas, incubando la reacción de empaquetamiento con XL1-Blue MRF y creciendo las células en medio NZY agar con X-gal, de modo que las calvas originadas por el fago sin inserto presentaban color azul, mientras que las que incorporaron el inserto eran de color blanco. Se observó que el porcentaje de calvas blancas era prácticamente del 100%.

En el caso de la colección PostharvP1, no se hizo un estudio del porcentaje de clones con inserto, pero sí que se optimizó el proceso de ligación tal como se describe en Materiales y métodos, apartado 8.2.

Para estudiar el tamaño medio de inserto de la biblioteca RindPdig24, se realizaron reacciones de PCR a partir de 20 placas de lisis diferentes, elegidas al azar, y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR (Figura 25), determinándose un tamaño medio de los insertos de 760 bp.

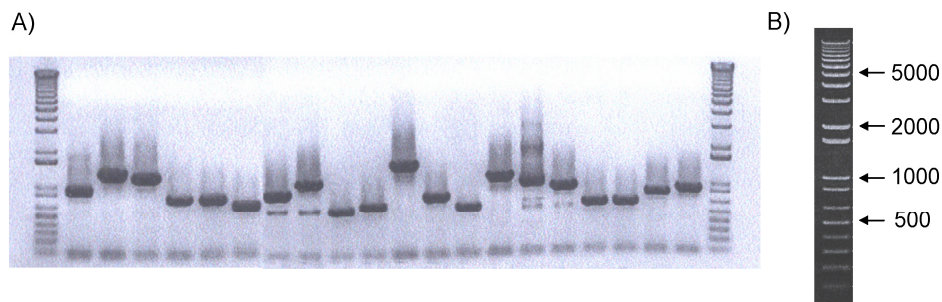


Figura 25. Estimación del tamaño medio de los insertos de cDNA clonados en la biblioteca RindPdig24. A) Se muestra el resultado de los productos de PCR de 20 fagos, escogidos al azar, en un gel de agarosa al 1%. B) Patrón de tamaños moleculares de 1 Kb (DNA ladder 1 Kb Plus, Invitrogen).

En el caso de la biblioteca PostharvP1, el tamaño medio de los insertos se determinó mediante digestión de los plásmidos con enzimas de restricción y posterior visualización mediante electroforesis en gel de agarosa con BrEt de 24 muestras de cada una de las 10 placas de 96 pocillos, (imágenes no mostradas). El valor del tamaño de inserto fue aproximadamente de 1500 pb.

3.2. Comparación de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1.

De RindPdig24 se secuenciaron 1.152 clones, obteniéndose un total de 1.056 buenas secuencias. En el caso de PostharvP1 se secuenciaron 1.118 clones con 1.008 buenas secuencias. Una vez secuenciadas y procesadas las ESTs aisladas y purificadas de las dos colecciones, se determinó, mediante las herramientas de agrupamiento de secuencias incluidas en el programa SEQtools, aquellas ESTs que forman parte de un mismo agrupamiento y aquellas que no comparten secuencia con ninguna otra EST dentro de la misma genoteca. De este modo, se pudo calcular el número de unigenes correspondientes a cada colección. La Tabla 7 muestra los valores generales de ambas colecciones. El estudio estimativo del porcentaje de recombinantes en RindPdig24 había indicado que más del 95% de fagos contenían inserto. Este hecho fue confirmado después de la secuenciación, ya que en RindPdig24 únicamente se obtuvieron 3 clones sin inserto, el mismo número que se detectaron en

PostharvP1. Una vez analizadas todas las secuencias, el porcentaje de secuencias válidas fue superior al 96%. La colección RindPdig24 tuvo un número mayor de secuencias únicas (“singletons”) y un menor valor de redundancia que la colección PostharvP1.

Tabla 7. Estadísticas de las bibliotecas de cDNA RindPdig24 y PostharvP1 y del conjunto de ambas bibliotecas.

Colección de cDNA	RindPdig24	PostharvP1	Total
Clones	1.152	1.056	2.208
ESTs ^a	1.116	1.018	2.134
“Singletons”	764	686	1.450
Agrupamientos	143	119	262
ESTs en agrupamientos	352	332	684
Unigenes ^b	907	805	1.712
Redundancia (%) ^c	19	21	20

^a Secuencias sin vector con más de 50 bases de buena calidad.

^b Unigenes = singletons + agrupamientos

^c Redundancia = $(1 - (\text{Unigenes}/\text{ESTs})) \times 100$

Con el fin de estimar el número de ESTs procedentes de *P. digitatum* presentes en ambas bibliotecas, se consideró que aquellas secuencias cuyo homólogo más cercano fuese de origen fúngico deberían proceder de *P. digitatum*. De este modo, el 1,7% y 1,5% de las secuencias se consideraron de origen fúngico en RindPdig24 y PostharvP1, respectivamente.

La distribución de los unigenes de ambas biblioteca de cDNA según su anotación y según su categoría funcional se muestra en la Figura 26 y Figura 27. En PostharvP1, el 96% de los unigenes mostraron homología con proteínas de *A. thaliana*, mientras que sólo el 81% de los unigenes de RindPdig24 mostraron dicha homología. La categoría de “Metabolismo” es la que contiene mayor cantidad de unigenes, estando más representada en

PostharvP1, donde llega al 48%, mientras que en RindPdig24 abarca al 40% del total de unigenes.

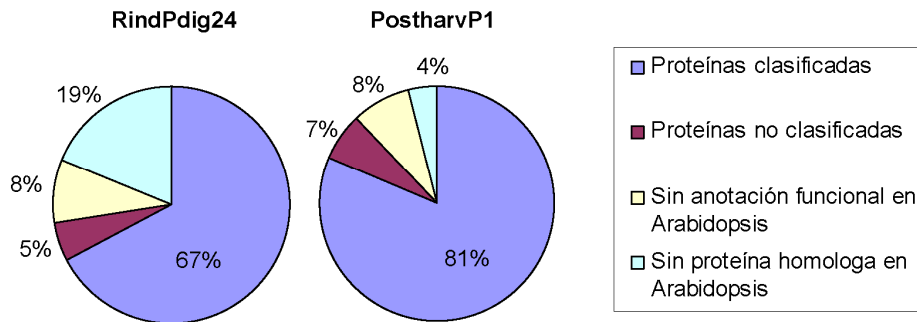


Figura 26. Distribución de los unigenes de las bibliotecas RindPdig24 y PostHarvP1.

En la Figura 28 se muestra una comparación de la distribución de agrupamientos en las dos bibliotecas. PostharvP1 contiene mayor cantidad de agrupamientos con alto número de ESTs. Sin embargo, como se indica en la Tabla 7, es RindPdig24 la que tiene mayor cantidad de agrupamientos y de ESTs en agrupamientos, debido a la gran cantidad de agrupamientos con cuatro ESTs. En la Tabla 8 se muestran los agrupamientos con 4 o más ESTs en alguna de las dos colecciones. Se observa que varios agrupamientos de los más abundantes no están presentes en las dos bibliotecas de cDNA. De hecho, tres agrupamientos de los más abundantes en PostharvP1, con homología a un factor de elongación alfa con 13 representantes, una proteína caja-MAD (“MAD-box”) con 9 representantes, y una fructosa-bifosfato aldolasa con 8 representantes, no están presentes en RindPdig24.

De acuerdo con la abundancia de agrupamientos, los genes que codifican metalotioneínas son los que tienen mayor expresión en los tejidos de los que proceden ambas bibliotecas, ya que están presentes en dos de los agrupamientos más abundantes y además están presentes en las dos colecciones, con un total de 19 ESTs.

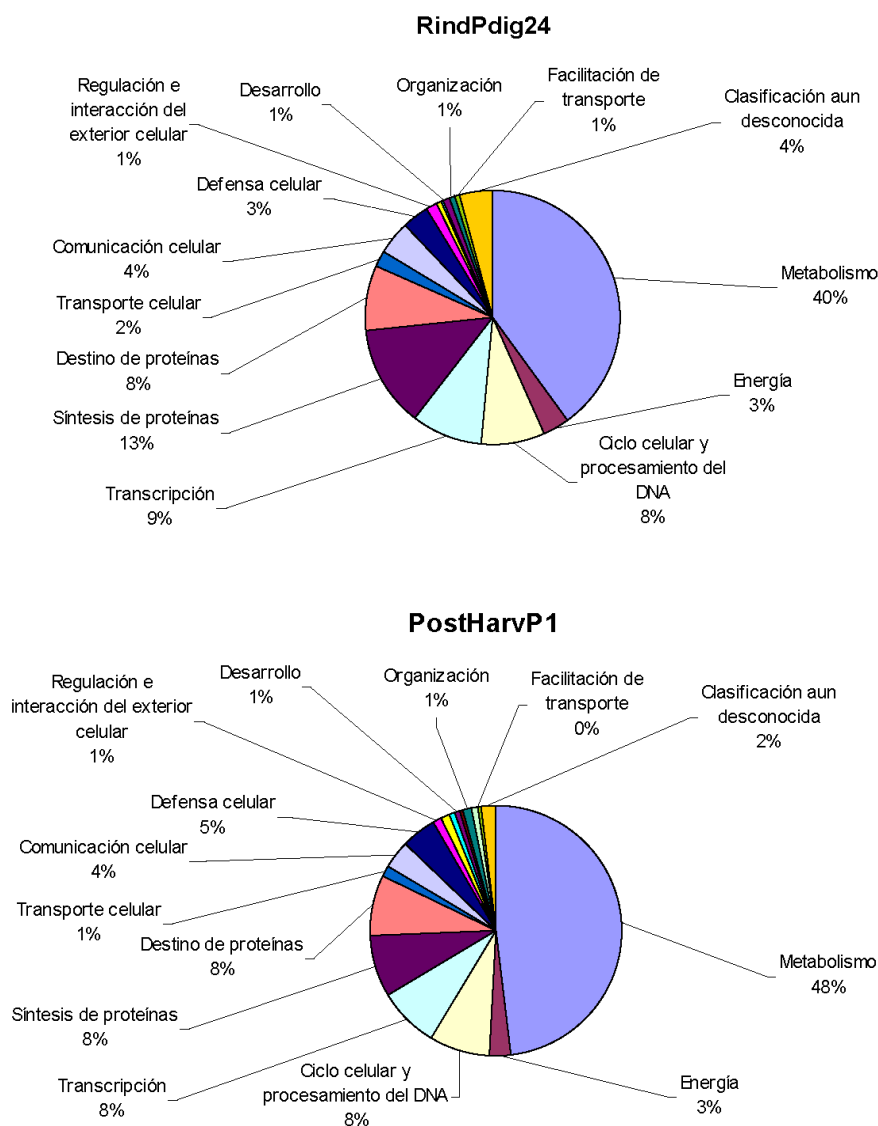


Figura 27. Distribución en categorías funcionales de los unigenes de las bibliotecas RindPdíg24 y PostHarvP1 con homólogos en *A. thaliana*.

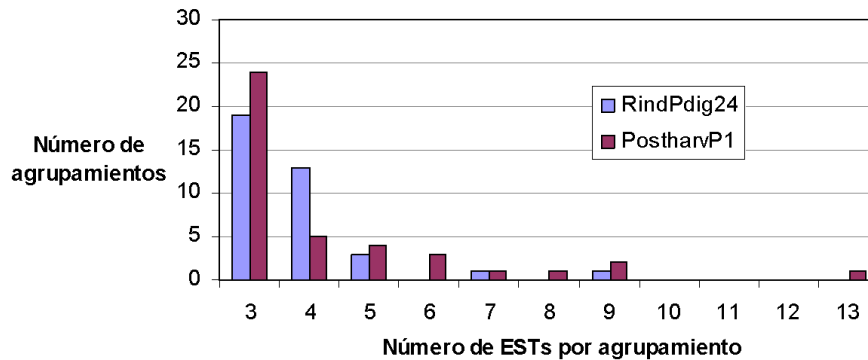


Figura 28. Distribución de los agrupamientos en las bibliotecas RindPdig24 y PostharvP1.

Otros agrupamientos con varias ESTs en ambas bibliotecas mostraron homología con la proteína de choque térmico HSP80, glutation S-transferasa, S-adenosilmetionina sintetasa 2 y tiorredoxina H. Destaca la presencia de genes relacionados con el metabolismo redox, como son una glutation S-transferasa, tiorredoxina, ferredoxina y glutation peroxidasa; el metabolismo del ET, como la ACC oxidasa y S-adenosilmetionina sintetasa, o la desviación del metabolismo primario hacia la síntesis de isoprenoides, como la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, isopentenil pirofosfato isomerasa y fosforribosil antranilato transferasa. El gen ACO también aparece formando agrupamientos en ambas colecciones, al igual que un gen que codifica una dehidrina.

Tabla 8. Anotación de los unigenes que contienen 4 o más ESTs en alguna de las bibliotecas RindPdig24 o PostharvP1.

N° de ESTs				
Rind Pdig24	Post HarvP1	Anotación	Proceso biológico GO	Valor-E
0	13	Factor de elongación 1-alfa	Biosíntesis de proteínas	1E-147
9	3	Metalotioneina	-	1E-35
0	9	Proteína caja- MADS 4	Factor de transcripción	1E-107
2	9	Dehidrina	-	9E-69
0	8	Fructosa bifosfato aldolasa	Fructosa bifosfato aldolasa	1E-123
2	6	Proteína de choque térmico 80	Plegamiento de proteínas	1E-136

2	6	Glutation S-transferasa	Glutación transferasa	4E-80
7	1	Sin homología	-	
0	7	Poliubiquitina	Envejecimiento	E-110
4	3	Metalotioneina	-	2E-15
4	3	S-adenosilmetionina sintetasa 2	Síntesis de S-adenosilmetionina	4E-13
4	3	Tiorredoxina H	Transporte de electrones	5E-57
0	6	Proteína de la familia citocromo P450	Transporte de electrones	1E-110
1	5	Adenosilhomocisteinasa	Metabolismo de compuestos de un carbono	1E-112
4	2	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa	Biosíntesis de isoprenoides	5E-77
4	2	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	-	1E-117
4	2	Enolasa	-	1E-59
4	2	Sin homología	-	
0	5	Proteína de choque térmico 70	Plegamiento de proteínas	1E-115
0	5	Monodehidroascorbato reductasa	Transporte de electrones	1E-105
0	5	Fosforribosil antranilato transferasa	Biosíntesis de triptófano	1E-104
1	4	Acuaporina	Transporte	3E-90
5	0	Sin homología	-	
5	0	Citocromo C	-	6E-59
5	0	Nodulina de actinorriza	-	1E-16
4	1	Proteína de transferencia de lípidos	Unión a lípidos	1E-77
0	4	Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Ruta del Shikimato)	9E-60
0	4	Proteína asociada al RE (RTNLB2)	Proceso biológico desconocido	6E-76
0	4	Anexina 1	-	5E-96
0	4	Fosforribosil pirofosfato sintetasa	Biosíntesis de nucleótidos	2E-61
4	0	Precursor de ferredoxina [2Fe-2S] fd1	Transporte de electrones	3E-79
4	0	Glutation peroxidasa	Respuesta a estrés oxidativo	1E-79
4	0	Isopentenil pirofosfato isomerasa 2	Biosíntesis de isoprenoides	5E-49
4	0	Proteína ribosomal L32	Síntesis de pentosas fosfato	1E-06
4	0	Fosfogluconato deshidrogenasa	-	5E-35

3.3. Análisis de las bibliotecas PostharvP1, RindPdig24 y RindPdigS en el contexto del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.

Las tres colecciones de ESTs de respuesta de los frutos cítricos a la infección, RindPdig24, PostharvP1 y RindPdigS han sido incorporadas en la base de datos del CFGP junto al resto de colecciones.

A principios del año 2008 la colección completa de ESTs del CFGP estaba formada por 85.965 ESTs de buena calidad a partir de 53 bibliotecas diferentes. Estas ESTs se agrupan en 27.551 unigenes, de los que 11.844 son agrupamientos y 15.707 *singletons*. De estos unigenes, el 41,6% contiene la secuencia completa del gen. Por otra parte, el 76,2% de los unigenes tienen homología con proteínas de *A. thaliana*.

Si se analizan conjuntamente las ESTs de las tres bibliotecas estudiadas en esta tesis, comparándolas con los resultados de las bibliotecas del CFGP, se observa que el 26% de los unigenes no están presentes en ninguna otra biblioteca de cDNA del CFGP.

El análisis de ontologías génicas (GO, Gene Ontology) permite la categorización de genes en clases funcionales, lo que supone la asociación de secuencias individuales a procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Se realizó el análisis GO de las tres colecciones de ESTs y se compararon con el conjunto de las colecciones que forman parte de la base de datos del CFGP, para cada uno de los tres niveles primarios (Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11). El porcentaje de genes sin anotación en las tres colecciones fue siempre menor en las tres categorías cuando se compara con el valor del CFGP, lo que indica que los procesos que ocurren durante la infección, y que están representados por ESTs en las colecciones, son relativamente conocidos.

Tabla 9. Análisis comparativo de Ontologías génicas (GO) en la categoría de “proceso biológico”, para las tres colecciones de infección y para el conjunto de colecciones del CFGP.

Proceso Biológico (%)				
Clasificación GO	PostharvP1	RindPdig24	RindPdigS	CFGP
Sin anotación GO	32.8	46.4	45.7	54.8
Proceso fisiológico celular	23.0	21.3	21.7	14.0
Proceso biológico desconocido	17.7	13.2	12.0	14.5
Metabolismo de macromoléculas	19.9	18.9	12.5	12.8
Biosíntesis	13.0	12.5	11.4	6.3
Metabolismo	7.7	4.4	8.7	4.2
Metabolismo de ácidos nucleicos	5.2	4.3	3.3	5.0
Respuesta a estímulos	5.6	4.8	8.2	3.0
Metabolismo de aminoácidos y derivados	4.5	2.7	6.0	1.7
Proceso fisiológico	1.0	0.7	0.7	0.5
Catabolismo	3.7	3.6	2.7	1.5
Transporte	7.5	4.9	3.8	4.3
Regulación de procesos biológicos	2.6	1.5	2.2	2.9
Transporte de electrones	2.7	3.3	6.5	1.8
Comunicación celular	2.0	1.1	0.5	1.5
Desarrollo	1.6	0.7	1.1	0.6
Muerte celular	0.6	0.3	1.1	0.3
Proceso biológico	0.2	0.4	0.5	0.2
Secreción	0.7	0.4	0.4	0.3
Diferenciación celular	0.1	0.1	0.1	0.1
Fusión de membrana	0.1	0.1	0.1	0.1
Organización de estructuras extracelulares y biogénesis	0.1	0.1	0.1	0.0

Respecto a la categoría “Procesos biológicos” (Tabla 9), destaca la alta proporción de genes en las categorías de “biosíntesis”, “respuesta a estímulos” y “metabolismo de aminoácidos y derivados” de las tres colecciones respecto del total. También es de resaltar la categoría de “muerte celular”, donde la colección RindPdigS tiene proporcionalmente casi cuatro veces más genes que el total de colecciones. En el estudio de

la función molecular (Tabla 10), las tres colecciones tienen mayor proporción de genes en las categorías de actividades oxidorreductasa, transferasa, y antioxidante. También se diferencian respecto al global del CFGP, aunque en menor medida, las actividades de unión a proteínas, transporte, liasa y transducción de señal.

Tabla 10. Análisis comparativo de Ontologías génicas (GO) en la categoría de “función molecular” para las tres colecciones de infección y para el conjunto de colecciones del CFGP.

Función Molecular (%)				
Clasificación GO	PostharvP1	RindPdíg24	RindPdígS	CFGP
Sin anotación GO	25.0	40.9	41.3	49.6
Unión	16.6	9.4	11.4	10.6
Función molecular desconocida	14.5	11.3	11.4	11.3
Actividad hidrolasa	10.7	6.8	2.7	7.0
Actividad oxidorreductasa	9.7	7.4	14.7	4.3
Unión de ácidos nucleicos	7.0	6.1	3.3	6.8
Actividad transferasa	6.9	6.2	10.3	4.1
Unión de proteínas	4.5	4.6	3.8	3.2
Actividad quinasa	4.4	3.3	3.8	3.3
Actividad catalítica	3.5	2.8	1.6	2.7
Actividad de regulación de la transcripción	2.6	1.6	2.2	3.0
Actividad de transporte	3.0	2.0	2.7	1.8
Actividad de molécula estructural	3.5	6.2	1.6	1.8
Actividad liasa	2.7	1.4	1.6	1.1
Actividad ligasa	1.5	1.2	1.6	1.8
Actividad de transporte de iones	2.2	1.4	0.5	1.4
Actividad de transporte de electrones	1.0	1.2	2.2	0.7
Actividad isomerasa	0.7	0.7	0.5	0.6
Actividad de transducción de señal	0.6	0.6	0.6	0.3
Actividad de transporte	2.6	1.8	2.2	1.8
Actividad antioxidante	1.0	0.5	1.1	0.3

Actividad de regulación de enzimas	0.4	0.4	0.5	0.5
Actividad de regulación de translación	1.6	1.1	0.5	0.6
Actividad helicasa	0.2	0.3	0.3	0.5
Actividad de receptor	0.1	0.1	0.1	0.1
Actividad de transporte de proteínas	0.5	0.4	0.5	0.4
Actividad de transporte por canal o poro	0.9	0.3	0.3	0.3
Función molecular	0.1	0.1	0.1	0.1
Actividad motora	0.1	0.1	0.1	0.1

En el estudio de la categoría de “Componentes celulares” (Tabla 11), las diferencias no parecen muy apreciables en general, especialmente si se comparan con las observadas en las otras dos categorías, excepto quizá en “región extracelular”, donde las colecciones PostharvP1 y RindPdigS tienen valores cuatro y cinco veces mayores que en la media del CFGP.

Tabla 11. Análisis comparativo de Ontologías génicas (GO) en la categoría de “componente celular” para las tres colecciones de infección y para el conjunto de colecciones del CFGP.

Componente Celular (%)				
Clasificación GO	PostharvP1	RindPdig24	RindPdigS	CFGP
Sin anotación GO	31.5	48.3	48.4	51.8
Citoplasma	32.1	24.6	23.9	20.7
Membrana	18.2	14.5	14.1	13.0
Componente celular desconocido	16.7	12.5	14.1	13.5
Intracelular	5.2	6.2	2.2	3.4
Nucleo	4.2	3.3	3.8	3.9
Célula	0.1	0.1	0.1	0.0
Cromosoma	0.1	0.4	0.4	0.2
Complejo proteico no localizado	0.2	0.2	0.2	0.2
Estructura de encapsulamiento	0.1	0.1	0.1	0.1

Resultados

externa				
Región extracelular	0.4	0.1	0.5	0.1
Matriz extracelular	0.1	0.1	0.5	0.0
Componente celular	0.2	0.2	0.2	0.0

4. Análisis global de la expresión génica en frutos de mandarina ‘Clemenules’ en respuesta a la infección por *P. digitatum* mediante hibridación con una micromatriz de cDNA del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos.

Uno de los objetivos del CFGP consistió en la obtención de una micromatriz de cDNA generada a partir del conjunto de clones aportados por los diferentes grupos que forman parte del consorcio. Esta micromatriz fue puesta a disposición de todo los grupos de investigación participantes en el proyecto para la realización de hibridaciones. En nuestro caso se utilizó para el estudio global de los cambios de la expresión génica en frutos de mandarina ‘Clemenules’ en respuesta a la herida, a la infección con *P. digitatum* y al tratamiento con ET, en un experimento análogo al ya descrito con la macromatriz de RindPdigS. Sin embargo, hay que destacar que cuando se diseñó la micromatriz utilizada no se encontraban disponibles las secuencias de los clones pertenecientes a las genotecas RindPdigS, RindPdig24 ni PostharvP1. Este hecho no implica que genes presentes en las citadas bibliotecas no se encuentren en la micromatriz, ya que muchos de ellos pueden haber sido aislados a partir de otras bibliotecas de cDNA que si están representadas en la misma.

4.1. Elaboración de la muestra de referencia.

El diseño experimental seguido fue el de referencia común. Esta referencia se obtuvo de una mezcla de cantidades iguales de RNA de frutos control, heridos y heridos e infectados a las 0, 8, 16, 24 y 48 horas, de dos campañas diferentes. En cada experimento de hibridación se marcó la muestra a analizar con el fluoróforo Cy5 y la muestra de referencia con el fluoróforo Cy3.

Para confirmar la calidad de la muestra de referencia, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% de todos los RNAs que la componen (Figura 29), y se midió la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} como una estimación de la calidad de la muestra de referencia. Los valores fueron: Relación A_{260}/A_{280} 1,81 y relación A_{260}/A_{230} 2,80.

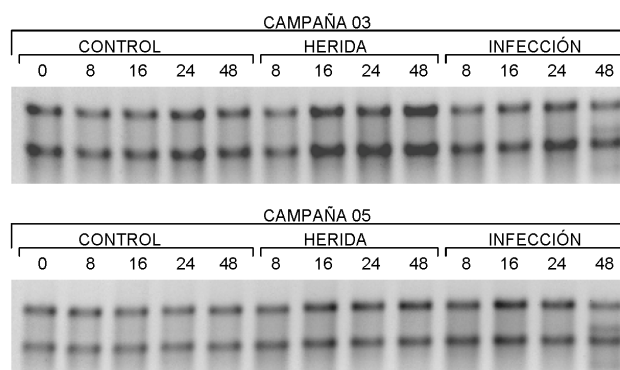


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los RNAs utilizados en la elaboración de la muestra de referencia, correspondientes a frutos de dos campañas distintas.

4.2. Hibridaciones.

Se compararon cuatro tratamientos, análogos a los usados en el caso de la macromatriz: (i) Frutos tratados con ET (10 ppm) durante 16 horas, en ausencia de infección (E); (ii) frutos heridos e inoculados con 10 μ L de agua y procesados a las 24 horas (W); (iii) frutos heridos e inoculados con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) y procesados a las 24 horas (I); y (iv) frutos control mantenidos 24 horas en las mismas condiciones de conservación a 20 °C y humedad relativa del 90 % (A).

Para cada tratamiento, se analizaron tres réplicas biológicas, correspondientes a frutos recolectados durante las campañas 2003/04 (una réplica) y 2004/05 (dos momentos de cosecha diferentes). Para cada réplica biológica se analizaron dos réplicas técnicas (Figura 30).



Figura 30. Esquema del diseño experimental empleado en la hibridación de las micromatrices.

Las imágenes de hibridación se obtuvieron con un escáner GenePix 4000B (Molecular Devices) y se cuantificaron con el programa informático GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices) (Figura 31).

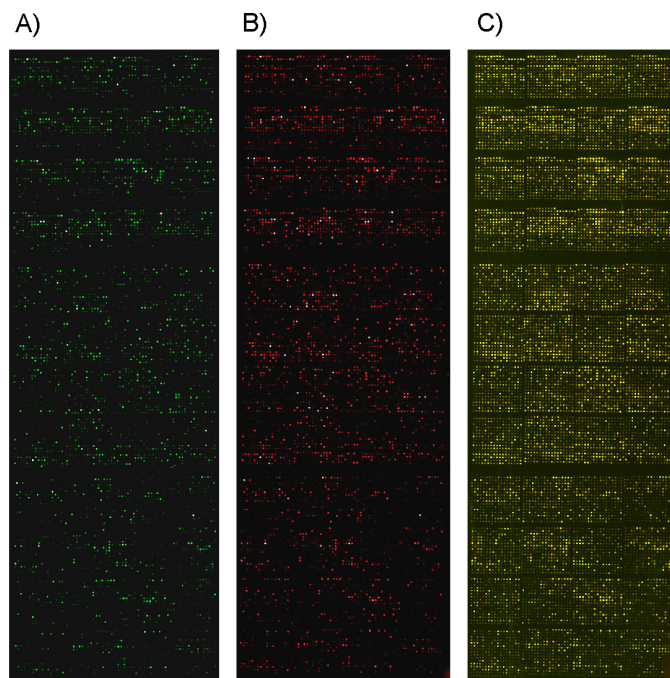


Figura 31. Imágenes de la hibridación de una micromatriz. A) Imagen obtenida de la hibridación con cDNA marcado con el fluoróforo Cy3. B) Ídem con el fluoróforo Cy5. C) Imagen obtenida al combinar las imágenes A) y B).

La superposición de las imágenes obtenidas a partir de la hibridación simultánea con la muestra problema y la referencia común produce una composición que permite determinar los cambios en el nivel de expresión de cada uno de los genes de la micromatriz en las situaciones de estudio a partir del color y de la intensidad de cada una de las sondas (Figura 31, imagen C).

4.3. Expresión diferencial en las condiciones de estudio.

El análisis de los resultados de la micromatriz se inició con una normalización de las señales de todas las hibridaciones mediante el programa DNMAAD del paquete informático GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>), restando a cada valor el ruido de fondo, y realizando una normalización Lowess dentro de cada micromatriz y entre las diferentes micromatrices, y una normalización por desviación estándar para que la desviación estándar de los puntos sea la misma entre diferentes bloques y entre diferentes cristales. Seguidamente, y mediante la aplicación PREPROCESSING incluida en GEPAS, se promediaron las señales de todos los clones pertenecientes a un mismo unigen. El análisis de expresión diferencial se realizó con el programa SAM ("Statistical Analysis of Microarrays") entre todos los tratamientos y SAM por parejas con FDR < 1%, implementados en el paquete de análisis MeV ("TIGR MultiExpression Viewer"), (<http://www.tm4.org/mev.html>).

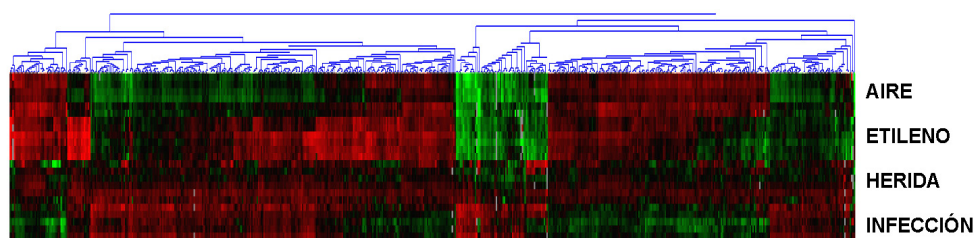


Figura 32. Árbol jerárquico de los unigenes significativos obtenido a partir del análisis SAM ("Significance Analysis of Microarrays") entre todas las condiciones de estudio: tratamiento con aire (AIRE), tratamiento con ET (ETILENO), herida (HERIDA) e infección con *P. digitatum* (INFECCIÓN), mediante el uso del programa MeV del paquete informático TM4.

Una vez realizada la normalización de las señales de hibridación y analizada la presencia de réplicas técnicas, se analizaron 8.191 de los 8.384 genes presentes en la micromatriz. Hay que tener en cuenta que no todos los genes estaban secuenciados, de hecho 1.391 genes de los 8.191 no lo estaban, por lo que no se podría obtener información sobre su identidad. El análisis de la expresión de los unigenes presentes en la micromatriz, mediante el uso de herramientas informáticas, permitió confirmar la presencia de unigenes con perfiles de expresión diferencial para cada una de las condiciones de estudio (Figura 32) (Saeed *et al.*, 2003).

Otra forma de visualizar los resultados de los análisis de expresión diferencial consiste en la agrupación de genes según su inducción o represión en cada una de las condiciones de estudio o por combinación de ellas mediante la elaboración de diagramas de Venn (Figura 33).

Del total de 8.191 unigenes analizados en la micromatriz se encontraron 1.428 inducidos durante la infección (17 % del total de analizados), de los que 643 se indujeron además por la aplicación de ET (45 % de los inducidos por infección). También se encontraron 202 unigenes con inducción específica en herida y 482 en la condición de ET.

Al estudiar los 91 unigenes cuya expresión es específica en la respuesta a la infección, se observó que 46 de ellos no están secuenciados o tienen mala secuencia, y 17 no presentan homología con bases de datos. Entre los restantes 28 unigenes con homología, se encontró diferentes factores de transcripción, genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides y alcaloides como una flavanona 3-hidrolasa (unigen 856) y una ornitina descarboxilasa (unigen C02010H01), en la síntesis proteínas PR, como una PR-1b (unigen C02010A04), en el metabolismo de ROS, como una epóxido hidrolasa (unigen 5375) y algún gen de hongo, como el que codifica una "coiled-coil protein" (unigen 4935).

Es de resaltar que todas las categorías, tanto de inducción como de represión, están representadas por un número considerable de unigenes, los cuales están bastante homogéneamente repartidos entre las categorías, excepto las de inducción y represión conjunta por herida y ET, que son las menos numerosas con 76 y 44 genes, respectivamente. Las categorías más abundantes en inducción son la de ET -herida-infección y las específicas de ET y de infección, mientras que en represión es la

categoría específica de infección la que mayor número de genes presenta. En general, las categorías de inducción tienen más representantes que las de represión, excepto las categorías de infección y de ET e infección. Finalmente, cabe mencionar la presencia de genes que se inducen por un tratamiento y se reprimen por otro y que no están reflejados en los diagramas de Venn (véase material adicional), lo que da una idea de la complejidad de los mecanismos de regulación que operan en las condiciones de estudio.

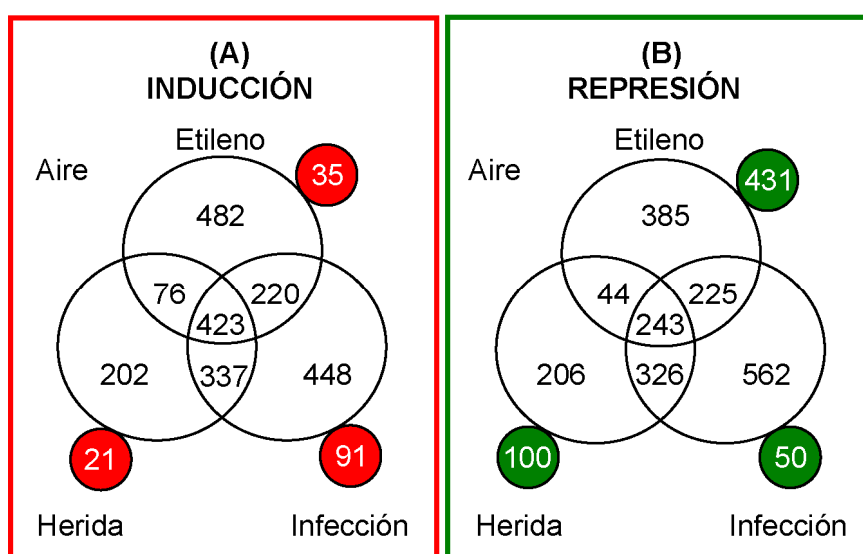


Figura 33. Diagramas de Venn que muestran la distribución de los genes presentes en la macromatriz según sus patrones de expresión diferencial, inducidos (A) o reprimidos (B) respecto a aire para las condiciones de herida, infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) o aplicación de ET exógeno (10 ppm). En la categoría de inducción, los círculos rojos indican el número de clones que sólo se expresan en la categoría a la que van unidos. Para el caso de represión, los círculos verdes indican el número de clones que solamente no se expresan en la categoría a la que van unidos. El análisis de los datos de hibridación se realizó con el programa informático GEPAS. El análisis estadístico se realizó con la herramienta SAM (Significance Analysis of Microarrays) con un FDR del 1%.

En la Tabla 12 y la Tabla 13 se muestran los 20 genes con mayor inducción y con mayor represión en infección respecto a herida respectivamente, mostrando además su comportamiento en las condiciones de tratamiento con ET, infección y herida, respecto a aire. Entre los genes que más se inducen se encuentran los que codifican dos citocromo P450 79A02, que aunque comparten el mismo homólogo de *A. thaliana*, no son un mismo gen, ya que tienen un nivel de identidad del 84%; dos CPRD2 que también se inducen por la herida; una sintasa de ácido tetrahydrocannabinólico, una nectarina, una fenilalanina amonio liasa, que también se induce por herida y en menor medida por ET, y una ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACO), que también está inducida por herida y ET. Es de resaltar que las proteínas CPRD2, ácido tetrahydrocannabinólico sintasa y nectarina 5 forman parte de una misma familia de proteínas que contienen un dominio de unión a FAD, pero los unigenes del CFGP son genes diferentes, ya que el nivel de identidad entre ellos es del 85-90%.

Tabla 12. Unigenes de la micromatriz con mayor inducción en infección respecto a herida (FDR<1%). Para cada unigen, se muestra la relación entre su expresión en las condiciones de infección (I), etileno (E) y herida (W) respecto a aire (A), y de infección respecto a herida, como logaritmo en base 2 de sus cocientes (SAM; FDR<1%).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
Citocromo P450 79A2	6147	At5g05260	2,99	0,30	0,41	3,40
Proteína CPRD2	2332	At1g26390	2,43	-0,01	1,16	3,60
Proteína CPRD2	4436	At4g20820	2,25	0,36	1,48	3,73
Ácido tetrahidrocanabinólico sintasa	C04016A09	At5g44380	1,99	-0,13	0,30	2,29
Descarboxilasa 5 Tirosina/DOPA	C04022H07	At4g28680	1,96	0,49	0,62	2,58
Citocromo P450 79A2	4408	At5g05260	1,93	0,06	0,67	2,60
Secuencia no disponible	C05028G06		1,87	-0,14	0,24	2,11
Nectarina 5	3442	At5g44380	1,86		0,64	2,50
Secuencia no disponible	C04016B10		1,81	0,15	1,05	2,86
Secuencia no disponible	C05039C02		1,76	0,35	1,90	3,65
Secuencia no adecuada para BLAST	C08006D11		1,67	0,81	0,77	2,44
Secuencia no disponible	C08007D08		1,66	-1,06	0,08	1,74
Secuencia no disponible	C04002B12		1,55	0,59	2,51	4,06
Precursor de peroxidasa	2218	At5g58390	1,54	0,59	0,21	1,75
Fenilalanina amonio liasa	6764	At2g37040	1,54	0,79	1,30	2,84
Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa	4356	At1g05010	1,52	0,79	1,59	3,11
Secuencia no disponible	C02013H11		1,47	1,20	1,68	3,14
3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintasa	5794	At4g39980	1,46	-0,12	0,76	2,21
Proteína ribosomal 60S L44	4837	At4g14320	1,45			
Secuencia no disponible	C05018A08		1,43	1,19	0,42	1,85

Tabla 13. Unigenes de la micromatriz con mayor represión en infección respecto a herida (FDR<1%). Para cada unigen, se muestra la relación entre su expresión en las condiciones de infección (I), ET (E) y herida (W) respecto a aire (A), y de infección respecto a herida, como logaritmo en base 2 de sus cocientes (SAM; FDR<1%).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
Receptor de benzodiazepina	6697	At2g47770	-1,09	-0,70	0,94	-0,16
Proteína ATPF3	5942	At5g63530	-1,07	-1,12	-0,45	-1,52
Proteína ASR	6637	At4g35800	-0,96	-1,62	-0,67	-1,64
Secuencia no adecuada para BLAST	C04011A12		-0,91	-0,62	-1,08	-1,99
Proteína LEA5	5533	At4g15910	-0,90	0,39	-0,87	-1,77
Proteína DRM1	7035	At1g28330	-0,89	-1,46	-1,01	-1,90
Proteína T3F17.27	6980	At2g46080	-0,88	0,00	0,30	-0,58
Proteína DRM1	7102	At1g28330	-0,88	-1,44	-0,94	-1,81
Secuencia no disponible	6766		-0,87	-0,59	-1,24	-2,11
Dehidrina (LEA)	5584	At1g76180	-0,86	-0,29	-0,45	-1,31
Dicianina	4987	At5g40970	-0,86	-1,03	-0,53	-1,40
Proteína LEA5	7050	At4g02380	-0,86	0,00	-1,03	-1,89
Secuencia no adecuada para BLAST	C04002F10		-0,85	-0,22	-0,07	-0,91
Secuencia no adecuada para BLAST	C04004E08		-0,84	0,04	-1,25	-2,08
Secuencia no adecuada para BLAST	C03006B08		-0,83	-0,09	0,10	-0,73
Pentatricopéptido	1650	At3g59300	-0,79	-0,02	0,10	-0,69
Proteína desconocida	5046	At5g03880	-0,78	0,01	-0,20	-0,98
ATPasa 1 transportadora de fosfolípidos	2397	At5g04930	-0,78	0,14	-0,51	-1,29
Secuencia no disponible	3133		-0,78	-0,58	-0,81	-1,59
Secuencia no adecuada para BLAST	C18001F10		-0,78	-0,07	0,22	-0,56

Entre los genes que más se reprimen se encuentran los que codifican un receptor de benzodiazepina, que sin embargo está bastante inducido por herida, tres proteínas LEA (dehidrina) que presentan también una represión considerable por herida, dos proteínas DRM1 que también sufren represión por herida y ET y una dicianina, cuya expresión está reprimida considerablemente por ET. Además, hay varios genes sin homología o con secuencia no disponible, con altos niveles de represión por infección, que también están regulados por herida y/o ET.

4.4. Anotación funcional.

El siguiente paso en el estudio de la expresión génica, mediante hibridación de micromatrices de cDNA, consistió en el estudio de las anotaciones funcionales por ontología génicas diferenciales en las condiciones de infección, herida y ET, utilizando el programa informático FatiGO+ (Babelomics). El análisis se hizo con un nivel de p , corregido mediante FDR, menor de 0,05. En este análisis se emplearon aquellos genes con homólogo en *A. thaliana* y se compararon los que poseían expresión diferencial entre dos condiciones dadas, según el análisis SAM, con respecto al conjunto de genes de la micromatriz, incluyendo finalmente una sola entrada por cada conjunto de genes con homología con un mismo gen de *A. thaliana*.

Esta metodología tiene limitaciones ya que implica, por un lado, que aquellos unigenes que no tienen homólogo en *A. thaliana* no son tenidos en cuenta en el análisis y, por otro lado, que aquellos unigenes que, aunque tengan diferentes perfiles de expresión, comparten un mismo homólogo en *A. thaliana* están representados por una única entrada, por lo que quedan infrarrepresentados. Como ejemplo, se muestra el caso de 13 unigenes que presentan homología con un mismo gen de *A. thaliana*, correspondiente a una cafeil O-metil transferasa, por lo que aparecen en el análisis por la entrada At5g54160, pero en los que se aprecian dos perfiles diferentes de expresión (Figura 34).

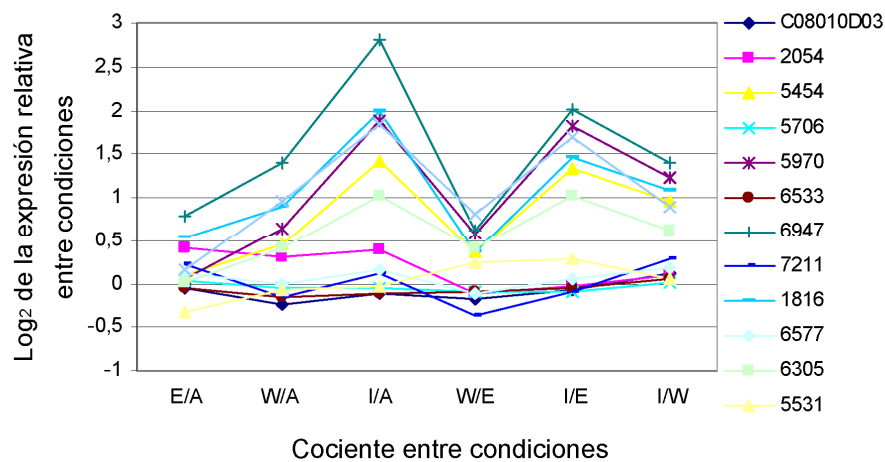


Figura 34. Perfiles de expresión de 13 unigenes de cítricos presentes en la micromatriz que presentan la máxima similitud con el gen At5g54160 de *A. thaliana*, que codifica una cafeil O-metil transferasa. Se muestra los valores del \log_2 del cociente entre las intensidades de expresión por parejas de condiciones; aire (A), ET (E), herida (H) e infección (I).

La micromatriz contiene un total de 12.671 clones que corresponden al menos a 6.333 unigenes (Forment *et al.*, 2005). De estos unigenes, 4.683 (74% del total) tienen homólogo en *A. thaliana*. Después de las hibridaciones con las micromatrices, se identificaron 1.428 unigenes con inducción y 1.356 con represión durante la infección respecto a aire (22% y 21% del total, respectivamente).

El análisis de anotación funcional por ontologías génicas de los genes que se expresan más en respuesta a la infección que frente a herida mostró aquellos procesos biológicos inducidos y reprimidos por la infección (Tabla 14). Entre los procesos inducidos destaca la sobrerrepresentación del metabolismo de la metionina, la respuesta al estrés oxidativo, la biosíntesis de hormonas y los procesos relacionados con el direccionamiento del metabolismo primario hacia el secundario, como la ruta del siquimato o la biosíntesis del isopentenil bifosfato (IPP). El único proceso biológico reprimido es la respuesta a estrés.

Tabla 14. Anotación funcional por Ontologías Génicas (GO) de los procesos biológicos significativos “no redundantes” de los genes de frutos ‘Clemenules’ con inducción en respuesta a la infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) respecto a herida, con el programa FatiGO+ (Babelomics). Se incluye el valor de p corregido por FDR y el nivel GO de cada proceso biológico.

Proceso Biológico Inducido* (genes inducidos/genes totales)	P Valor (FDR)	Nivel GO
Procesos metabólicos de proteínas celulares (IR) (17/539)	0,0042	5
Respuesta a herida (SR) (10/33)	0,0043	4
Procesos metabólicos de la metionina (SR) (6/10)	0,0083	8
Procesos biosintéticos de aminoácidos azufrados (SR) (5/7)	0,0105	8
Respuesta al estrés oxidativo (SR) (11/45)	0,0107	5
Biogénesis y organización celular (IR) (5/257)	0,0274	3
Procesos metabólicos de rutas principales de carbohidratos (SR) (8/30)	0,0274	6
Procesos de biosíntesis de de la familia de aminoácidos aromáticos, ruta del siquimato (SR) (4/5)	0,0318	9
Procesos de biosíntesis de isopentenil bifosfato (IPP), ruta independiente del mevalonato (SR) (4/5)	0,0318	9
Procesos catabólicos de monosacáridos (SR) (7/34)	0,0407	7
Procesos metabólicos de S-adenosilmetionina (SR) (3/4)	0,0431	6
Procesos metabólicos de biopolímeros (IR) (15/442)	0,0438	4
Procesos biosintéticos de hormonas (SR) (4/8)	0,0445	5
Proceso Biológico Reprimido* (genes inducidos/genes totales)	P Valor (FDR)	Nivel GO
Respuesta a estrés (SR) (18/207)	0,0194	3

* (SR) Anotación GO sobrerrepresentada al nivel especificado. (IR) *Idem.* infrarrepresentada

Así mismo, se hizo un estudio de los procesos biológicos en los que están implicados los genes con expresión diferencial para cada una de las tres condiciones; ET, herida e infección, respecto al tratamiento control con aire (Tabla 15). A partir de estos resultados se observa que la condición

que implica un mayor cambio en el metabolismo del fruto es la infección. Sin embargo, los resultados obtenidos de anotación funcional con la herramienta FatiGO+ no muestra de forma significativa la sobre- o infrarrepresentación de procesos biológicos inducidos o reprimidos debido al tratamiento con ET.

Tabla 15. Análisis de la anotación funcional por Ontologías Génicas (Procesos biológicos) de genes con expresión diferencial en frutos 'Clemenules' en las condiciones de tratamiento con ET (10 ppm) (E), herida (W) e infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) (I) frente al tratamiento con aire (A).

PROCESOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS	E frente a A	W frente a A	I frente a A
Nivel 3			
Procesos biosintéticos		2,30E-06 (SR)	1,25E-6 (SR)
Procesos metabólicos celulares		8,91E-04 (SR)	3,65E-03 (SR)
Procesos metabólicos de compuestos nitrogenados			3,07E-03 (SR)
Procesos metabólicos secundarios		3,61E-02 (SR)	
Procesos metabólicos primarios		1,49E-02 (SR)	
Procesos del sistema inmunológico			2,89E-02 (SR)
Regulación de procesos biológicos			4,19E-02 (IR)
Nivel 4			
Procesos biosintéticos celulares		4,12E-07 (SR)	1,64E-06 (SR)
Procesos metabólicos de aminoácidos y derivados		3,61E-02 (SR)	4,48E-05 (SR)
Procesos metabólicos de ácidos orgánicos			5,84E-04 (SR)
Procesos metabólicos de aminas			3,12E-04 (SR)
Procesos metabólicos de compuestos aromáticos		2,03E-02 (SR)	
Procesos metabólicos de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos.			1,82E-03 (IR)

Biogénesis y ensamblaje de complejos ribonucleoproteicos	6,71E-03 (SR)	
Procesos metabólicos de proteínas	3,36E-02 (SR)	
Nivel 5		
Procesos metabólicos de derivados de aminoácidos	5,61E-04 (SR)	5,96E-05 (SR)
Procesos metabólicos del ácido carboxílico		5,14E-04 (SR)
Procesos biosintéticos de compuestos aromáticos	4,24E-02 (SR)	1,66E-02 (SR)
Procesos biosintéticos de compuestos nitrogenados		6,10E-03 (SR)
Procesos biosintéticos de macromoléculas	1.20E-05 (SR)	1,27E-03 (SR)
Procesos metabólicos de proteínas celulares		2,31E-02 (SR)
Respuesta inmune innata		1,44E-02 (SR)
Traducción		4,06E-02 (SR)
Nivel 6		
Traducción	2.28E-07 (SR)	1,10E-04 (SR)
Procesos biosintéticos de derivados de aminoácidos	3,39E-02 (SR)	1,40E-02 (SR)
Procesos biosintéticos de aminas		4,70E-03 (SR)
Procesos metabólicos de fenilpropanoides	2,76E-02 (SR)	4,68E-02 (SR)
Procesos metabólicos de aminoácidos		1,40E-02 (SR)
Respuesta inmune innata		2,89E-02 (SR)
Regulación de procesos metabólicos de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos.		4,72E-02 (SR)
Nivel 7		
Procesos biosintéticos de aminoácidos		1,40E-02 (SR)
Respuestas de defensa, interacción incompatible		1,03E-02 (SR)
Elongación traduccional	3,23E-03 (SR)	

Resultados

Procesos metabólicos de aminoácidos azufrados	3,56E-02 (SR)
Nivel 8	
Respuesta sistémica dependiente de etileno y ácido jasmónico	2,18E-02 (SR)
Procesos metabólicos de la metionina	4,72E-02 (SR)

PROCESOS BIOLÓGICOS REPRIMIDOS	E frente a A	W frente a A	I frente a A
Nivel 3			
Respuesta a estímulos abióticos		1,86E-02 (SR)	3,26E-02 (SR)
Respuesta a estrés		1,86E-02 (SR)	
Nivel 4			
Respuesta a estímulos térmicos		2,73-02 (SR)	
Nivel 6			
Modificación de la pared celular			3,23E-02

(SR) Proceso sobrerrepresentado, (IR) proceso infrarrepresentado.

Los resultados en negrita indican aquellos procesos biológicos no redundantes.

El uso del programa informático “OMICS viewer” de “AraCyc 4.0” permite la visualización de aquellas rutas metabólicas en las que están implicados los genes con expresión diferencial. Se estudiaron las rutas metabólicas con homólogo en *A. thaliana* que, mediante el análisis estadístico SAM, resultaron diferenciales en las condiciones de tratamiento con ET (10 ppm), herida e infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) frente al tratamiento con aire, y entre infección y herida. Este estudio incluye el valor numérico de expresión relativa como logaritmo en base 2 del cociente de las intensidades de las dos condiciones comparadas. A diferencia del análisis FatiGO de ontologías génicas, el valor de expresión de un unigen para una condición dada se calculó como la media aritmética de los unigenes con expresión diferencial para esa condición. En el ejemplo de la Figura 34 en el que 13 unigenes de la micromatriz están representados por el mismo homólogo de *A. thaliana* (At5g54160), el

cálculo del valor de expresión se realizó a partir de los 6 unigenes con expresión diferencial.

Los resultados obtenidos mediante el programa informático “OMICS viewer” mostraron que entre las rutas que se inducen por la infección se incluye la síntesis de ET a partir de metionina, el ciclo de la metionina y el ciclo de SAM (Figura 35), la biosíntesis de ácido jasmónico (), la síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano y fenilalanina (Figura 37), el metabolismo de fenilpropanoides a partir de la fenilalanina () y la biosíntesis de isoprenoides a partir de metileritritol (Figura 39). Todas estas rutas aparecen también como inducidas al comparar infección con herida. Además, en esta última comparación se induce la biosíntesis de suberina y citoquininas y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Resultados no mostrados). Como procesos reprimidos durante la infección se observó el metabolismo de flavonoides con naringenina como intermediario (), la biosíntesis de isoprenoides a partir de la ruta del mevalonato (Figura 39), la fotosíntesis, la β -oxidación de ácidos grasos, la degradación de triptófano y fenilalanina y la degradación de pectinas, entre otras. Al analizar las rutas inducidas por ET se observó que la aplicación de ET exógeno también indujo el ciclo de la metionina, el ciclo de SAM y la biosíntesis de ET, la síntesis de fenilalanina y la biosíntesis de isoprenoides mediada por metileritritol, entre otras.

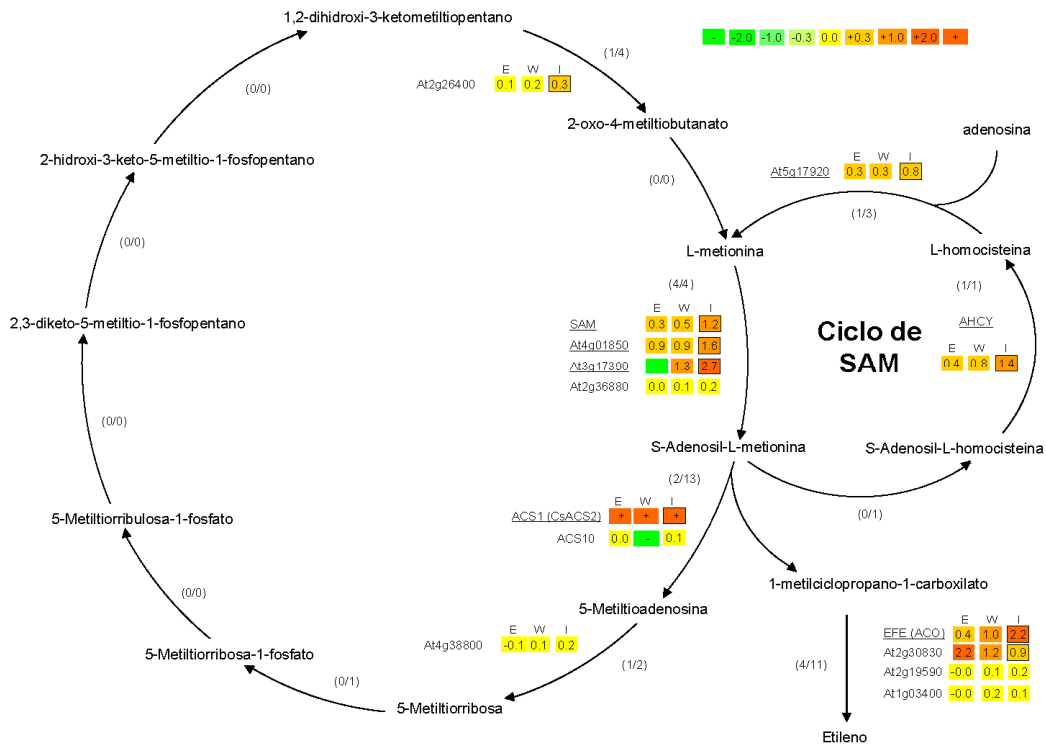


Figura 35. Representación conjunta de las rutas de síntesis de ET a partir de metionina, ciclo de la metionina y ciclo de SAM, mediante el uso del programa informático “OMICS viewer” de “AraCyc 4.0”. Entre paréntesis se indica primero el número de genes de cada paso con homólogos en *A. thaliana* contenidos en la micromatriz y después el número total de genes de *A. thaliana* para dicha reacción. Los genes subrayados son aquellos en los que la expresión en infección es significativamente mayor que en herida. Los valores de los recuadros son de izquierda a derecha el \log_2 del cociente entre la condición de tratamiento con ET (10 ppm), herida, e infección con *P. digitatum* (10^6 conidios/mL) respecto a aire. El signo + indica que expresión en la condición dada pero no en aire, mientras que el signo - indica la situación contraria, expresión en aire pero no en la condición. Se recuadran aquellos valores de expresión diferencial con la infección respecto al tratamiento con aire.

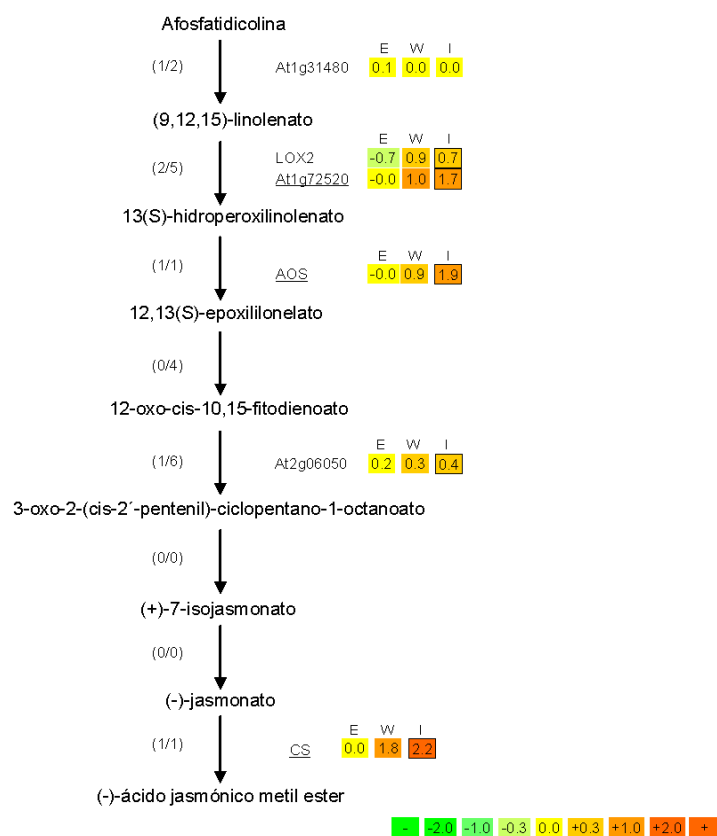


Figura 36. Representación de la ruta de la síntesis de ácido jasmónico, mediante el uso del programa informático “OMICS viewer” de “AraCyc 4.0” (véase detalles en el pie de la Figura 35).

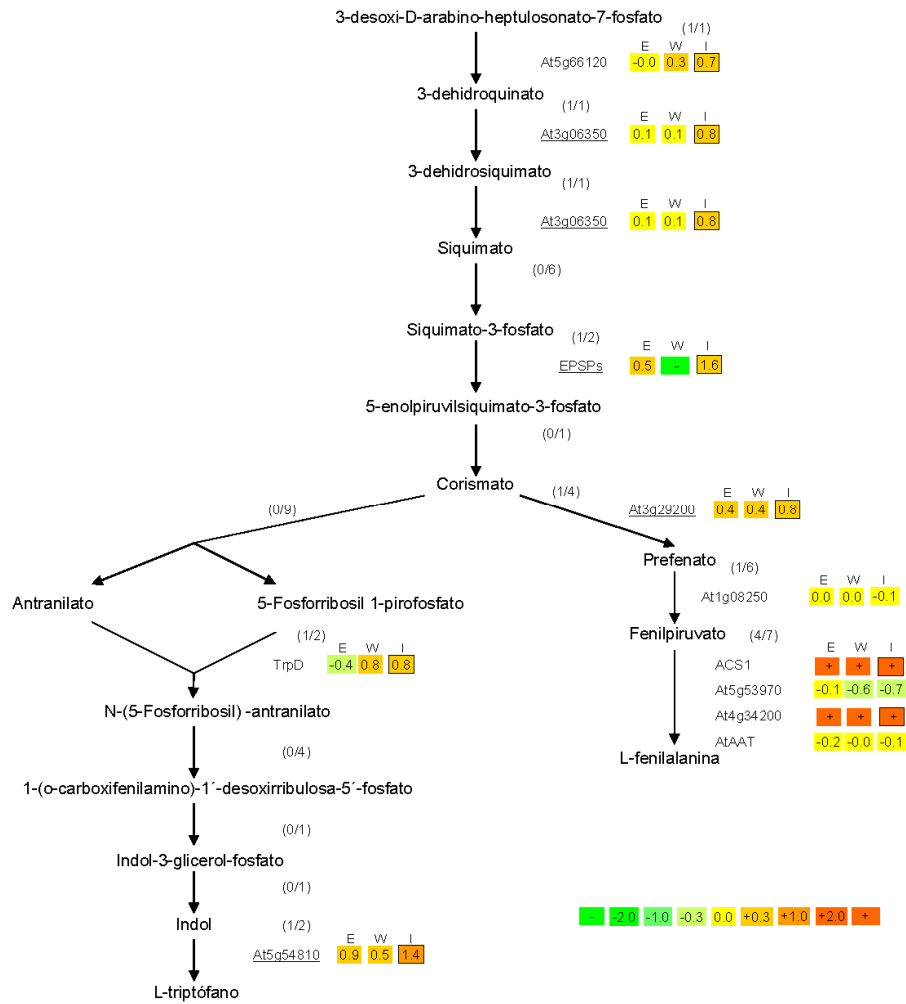


Figura 37. Representación de la ruta de la síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano y L-fenilalanina, mediante el uso del programa informático “OMICS viewer” de “AraCyc 4.0” (véase detalles en el pie de la Figura 35).

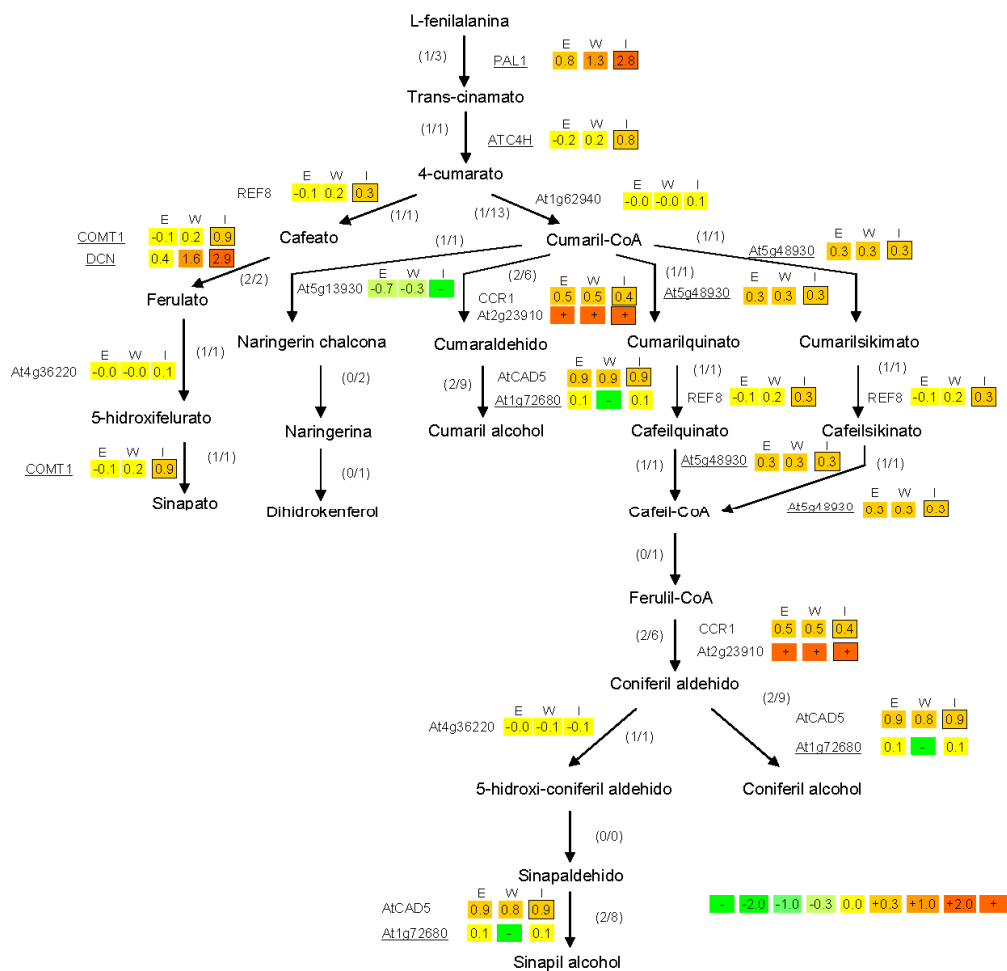


Figura 38. Representación del metabolismo de fenilpropanoides a partir de la fenilalanina, mediante el uso del programa informático “OMICS viewer” de “AraCyc 4.0” (véase detalles en el pie de la Figura 35).

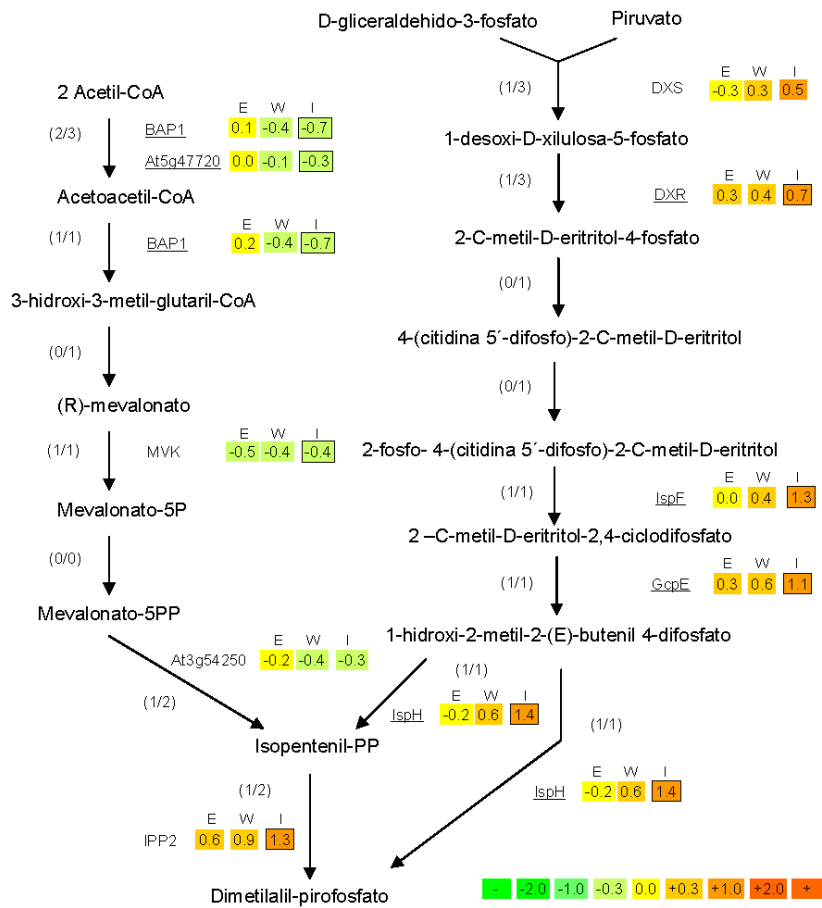


Figura 39. Representación de la biosíntesis de isoprenoides, mediante el uso del programa informático “OMICS viewer” de “AraCyc 4.0” (véase detalles en el pie de la Figura 35).

4.5. Análisis de la expresión de genes relacionados con patogénesis, estrés oxidativo, transcripción y señalización.

En los análisis de expresión génica mediante hibridación con macro- y micromatrices, entre los genes con mayor inducción en las condiciones de tratamiento con ET, herida e infección, no aparecieron algunos genes tradicionalmente relacionados con la respuesta de los frutos a la infección. Existen numerosos estudios que muestran que la infección por patógenos produce un cambio en la expresión de la planta induciendo una serie de respuestas de defensa generales como la producción de proteínas PR (Van Loon *et al.*, 2006b), determinados factores de transcripción (Maleck *et al.*, 2000) y especies reactivas de oxígeno (Torres *et al.*, 2006). Por ello, se hizo un estudio específico del comportamiento de los genes presentes en la micromatriz que codifican estas proteínas a partir de los resultados obtenidos en las hibridaciones con las micromatrices.

La micromatriz contiene 345 unigenes relacionados con transcripción y señalización. Los resultados mostraron que 20 de ellos muestran expresión diferencial en infección respecto a herida, de los cuales 10 estaban inducidos y 10 estaban reprimidos. En la Tabla 16 se muestran los 20 unigenes ordenados por su nivel expresión. Los únicos unigenes con una expresión mayor del doble en infección respecto a herida codifican una proteína NAM3 y una proteína 2q, los cuales también se indujeron diferencialmente en respuesta a la herida respecto al tratamiento control con aire. Después se encuentra un factor de transcripción WRKY, cuya expresión se induce tanto en infección como en herida y ET, respecto a aire.

Tabla 16. Unigenes de la micromatriz relacionados con la transcripción y señalización, con mayor expresión diferencial (FDR<1%), tanto por inducción como represión, en infección respecto a herida y/o aire.

INDUCCIÓN						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
Proteína NAM 3	4666	At1g01720	1,16	-0,01	0,90	2,06
Proteína SPF1	6060	At2g38470	1,08	0,01	0,43	1,51
Factor de transcripción WRKY	2313	At1g62300	0,93	1,21	1,65	2,58
Proteína con dedos de zinc 1	6609	At1g27730	0,80	-0,18	-0,38	0,43
Proteína con dedos de zinc 1	6033	At1g27730	0,74	0,34	0,34	1,08
Proteína con dedos de zinc 1	6859	At1g27730	0,63	0,04	-0,04	0,59
Factor de transcripción bZIP ATB2	4437	At1g75390	0,62	0,61	-0,06	0,56
Factor de transcripción bZIP	6141	At3g62420	0,52	0,23	0,23	0,75
Proteína ZPT2-14	588	At2g28710	0,49	0,02	-0,01	0,48
Receptor de etileno	2254	At1g66340	0,43	-0,06	-0,02	0,41

REPRESIÓN						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
Proteína ASR	6637	At4g35800	-0,96	-1,62	-0,67	-1,64
Proteína ASR	7080	At4g35800	-0,75	-1,44	-0,50	-1,25
Proteína MADS-box 4	7139	At1g24260	-0,55	0,35	-0,33	-0,88
Proteína "phantastica"	C20006B02	At2g37630	-0,53	0,03	0,16	-0,37
Proteína RING3	4643	At3g01770	-0,48	-0,13	0,30	-0,18
Proteína NIN 2	C07010C01	At2g43500	-0,44	-0,06	-0,45	-0,89
Factor de transcripción B3	1675	At4g01580	-0,37	-0,40	-0,60	-0,98
Factor de transcripción con dominio AP2	4713	At5g13330	-0,31	0,29	0,06	-0,25
Proteína aux/IAA	6645	At5g65670	-0,30	-0,62	-0,47	-0,77
Proteína PDI	6851	At1g60420	-0,29	0,06	-0,09	-0,38

En negrita se muestran aquellos valores diferenciales entre ambas condiciones con un FDR<1%

Entre los unigenes que se inducen por infección destacan tres que codifican proteínas con dedos de zinc, los cuales comparten un mismo homólogo en *A. thaliana* y cuya expresión se induce específicamente por la infección. Además, hay dos factores de transcripción bZIP, una proteína ZPT2-14 y un receptor de ET, los cuales tienen expresión diferencial en infección, pero no en herida respecto a aire. En referencia a los unigenes con mayor represión en infección respecto a herida, los dos con mayor nivel de represión son dos unigenes que codifican proteínas ASR, que comparten un mismo homólogo en *A. thaliana*, y que se reprimen además con ET, herida e infección, respecto a aire.

Destacan por su perfil de expresión los genes que codifican una proteína RING3 y un factor de transcripción con dominio AP2 cuya expresión se reprime por la infección, pero se inducen por la herida y con el tratamiento con ET, respectivamente. Además, hay una MADS-box 4 que se reprime por herida e infección, pero no por ET; una proteína NIN 2 que se reprime por infección y herida, pero no por ET; un factor de transcripción B3, una proteína aux/IAA que se reprimen en todas las condiciones respecto a aire y una proteína PDI con represión específica durante la infección.

Respecto a los 53 genes presentes en la micromatriz que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, se observó que 31 de ellos tienen expresión diferencial en infección respecto a herida y/o aire (Tabla 17). De los 8 genes que se inducen diferencialmente en infección respecto a herida hay 7 que codifican glutatión S-transferasas (GSTs), las cuales tienen semejanza con 4 genes homólogos diferentes de *A. thaliana*. El otro gen con expresión diferencial en infección respecto a herida codifica una glutatión peroxidasa. De estas 7 glutatión S-transferasas es de destacar que dos de ellas no se expresan en respuesta a herida y tres se inducen significativamente por ET. Además, hay varios genes con expresión diferencial en infección pero no en herida. Este es el caso de dos ascorbato peroxidasas, una glutatión peroxidasa, y dos glutatión S-transferasas, una de las cuales se induce también por ET. Finalmente, es de destacar la presencia de una glutatión S-transferasa que se induce en las tres condiciones respecto a aire.

Tabla 17. Unigenes de la micromatriz relacionados con el estrés oxidativo con mayor expresión diferencial (FDR<1%), tanto por inducción como represión, en infección respecto a herida y/o aire.

INDUCCIÓN						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
Glutation S-transferasa	C20007C12	At2g29420	4,00	-0,14	-4,00	-0,16
Glutation peroxidasa	C08019D05	At2g25080	4,00	-0,09	-4,00	0,03
Glutation S-transferasa 18	4728	At2g29420	0,96	-4,00	1,28	2,24
Glutation S-transferasa 22	5575	At2g30860	0,95	0,32	0,64	1,59
Glutation S-transferasa	549	At2g30860	0,87	0,06	0,37	1,24
Glutation S-transferasa 22	2496	At2g30860	0,86	0,15	0,60	1,46
Glutation S-transferasa 14	6484	At3g09270	0,34	0,34	0,38	0,72
Glutation S-transferasa 14	4908	At2g29420	0,34	0,20	0,10	0,44
glutation S-transferasa 14	4840	At2g29420	0,31	-0,06	-0,01	0,30
L-ascorbato peroxidasa	7204	At1g07890	0,29	-0,24	0,18	0,47
Glutation S-transferasa	C08004C03	At5g45020	0,28	4,00	4,00	4,00
Glutation S-transferasa	6741	At1g10360	0,27	0,75	0,97	1,23
Glutation peroxidasa	5480	At4g11600	0,25	-0,16	0,03	0,28
Glutation S-transferasa	6874	At1g10360	0,20	0,76	0,98	1,18
Ascorbato peroxidasa	C02003D06	At3g09640	0,19	-0,03	0,03	0,23
Glutation S-transferasa	7183	At2g47730	0,11	0,02	0,56	0,67
Glutation transferasa	7087	At1g78380	0,11	0,17	0,27	0,38
Glutation S-transferasa T3	6918	At2g29420	0,07	-0,05	0,12	0,18
Glutation S-transferasa	4853	At5g45020	0,02	0,28	0,23	0,25
Fosfolípido hidroperóxido glutation peroxidasa	6875	At4g11600	-0,12	-0,15	0,50	0,38
Glutation peroxidasa	6317	At4g11600	-0,22	-0,14	0,49	0,27

REPRESIÓN						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
Catalasa isoenzima 3	6855	At4g35090	-0,36	-0,24	-0,21	-0,57

Peroxidasa dependiente de tripanotona	C07004C08	At1g60420	-0,34	-0,66	-0,13	-0,48
Monodehidroascorbato reductasa	5068	At1g63940	-0,26	-0,02	-0,42	-0,68
Catalasa	7175	At4g35090	-0,26	-0,07	-0,08	-0,32
Monodehidroascorbato reductasa	4237	At3g09940	-0,24	-0,07	-0,25	-0,49
Superóxido dismutasa	7063	At3g10920	-0,24	-0,25	-0,25	-0,49
Glutation S-transferasa	4851	At1g78380	-0,21	-0,39	-0,16	-0,38
Superóxido dismutasa	6568	At3g10920	-0,18	-0,23	-0,19	-0,37
Superóxido dismutasa	7042	At5g51100	-0,09	-0,24	-0,18	-0,27
Glutation S-transferasa	6983	At5g02790	-0,07	0,11	-0,60	-0,67

En negrita se muestran aquellos valores diferenciales entre ambas condiciones con un FDR<1%

Se asigna valor 4,00 en el caso de no haber valor en el denominador, y -4,00 cuando no hay valor en el numerador

De los genes implicados en estrés oxidativo que se reprimen en alguna de las condiciones de estudio, hay 10 con expresión diferencial en infección respecto a aire, pero solamente tres de ellos tienen una expresión que disminuye diferencialmente en infección respecto a herida, una catalasa (CAT), que también se reprime por herida y ET, una superóxido dismutasa (SOD) y una glutatión S-transferasa, que está reprimida por ET pero no por herida. Además, destaca la presencia de una peroxidasa dependiente de tripanotona, una monodehidroascorbato reductasa, una catalasa y una superóxido dismutasa cuya expresión respecto a aire es diferencial en infección pero no en herida.

Por último, hay 80 genes en la micromatriz que codifican proteínas PR; 21 de ellos están inducidos en infección respecto a aire, 8 de los cuales tienen expresión diferencial en infección respecto a herida (Tabla 18). Un gen que codifica una proteína PR 1B tiene expresión específica en infección. Entre las que se expresan diferencialmente en infección respecto a herida hay tres peroxidases que también se inducen por ET, una taumatina, una proteína PR 4B, una β -1,3-glucanasa y una quitinasa clase IV. Además, hay dos quitinasas, dos β -1,3-glucanasas, dos PR 10A, que están reprimidas por ET, y una PR 5-1 con expresión diferencial en infección, pero no en herida respecto a aire. El gen con mayor inducción por ET es una osmotina que también se induce por infección y herida.

Tabla 18. Unigenes de la que codifican proteínas PR con mayor expresión diferencial (FDR<1%), tanto por inducción como represión, en infección respecto a herida y/o aire.

INDUCCIÓN						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
PR 1B	C02010A04	At4g33720	4,00	-	-	4,00
Peroxidasa	2218	At5g58390	1,54	0,59	0,21	1,75
Peroxidasa	6991	At2g38380	1,12	1,41	0,94	2,06
Taumatina	6959	At1g20030	0,98	0,07	0,68	1,67
PR 4B	C18001F07	At3g04720	0,76	-0,13	-0,09	0,67
Peroxidasa	6327	At5g06730	0,66	0,37	0,19	0,85
β-1,3-glucanasa	6718	At2g27500	0,52	0,63	0,36	0,88
β-1,3-glucanasa	6802	At3g57270	0,50	0,51	0,25	0,75
PR 10A	6785	At1g24020	0,47	-1,74	0,27	0,74
Quitinasa clase IV	6989	At3g54420	0,47	1,63	0,28	0,75
Quitinasa clase IV	5509	At3g54420	0,36	0,90	0,08	0,44
Proteína PR10A	7001	At3g61110	0,35	-0,50	0,07	0,42
β-1,3-glucanasa	237	At3g57270	0,31	0,59	0,44	0,75
PR 5-1	C18016E09	At4g11650	0,24	0,85	0,13	0,37
Osmotina	7174	At4g11650	0,19	1,75	0,53	0,72
β-1,3-glucanasa	6037	At3g57270	0,13	0,18	0,21	0,34
Quitinasa chiB	6912	At3g12500	0,09	0,42	0,23	0,31
Quitinasa	C18009A05	At4g19800	0,06	0,23	0,22	0,28
Thaumatina	5409	At2g28790	0,01	0,28	0,79	0,79
β-1,3-glucanasa	6800	At1g33090	-0,05	0,09	0,38	0,33
PR 4A	6567	At3g04720	-0,05	0,20	0,37	0,32

REPRESIÓN						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (I/W)	Log ₂ (E/A)	Log ₂ (W/A)	Log ₂ (I/A)
β-1,3-glucanasa	5536	At5g55180	-0,75	0,71	0,59	-0,16
LTP (PR 14)	6493	At3g18280	-0,50	-0,65	-0,17	-0,67

LTP (PR 14)	6950	At3g18280	-0,38	-0,71	-0,26	-0,64
LTP (PR 14)	176	At2g38540	-0,37	0,23	0,05	-0,32
LTP (PR 14)	5341	At3g18280	-0,36	-0,69	-0,33	-0,69
Peroxidasa	7179	At4g21960	-0,35	-1,62	-0,52	-0,87
PR 4A	4925	At3g04720	-0,33	-0,28	-0,23	-0,57
Peroxidasa	7163	At4g21960	-0,25	-1,40	-0,51	-0,76
LTP (PR 14)	4215	At1g27950	-0,21	-0,03	-0,13	-0,34
LTP (PR 14)	7150	At5g59320	-0,17	0,09	-0,01	-0,18
LTP (PR 14)	2163	At2g45180	-0,11	-4,00	-0,12	-0,23
Endoquitinasa	1960	At1g05850	-0,05	-4,00	-0,83	-0,87
PR STH21	7097	At1g24020	-0,04	-2,97	-0,87	-0,91
LTP (PR 14)	7231	At5g59310	-0,03	-0,06	-0,19	-0,23
LTP (PR 14)	6404	At2g38540	0,10	0,73	-0,73	-0,63

En negrita se muestran aquellos valores diferenciales entre ambas condiciones con un FDR<1%

Hay 15 genes que codifican proteínas PR con represión diferencial en infección respecto a herida. De ellos, 9 codifican LTP (PR 14). También hay dos genes que codifican peroxidasas, uno que codifica una PR STH21, uno que codifica endoquitinasa y uno que codifica PR 4A. Es de resaltar la presencia de un gen que codifica una proteína LTP, correspondiente al unigen 6404, que está reprimido por la infección y por herida pero que sin embargo se induce por ET. Además, hay un gen que codifica β -1,3-glucanasa que se induce por herida y ET, pero que se reprime, aunque no de forma significativa, durante la infección.

5. Análisis de la expresión génica en frutos cítricos en respuesta a herida, infección y etileno mediante hibridación Northern.

El análisis de las hibridaciones con macro- y micromatrices permitió identificar genes de frutos cítricos con patrones de expresión diferenciales en respuesta al tratamiento de los frutos con ET, herida o infección con *P. digitatum*. A partir de los resultados obtenidos se hizo una selección de clones basada en su perfil de expresión diferencial o en su implicación en

rutas del metabolismo secundario, para analizar posteriormente su expresión mediante hibridación Northern. El análisis Northern permitió, por un lado, la confirmación de los resultados obtenidos previamente por técnicas de alto rendimiento y, por otro lado, el estudio temporal de la expresión para cada una de las condiciones de interés. Mediante el análisis Northern se ha podido realizar, además, una comparación directa del comportamiento de los distintos genes estudiados en mandarina o naranja en cada una de las condiciones estudiadas.

5.1. Expresión diferencial de genes de frutos cítricos en respuesta a la infección.

Para el estudio de las respuestas de los frutos cítricos a la infección por *P. digitatum* y al tratamiento con ET, se prepararon filtros para realizar hibridaciones Northern a partir de RNA de naranjas 'Navelate' o mandarinas 'Clemenules' que contienen las mismas muestras que fueron utilizadas para las hibridaciones con las macro- y micromatrices, pero incluyendo además diferentes tiempos de toma de muestras y controles adicionales. De esta manera se elaboraron diferentes filtros para la evaluación, por un lado, del efecto de distintos tratamientos con ET o 1-MCP respecto a frutos tratados con aire y frutos recién recogidos de campo, y, por otro lado, de la respuesta de los frutos a la herida y la infección respecto de frutos intactos, a diferentes tiempos.

Para la normalización de las señales de hibridación de cada mRNA, se hibridaron todos los filtros con una sonda proveniente de un fragmento del gen 26S rRNA de *C. sinensis* (Figura 40).

Los valores de acumulación relativa de cada mRNA se obtuvieron dividiendo la señal de hibridación de cada muestra entre la obtenida con la sonda del fragmento ribosómico de naranja. Posteriormente se realizó una segunda normalización, que consistió en asignar un valor arbitrario de 1,0 a la señal de una de las muestras y referir el resto de valores de la hibridación a ella. Para los filtros con las muestras control, herida e infección a diferentes tiempos, se les asignó el valor 1,0 a la señal de la muestra de infección a las 24 horas. Por otro lado, en el caso de los filtros con los diferentes tratamientos, se le asignó el valor 1,0 a las muestras de control de pretratamientos. Los valores de expresión normalizados se muestran debajo de cada señal de hibridación, asignándose el valor "n.d."

("no detectado") a aquellos valores que no superaron en dos veces la intensidad del ruido de fondo.

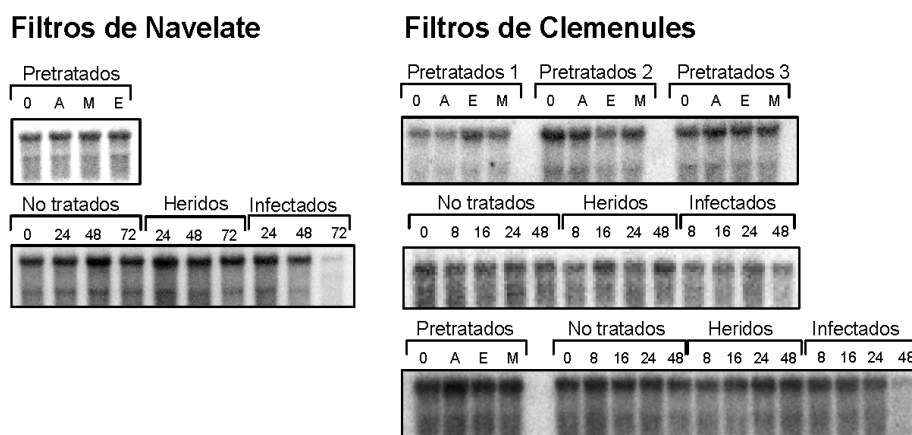


Figura 40. Imagen de la hibridación de los filtros utilizados para el análisis Northern hibridados con un fragmento del gen 26 rRNA de *C. sinensis*. Los filtros fueron posteriormente utilizados para la hibridación con diferentes sondas seleccionadas a partir de los resultados de las macro- y micromatrices. 0) Frutos recién recogidos del campo. A) Frutos tratados con aire 16 horas. M) Frutos tratados con 1-MCP (500 ppb). E) Frutos tratados con ET (10 ppm)

El conjunto de resultados de las hibridaciones realizadas se ha agrupado según la ruta metabólica en la que está implicado cada gen analizado. Así pues, las figuras se ordenan por metabolismo de aminoácidos implicados en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario (A), metabolismo de fenilpropanoides (B), metabolismo de alcaloides (C) y, finalmente, metabolismo de isoprenoides (D) y derivados de isoprenoides (E).

El patrón general de expresión temporal de los genes seleccionados corresponde con unos niveles de expresión bajos o nulos en los frutos no tratados, con un ligero aumento en respuesta a herida y un aumento más acusado en respuesta a la infección y donde el máximo de expresión depende de cada gen. Hay, sin embargo, algunos casos que no muestran este perfil general, como la antranilato fosforribosiltransferasa (*TrpD*) (Figura 41, A) y la UDP-glucosil transferasa (*UGT*) (Figura 42), los cuales no muestran variación de la expresión con la infección, o la

citocromo monooxigenasa (*CYPM*) (Figura 42, B) que reprime su expresión por el ET, la herida, y sobre todo la infección.

La hibridación Northern de una misma sonda con filtros de mandarina 'Clemenules' y naranja 'Navelina' ha permitido detectar diferencias de expresión entre los frutos. Aunque en líneas generales se observa que para una misma sonda el comportamiento en las diferentes condiciones de trabajo es el mismo, casi siempre se aprecian diferencias tanto en los tiempos como en los niveles de expresión.

En algunos casos sí se han detectado diferencias importantes de expresión entre 'Clemenules' y 'Navelina', especialmente en respuesta al tratamiento con ET. Este es el caso de un gen que codifica una desoxi-D-arabino heptulosonato-7-fosfato sintasa (*DAHP*) (Figura 41, A), que se induce por el tratamiento con ET en frutos 'Navelate' pero no lo hace en 'Clemenules'. Otro ejemplo es el de una proteína implicada en la biosíntesis de isoprenoides (*GcpE*) (, D), que también muestra inducción por el tratamiento con ET en 'Navelate' pero no en 'Clemenules'.

De los genes implicados en la síntesis de aminoácidos precursores del metabolismo secundario se observa un patrón de expresión muy heterogéneo, habiendo diferencias incluso entre frutos de 'Navelate' y 'Clemenules' para un mismo gen. Este hecho se observa en la expresión de la 3-fosfosiquimato-1-carboxibiniltransferasa (*EPSPs*) (Figura 41, A). En 'Navelate' este gen se expresa a tiempos cortos después de practicar la herida o infectar los frutos, mientras que en 'Clemenules' no se aprecia expresión en respuesta a la herida o durante la infección. En ambos casos se comprueba, sin embargo, una importante inducción por la aplicación de ET. El gen *TrpD* muestra muy baja expresión en frutos de 'Clemenules' en cualquiera de las condiciones ensayadas.

En el metabolismo de fenilpropanoides, se observa un patrón general de expresión de todos los genes bastante homogéneo, con una ligera inducción a tiempos cortos en respuesta a la herida, y mayor inducción en respuesta a la infección. Hay, sin embargo, varias excepciones. La acetil transferasa (*AT*) (Figura 42, B) en 'Navelate' expresa al menos dos transcritos, uno de los cuales se detecta por la herida y sobre todo por infección y ET, mientras que el otro muestra prácticamente el patrón contrario, apareciendo en los frutos no tratados pero disminuyendo su presencia en los frutos heridos y desapareciendo en los frutos infectados. En 'Clemenules' se aprecian tres transcritos, de los que dos tienen expresión diferencial por ET, herida y sobre todo por infección, mientras que el otro muestra expresión en todas las condiciones, aunque algo más durante la infección. El gen que codifica una peroxidasa (*POX*) (Figura 42, B) muestra una expresión alta tanto en respuesta a herida como a la infección, sin embargo su expresión no sólo no se induce por ET, sino que se reprime. El gen que codifica una UDP-glucosil transferasa (*UGT*) (Figura 42, B) es un ejemplo de inducción clara con ET, pero con una expresión muy pobre en el resto de condiciones. Los genes *PAL*, *CYP79A1*, *COMT*, *OX* y catecol-O-metil transferasa (*CaMT*) mantienen el patrón general de expresión, con ligera inducción por herida y más alta en respuesta a la infección, aunque a diferentes tiempos. Los genes que codifican fenilalanina amonio liasa (*PAL*), ácido cafeico-O-metiltransferasa (*COMT*) y la *CaMT* no muestran respuesta al tratamiento con ET. El gen *CYP79A1* (Figura 42, B) muestra una expresión diferencial en respuesta a la infección a las 24 h y sobre todo a las 48 h.

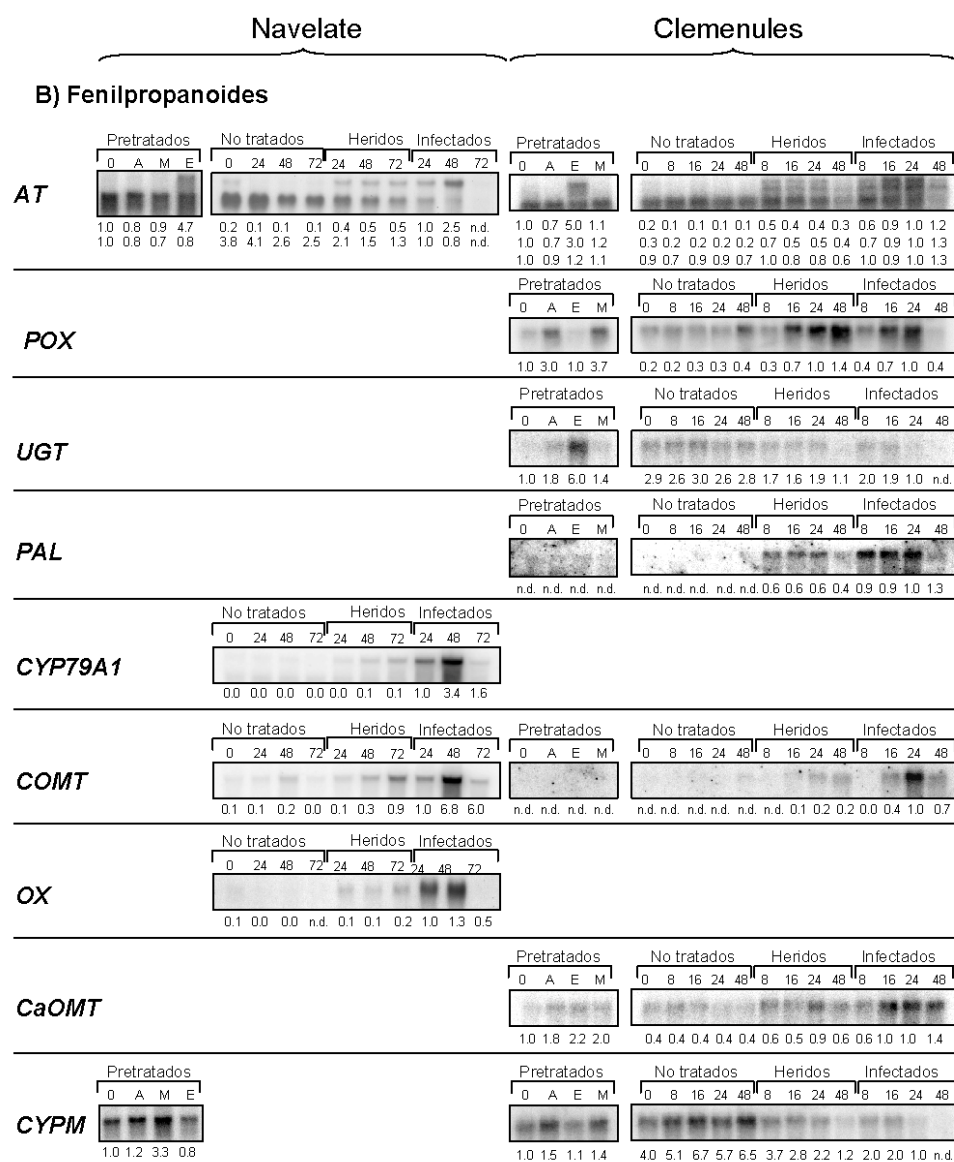


Figura 42. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: fenilpropanoides. El análisis se realizó con RNA de frutos 'Navelate' y 'Clemenules'. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con: acetiltransferasa (*AT*, N17B07), peroxidasa (*POX*, C06015A10) UDP-glucosil transferasa (*UGT*, C06020A02), fenilalanina amonio liasa (*PAL*, N06E02), citocromo P450 79A1 (*CYP79A1*, N04D08), ácido cafeico 3-O-metil transferasa (*COMT*, N04G08), oxidorreductasa (*OX*, N03E06), catecol-O-metil transferasa (*CaMT*, C06015F01) y citocromo monooxigenasa (*CYPM*, N05D12).

En el grupo de metabolismo de alcaloides todas las sondas hibridadas comparten la inducción en respuesta a la infección, aunque con diferente evolución temporal. De los cinco genes analizados, se inducen por el tratamiento con ET un gen que codifica una tropinona reductasa (*TR*), un gen que codifica una proteína con dominio de unión a FAD (*FBD*) y un gen que codifica de las dos nectarina 5 o “berberine bridge enzyme” (*BBE-1*), aunque solamente en ‘Navelate’ (Figura 43, C). Destaca el hecho de que los 5 genes parecen mostrar inducción marcadamente específica de la infección, mientras que sólo los genes *TR* y *BBE-2* se inducen en respuesta a herida. Respecto al grupo de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides y sus derivados, se aprecia, en general, un patrón de expresión bastante uniforme en respuesta a todas las situaciones.

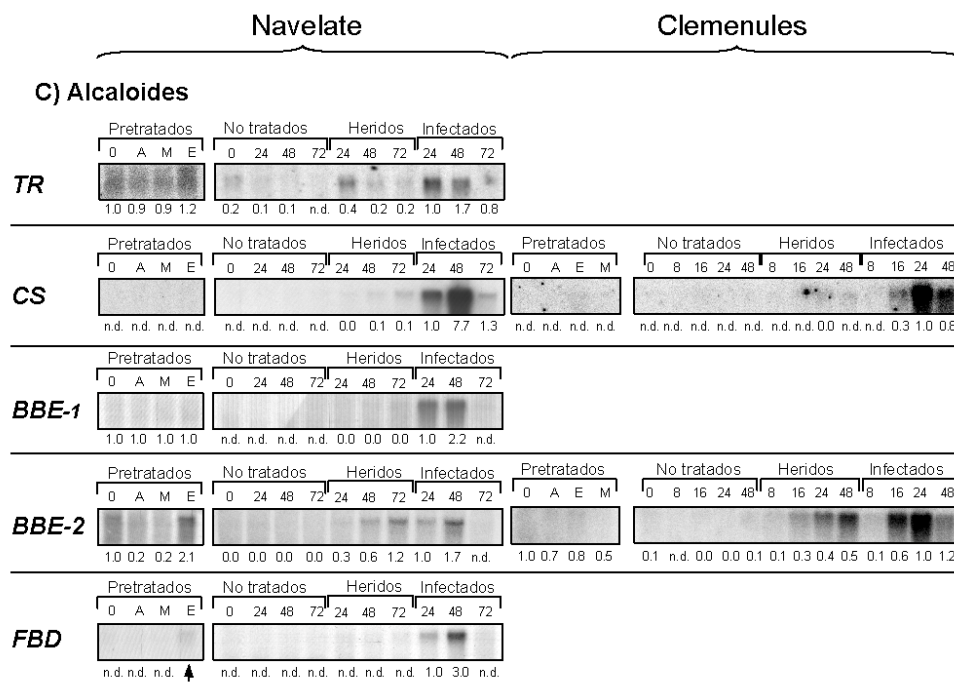


Figura 43. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: alcaloides. El análisis se realizó con RNA de frutos ‘Navelate’ y ‘Clemenules’. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: tropinona reductasa (*TR*, N08F02), cafeína sintasa (*CS*, N12F02), dos nectarinas 5 diferentes (*BBE-1*, N09B03, y *BBE-2*, N04D12) y proteína con dominio de unión a FAD (*FBD*, N06E10).

Respecto al grupo de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides y sus derivados, se aprecia, en general, un patrón de expresión bastante uniforme en respuesta a todas las situaciones. Como excepción a este perfil se encuentran dos genes que se inducen en respuesta a la infección, un gen implicado en la biosíntesis de isoprenoides (*GcpE*) (, D) y otro que codifica una ácido homogentísico geranylgeranyl transferasa (*HGGT*) (, E). La respuesta a ET es variable, observándose inducción en la expresión del gen *GcpE*, aunque sólo en frutos 'Navelate', y represión en el gen metileritritol-5-fosfato sintasa (*MECPs*), especialmente en 'Clemenules' (, D).

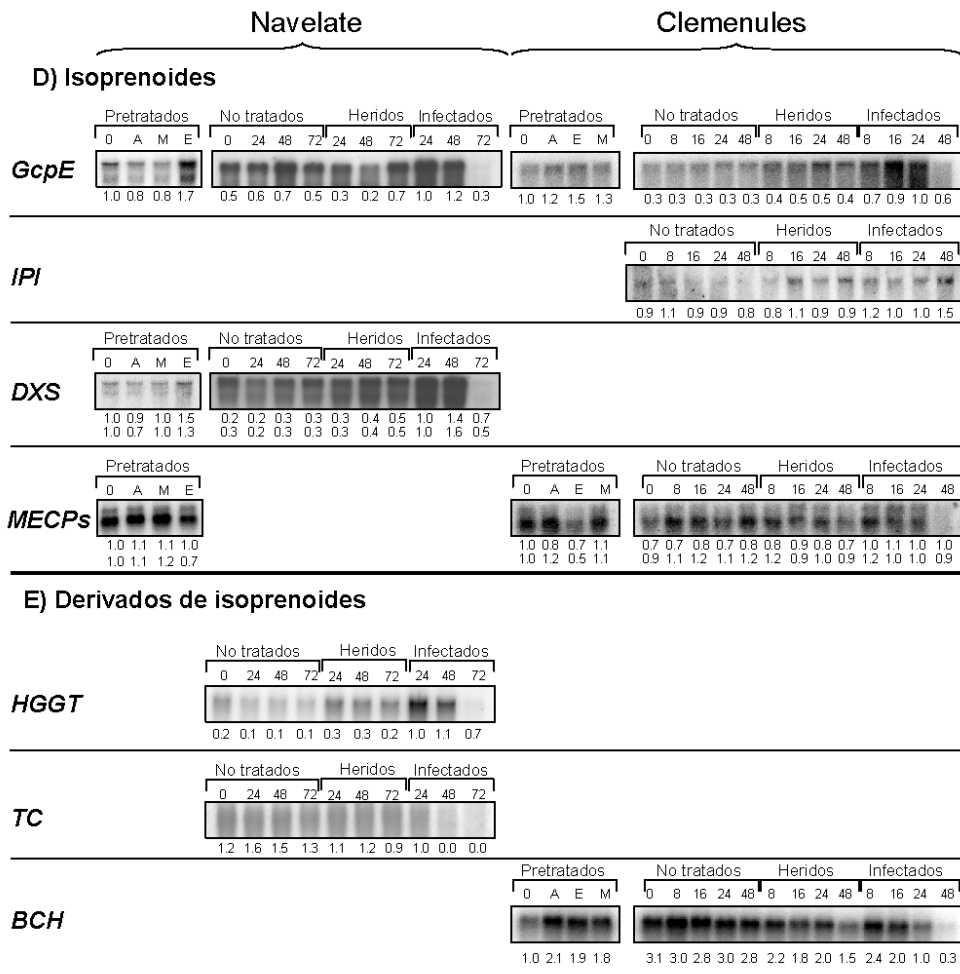


Figura 44. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo secundario: isoprenoides y derivados de isoprenoides. El análisis se realizó con RNA de frutos 'Navelate' y 'Clemenules'. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: proteína de biosíntesis de isoprenoides (*GcpE*, N13A02), isopentenil-pirofosfato isomerasa (*IPi*, C06004H08), 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (*DXS*, N02C06), metileritritol-ciclofosfato sintasa (*MECPs*, C06011C01), ácido homogentísico geranilgeranil transferasa (*HGGT*, N14H09), tocoferol ciclasa (*TC*, N14C01) y β -caroteno hidroxilasa (*BCH*, N03B01).

5.2. Implicación del etileno en la expresión de genes por la infección de frutos cítricos.

Los anteriores estudios realizados mediante transcriptómica e hibridación Northern de la expresión de genes relacionados con la respuesta a la infección han indicado la relevancia del ET en la regulación de la expresión de algunos de los genes implicados en este proceso. Para profundizar más en esta cuestión, primeramente se hizo un estudio sobre el comportamiento debido a la herida o como respuesta a la infección, de aquellos genes implicados en la síntesis de ET.

Ya se había observado cómo la infección de frutos de mandarina 'Clemenules' por el patógeno *P. digitatum*, supone la inducción en la expresión de al menos tres de los genes implicados en los dos últimos pasos de la biosíntesis de ET: *CsACS1*, *CsACS2* y *CsACO* (Figura 17). Por otro lado, al estudiar la identidad de los genes pertenecientes a las bibliotecas de cDNA utilizadas durante esta tesis (*RindPdig24*, *PostharvP1* y *RindPdigS*) se encontraron genes que forman parte de las rutas de síntesis de ET a partir de metionina, ciclo de la metionina y ciclo de SAM. El estudio mediante hibridación Northern permitió observar una regulación diferencial de estos genes por el propio ET y en respuesta a la infección (Figura 45).

Tanto el gen que codifica una cistationina sintasa (*CBS*) como el de una adenosil homocisteinasa (*AHCY*) codifican proteínas que forman parte de rutas que proveen de homocisteína, precursor de la síntesis de metionina (Figura 35). El gen *AHCY* tiene una inducción baja en respuesta a herida y algo mayor en infección, con un pico de expresión a las 16 horas (Figura 45). La metionina sintasa (*Meth*) es la enzima que sintetiza metionina a partir de homocisteína y adenosina. La infección induce, aunque de manera bastante leve, la expresión del gen que codifica esta enzima, el cual muestra inducción en respuesta a herida después de las 24 h. Según muestran los resultados de hibridación, su expresión no está inducida por la aplicación de ET. La S-adenosil-L-metionina sintetasa (*SAMS*) cataliza la síntesis de S-adenosil-L-metionina a partir de metionina. Este gen tiene unos niveles de expresión muy bajos pero se aprecia una leve inducción por la infección a partir de las 16 horas. Su expresión tampoco está inducida por la aplicación de ET. Por último, la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa (*SAMDC*) dirige SAM hacia el

metabolismo de las poliaminas (Kakkar y Sawhney, 2002). El gen que codifica esta enzima, sin embargo, está inducido por el ET, la herida y la infección, antes de las 24 horas.

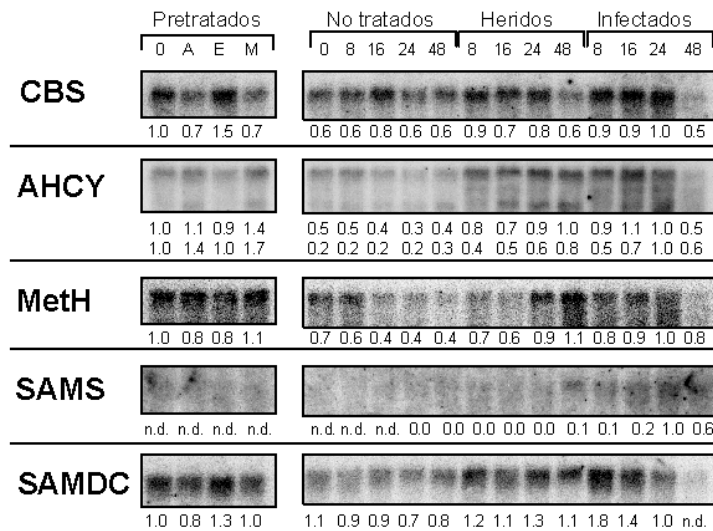


Figura 45. Análisis Northern de genes relacionados con la síntesis de ET y el metabolismo de la S-adenosilmetionina (SAM). El análisis se realizó sobre filtros con RNA de frutos *Clemenules*. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: S-adenosilmetionina descarboxilasa (*SAMDC*, C06015C04), metionina sintasa (*MethH*, N14F01), S-adenosilmetionina sintetasa (*SAMS*, C06010A02), adenosilhomocisteinasa (*AHCY*, C06004F08) y cistationina sintasa (*CBS*, C06018F11).

El estudio del efecto de los tratamientos con aire, ET y 1-MCP aporta información sobre el efecto autorregulador del ET sobre su propia síntesis inducida por la herida o la infección, y, además, sobre la regulación por ET de la expresión de diferentes genes. Los estudios de hibridación Northern se han llevado a cabo analizando tres experimentos de pre-tratamientos de frutos 'Clemenules', realizados durante las campañas 03/04 y 04/05 (Figura 46). Los genes *UGT*, *CBS*, *L*-asparaginasa (*LAS*) y pectato liasa (*PL*) son ejemplos de genes cuya expresión se induce con el tratamiento con ET. *POX* y *CYP79A1* tienen el comportamiento opuesto, reprimiéndose su expresión por el tratamiento con ET. En general, el patrón de expresión de un gen se mantiene, variando los niveles de expresión, entre réplicas.

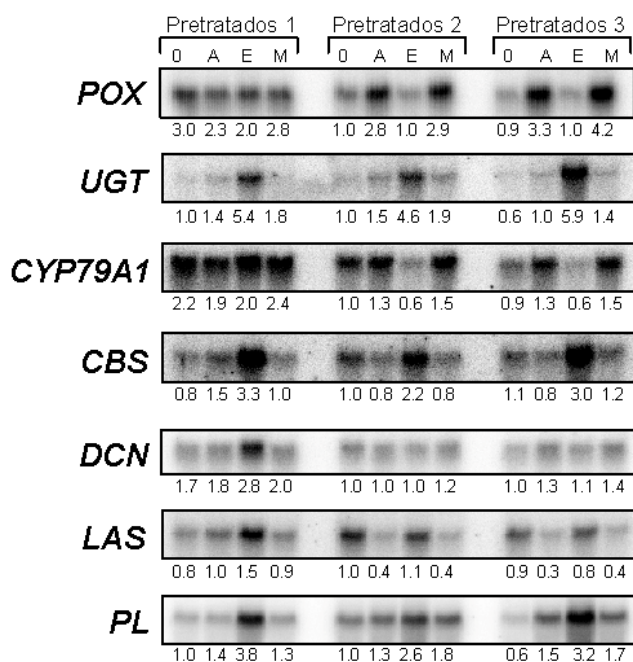


Figura 46. Análisis Northern de genes con expresión diferencial en respuesta a ET en frutos *Clemenules* recién recogidos del campo (0), pretratados con aire (A), ET (10 ppm) (E) y 1-MCP (500 ppb) (M) en tres réplicas diferentes. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: peroxidasa (*POX*, C06015A10), UDP- glucosil transferasa (*UGT*, C06020A02), citocromo P450 79A1 (*CYP79A1*, N04D08), cistationina sintasa (*CBS*, C06018F11), dicianina (*DCN*, N11B04), L-asparaginasa (*LAS*, C06014A10), pectato liasa (*PL*, C06024G01). Los valores de pretratamientos están referidos al valor del control sin pretratar en la campaña 2 (Pretratados 2, 0).

Sin embargo, en algunos casos las diferencias entre réplicas biológicas son bastante grandes. El caso más llamativo es el del gen que codifica una dicianina (*DCN*), que solamente se indujo por ET en el experimento 1, pero no mostró inducción en los otros dos. De hecho, es este experimento el que presentó las diferencias más significativas cuando se comparó con los otros dos. Los genes *POX* y *CYP79A1* muestran un patrón general de represión por ET; sin embargo, en el experimento 1 los niveles de expresión de ambos genes después de cada tratamiento son muy parecidos. Los genes *CBS* y *LAS* muestran unos patrones de

expresión de inducción por el tratamiento con ET, con cierto nivel de expresión en las muestras sin pretratamiento para las réplicas 2 y 3, pero no para la réplica 1.

Los resultados de expresión génica mediante la hibridación de macro- y micromatrices nos han permitido descubrir una serie de genes con inducción o represión en cada una de las condiciones de estudio o por combinación de ellas mediante la elaboración de diagramas de Venn (Figura 23 y Figura 33). Estos resultados no reflejan, sin embargo, la presencia de genes con patrones de expresión más complejos, con inducción en alguna condición y represión en otras. En este sentido, habría que destacar la presencia de genes relacionados con la respuesta del fruto a la infección que muestran diferentes comportamientos en respuesta al tratamiento con ET. Basándonos en estas respuestas, se pueden establecer cuatro patrones de comportamiento de los genes según la respuesta conjunta a la infección y al tratamiento con ET: genes inducidos tanto por el tratamiento con ET como por la infección (Patrón 1), genes que se inducen por el tratamiento con ET, pero que no se inducen por la infección (Patrón 2), genes que no se inducen por el ET, pero que sí se inducen durante el proceso de infección (Patrón 3), y, por último, genes que no se inducen con ET ni en respuesta a la infección (Patrón 4).

A partir de los resultados de hibridación de las macro- y micromatrices, se seleccionaron una serie de genes que presentaban un perfil de expresión diferencial en respuesta a herida, infección y ET. La hibridación Northern con sondas obtenidas a partir de estos genes ha permitido confirmar la expresión diferencial de cada uno de ellos. En la Figura 47 y la Figura 48 se muestran ejemplos de genes con cada uno de los patrones de expresión mencionados, tanto en naranjas 'Navelate', como en mandarina 'Clemenules', respectivamente.

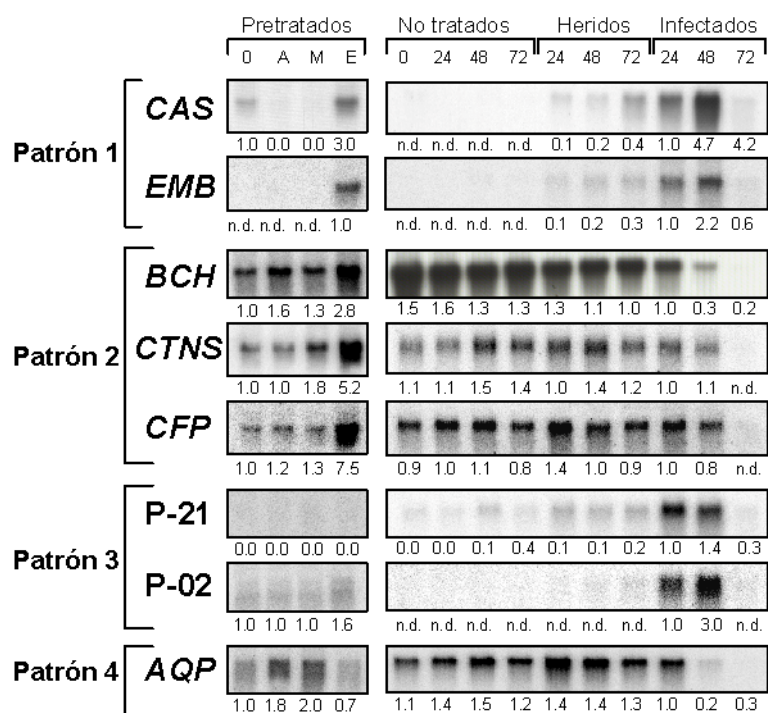


Figura 47. Análisis Northern de genes de naranjas 'Navelate' con expresión diferencial en respuesta a la infección y al tratamiento con ET siguiendo cuatro tipos de patrones: genes inducidos tanto por el tratamiento con ET como por la infección (Patrón 1), genes que se inducen por el tratamiento por ET pero que no responden a la infección (Patrón 2), genes que no responden al ET pero que se inducen en respuesta a la infección (Patrón 3), y genes que no responden ni al tratamiento con ET ni como respuesta a la infección (Patrón 4). Se utilizaron filtros con RNA de frutos 'Navelate'. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: proteína celular implicada en apoptosis (*CAS*, N13E10), Proteína abundante embrionaria (*EMB*, N04D11), β -caroteno hidroxilasa (*BCH*, N03B01), cistinosina (*CTNS*, N17G03), ciclasa (*CFP*, N06H10), P0468B07.6 (*P-21*, N03A05), sin proteína semejante (*P-02*, N02H01), acuaporina (*AQP*, N13F07).

En el caso de naranjas 'Navelate' (Figura 47), los genes que codifican una proteína celular implicada en apoptosis o "cellular apoptosis susceptibility protein" (*CAS*) y una *EMB* tienen un perfil de expresión muy semejante, con inducción por ET y por infección, y unos niveles de inducción más bajos en respuesta a herida. El gen que codifica una cistinosina (*CTNS*) y el que codifica una ciclasa (*CFP*) tienen inducción por

ET y, sin embargo, sus niveles de expresión por infección no están inducidos respecto a los frutos control sin tratamiento. El gen *BCH* que codifica una β -caroteno hidroxilasa muestra también inducción de la expresión por ET, pero su expresión durante la infección está reprimida. Los genes que codifican una proteína con homología a P0468B07.6 (Contig P-21) y una proteína sin homología en *A. thaliana* o "No blast match" (Contig P-02) muestran altos niveles de expresión durante la infección, pero no responden al tratamiento con ET. Finalmente, el gen de la acuaporina (*AQP*) sufre una represión de su expresión en respuesta al tratamiento con ET y también en respuesta a la infección a partir de las 48 horas después de la inoculación.

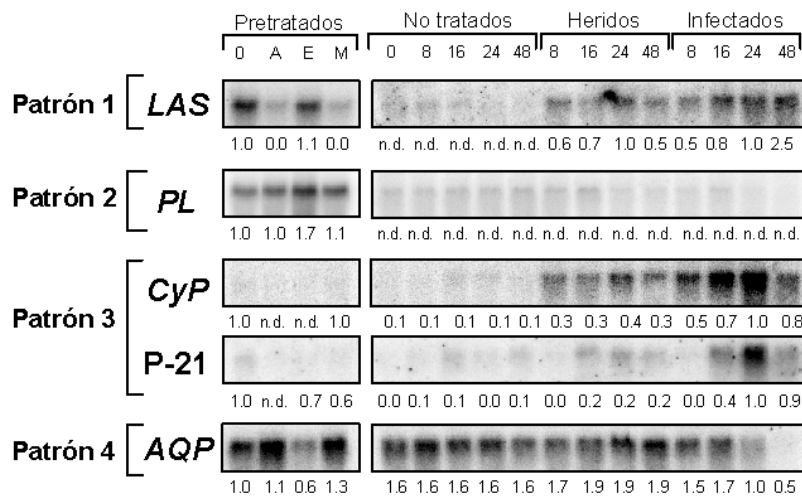


Figura 48. Análisis Northern de genes de mandarinas 'Clemenules' con expresión diferencial a la infección y al tratamiento con ET siguiendo cuatro tipos de patrones: genes inducidos tanto por el tratamiento con ET como por la infección (Patrón 1), genes que se inducen por el tratamiento por ET pero que no responden a la infección (Patrón 2), genes que no responden al ET pero que se inducen durante el proceso de infección (Patrón 3), y genes que no responden ni al tratamiento con ET ni como respuesta a la infección (Patrón 4). Se utilizaron filtros con RNA de frutos 'Clemenules'. (véase detalles en el pie de la Figura 41). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: L-asparaginasa (*LAS*, C06014A10), pectato liasa (*PL*, C06024G01), ciclofilina (*CyP*, C06022E12), P0468B07.6 (P-21, N03A05) y acuaporina (*AQP*, N13F07).

En el caso de mandarinas 'Clemenules' también se han encontrado genes que cumplen los patrones de expresión que hemos descrito (Figura

48). El gen que codifica una L-asparaginasa (*LAS*) sufre una leve inducción de la expresión en respuesta a herida, que aumenta considerablemente por la infección, y también se induce significativamente por el tratamiento con ET. El gen que codifica una pectato liasa (*PL*) muestra una inducción como respuesta al ET, pero no parece estar implicada en las respuestas a la herida ni a la infección. El gen que codifica una ciclofilina (*CyP*) y una P0468B07.6 (P-21) son dos genes que no responden al tratamiento con ET y, sin embargo, se inducen claramente durante la infección, siendo su respuesta a la herida baja o muy baja. Un gen que codifica acuaporina (*AQP*) en naranjas también mostró represión por ET y por infección, apreciándose disminución de la expresión a las 24 horas.

5.3. Comparación de la respuesta de naranjas ‘Navelate’ a la infección con hongos patógenos y no patógenos del género *Penicillium*.

Por último, se hizo un estudio comparativo de la respuesta de frutos de naranja ‘Navelate’ a la interacción con hongos del género *Penicillium*, patógenos y no patógenos de cítricos. Para ello, además del aislado PHI-26 de *P. digitatum*, se utilizaron otros tres hongos diferentes: el aislado PHI-1 de *Penicillium italicum*, patógeno de cítricos y causante de la podredumbre azul, el aislado PHI-8 de *Penicillium brevicompactum*, que no es patógeno de frutos, y el aislado PHI-65 de *Penicillium expansum*, patógeno de frutos de pepita pero con poca capacidad infectiva en frutos cítricos.

Un estudio sobre la patogenicidad de estos hongos en frutos cítricos nos confirmó que *P. digitatum* es el hongo más virulento en cítricos, con aproximadamente el 80% de las heridas infectadas a los 3 días y un 90 % a los 7 días (Figura 49). *P. italicum* también produjo infección, aunque en menor medida, llegando a infectar más del 70% de las heridas al quinto día después de la infección. La capacidad infectiva de *P. expansum* fue mucho menor que la de *P. digitatum* y *P. italicum*, empezando a observarse los primeros síntomas de infección a los 5 días de la inoculación y llegando escasamente al 20 % de frutos infectados a los 7 días. Por su parte, *P. brevicompactum* no produjo infección en los frutos.

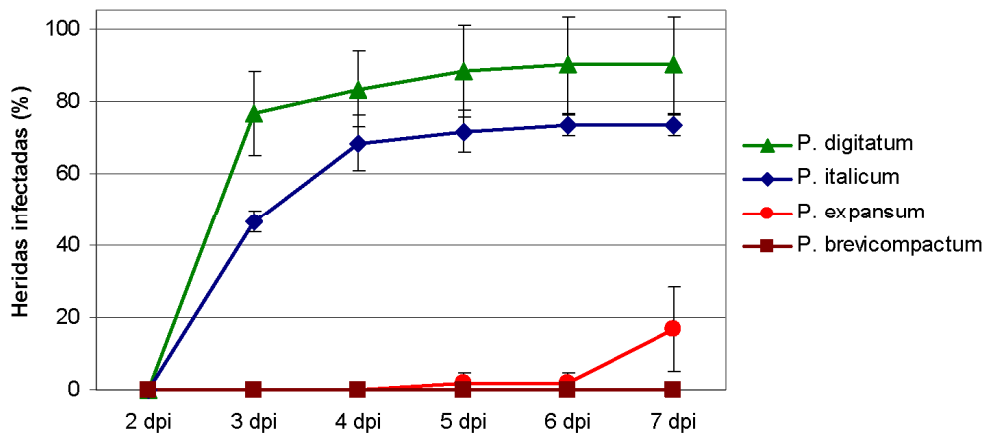


Figura 49. Incidencia de la infección de naranjas 'Navelate' causada por los aislados PHI-1 de *P. digitatum*, PHI-8 de *P. brevicompactum*, PHI-26 de *P. digitatum* y PHI-65 de *P. expansum* inoculados a una concentración de 10^6 conidios/mL. Los resultados se representan como valores medios del porcentaje de infección \pm SD para cada inóculo y día. En cada uno de los experimentos se inocularon tres réplicas de 5 frutos (4 heridas por fruto).

Paralelamente, se recogieron muestras de tejido de frutos infectados con los cuatro hongos para la realización de hibridaciones Northern. Además, se realizó una hibridación con una sonda del gen ribosomal 26S de *C. sinensis* para la normalización y posterior cuantificación de cada uno de los resultados de las hibridaciones Northern (Figura 50). Estos resultados muestran como PHI-26 es el hongo más infectivo, observándose a las 72 horas la presencia de RNA fúngico en la tinción con azul de metileno y una leve degradación del RNA ribosómico del fruto en la hibridación con el gen ribosomal.

Los filtros se hibridaron empleando como sondas distintos genes relacionados con los procesos de síntesis de ET y metabolismo de SAM, metabolismo de isoprenoides, fenilpropanoides y alcaloides, y finalmente otros genes de función metabólica desconocida, pero con expresión diferencial en respuesta a la infección con *P. digitatum*.

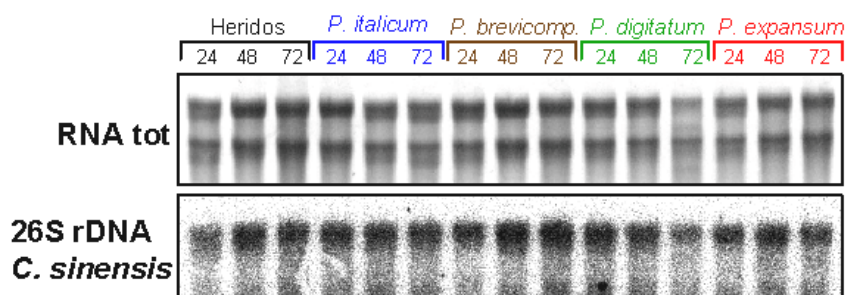


Figura 50. Tinción con azul de metileno (RNA tot) e hibridaron con un fragmento del gen 26 rDNA de *C. sinensis* (26S rDNA *C. sinensis*), de dos filtros utilizados para hibridación Northern con RNA de frutos 'Navelate' heridos o infectados con 10^6 conidios/mL de cuatro hongos diferentes del género *Penicillium*.

Al estudiar la respuesta de los genes implicados en la síntesis de ET a la infección por los cuatro hongos se observó que *P. digitatum* es el hongo que produce una mayor inducción en la expresión de todos ellos (Figura 51, A). Los hongos no patógenos de cítricos también indujeron la expresión de *CsACS1*, *CsACS2* y *CsACO*, aunque de forma más tardía, a partir de las 48 o 72 horas y con intensidades menores. Un gen que codifica una SAMDC muestra unos niveles de expresión muy bajos durante la infección por cualquiera de los hongos y comparables con los de herida. Esto concuerda con los resultados de la Figura 45, donde la expresión de SAMDC casi ha desaparecido a las 24 horas. En cambio, *MetH*, que codifica la enzima de síntesis de metionina, precursora del ET, es uno de los genes cuya mayor expresión no se produce por la infección con *P. digitatum* sino por *P. italicum*, y es de destacar la alta expresión causada por *P. expansum* a las 72 horas. Este gen no se relaciona directamente con la virulencia de los distintos hongos, sino que parece responder de forma general a la herida y al intento de infección de los *Penicillium*.

En el grupo de genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides (Figura 52, B) se analizó la expresión de los genes *AT*, *UGT*, *PAL* y *COMT*, que presentan distintos patrones de expresión en respuesta a la infección por *P. digitatum* (véase Figura 42).

A) Síntesis de etileno y metabolismo de SAM

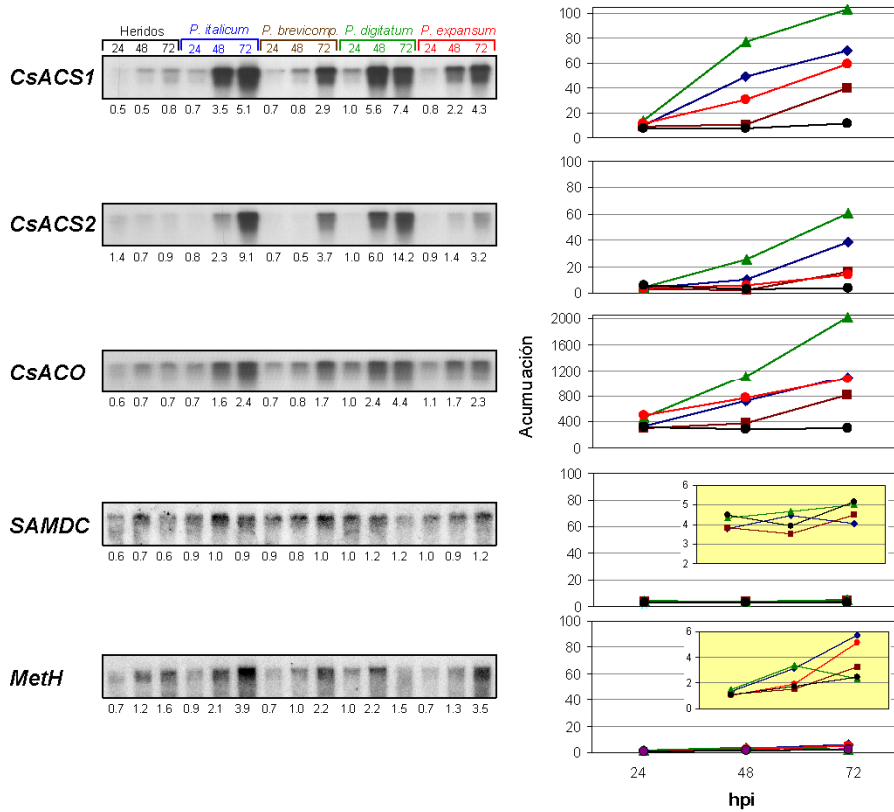


Figura 51. Análisis Northern de genes relacionados con la síntesis de ET y el metabolismo de S-adenosil metionina (SAM) durante la infección por hongos del género *Penicillium*. Naranjas 'Navelate' fueron heridas o inoculadas con los aislados PHI-1 de *P. italicum*, PHI-8 de *P. brevicompactum*, PHI-26 de *P. italicum* y PHI-65 de *P. expansum* a una concentración de 10^6 conidios/mL. Los frutos se almacenaron a 20 °C y se recogió tejido de corteza a las 24, 48 y 72 hpi. Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: ACC sintasa 1 (*CsACS1*), ACC sintasa 2 (*CsACS2*), ACC oxidasa (*CsACO*), S-adenosilmetionina descarboxilasa (*SAMDC*, C06015C04), metionina sintasa (*MethH*, N14F01). Para cada uno de los genes analizados, la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto al de la sonda 26S rRNA de *C. sinensis*. Al pie de cada figura se indica la acumulación relativa referida al valor de infección con PHI-26 a las 24 hpi (PHI-26, 24). La gráfica muestra los valores de la expresión de cada gen una vez normalizados con el valor del RNA ribosómico de *C. sinensis*.

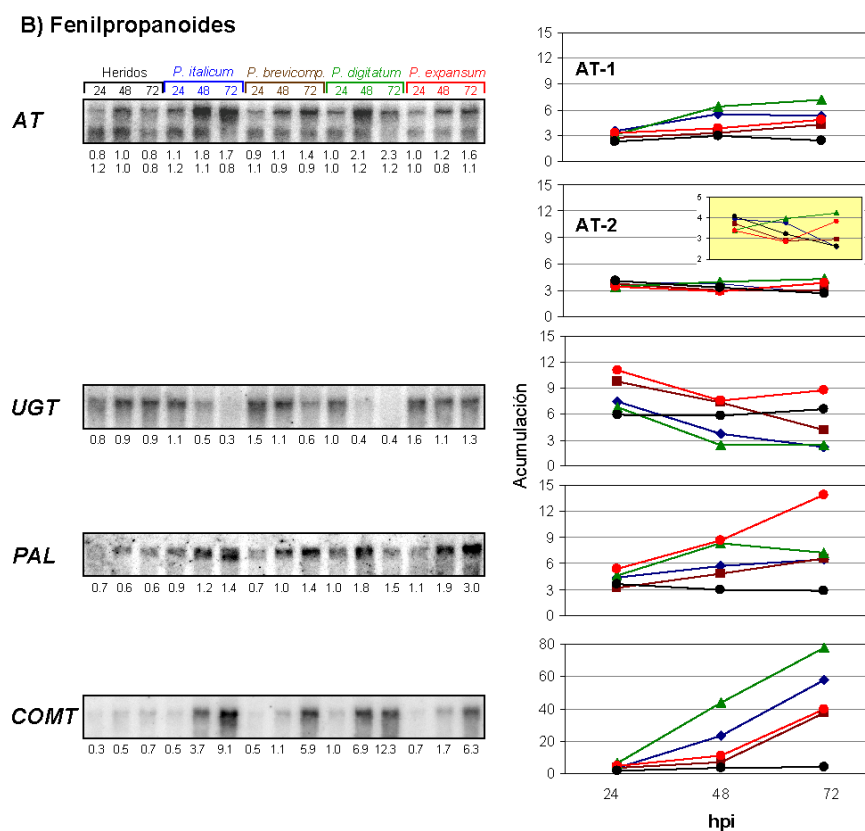


Figura 52. Análisis Northern de genes de naranjas 'Navelate' relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides durante la infección por hongos del género *Penicillium* (véase detalles en el pie de la Figura 51). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: acetiltransferasa (*AT*, N17B07), UDP-glucosil transferasa (*UGT*, C06020A02), fenilalanina amonio liasa (*PAL*, N06E02), ácido cafeico 3-O-metil transferasa (*COMT*, N04G08).

La sonda del gen *AT* hibrida con dos transcritos diferentes, que tienen patrones de expresión diferentes. Uno de ellos (*AT-2*) muestra un nivel de expresión bastante uniforme, tanto por herida como en respuesta a la infección por cualquiera de los hongos. El otro (*AT-1*) presenta un nivel de expresión relativamente uniforme por efecto de la herida, pero se induce en el tiempo como consecuencia de la infección por cualquiera de los cuatro hongos, y con mayor intensidad y rapidez en *P. italicum* y en *P. digitatum*. Este es el patrón de expresión más general para la mayoría de

los genes que se inducen como respuesta del fruto a la infección. Este es el caso de los genes *PAL* y *COMT*, los cuales mantienen un patrón de expresión similar. El primero tiene cierto nivel de expresión en respuesta a la herida, y la respuesta a cada hongo es lenta. *COMT* no muestra expresión por herida, y el aumento de expresión como respuesta a la infección por cada hongo fue mucho mayor que en el caso de *PAL*. *UGT* se reprime por la infección solamente cuando el fruto se infecta por los dos hongos patógenos de cítricos y más rápidamente con *P. digitatum*.

Respecto al metabolismo de alcaloides (Figura 53, C), se analizó la expresión de los genes *CS*, que codifica una cafeína sintasa, y *BBE-1*, que codifica una nectarina 5. El gen *CS* muestra un perfil de inducción durante la infección, en mayor medida cuanto más virulento es el hongo sobre el cítrico. Así, y junto con el *CsACS2* (Figura 51, A), es probablemente el que mejor se correlaciona con la virulencia de los hongos. En cambio, *BBE-1* que estaría implicado en la biosíntesis de una clase distinta de alcaloides, se induce con la infección pero con diferencias casi inapreciables entre hongos patógenos y no patógenos.

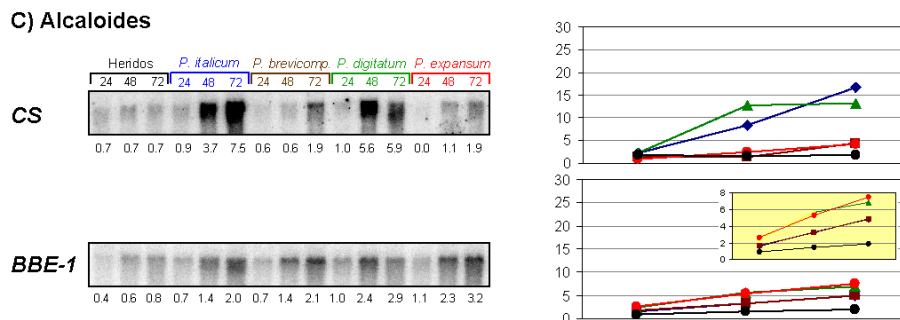
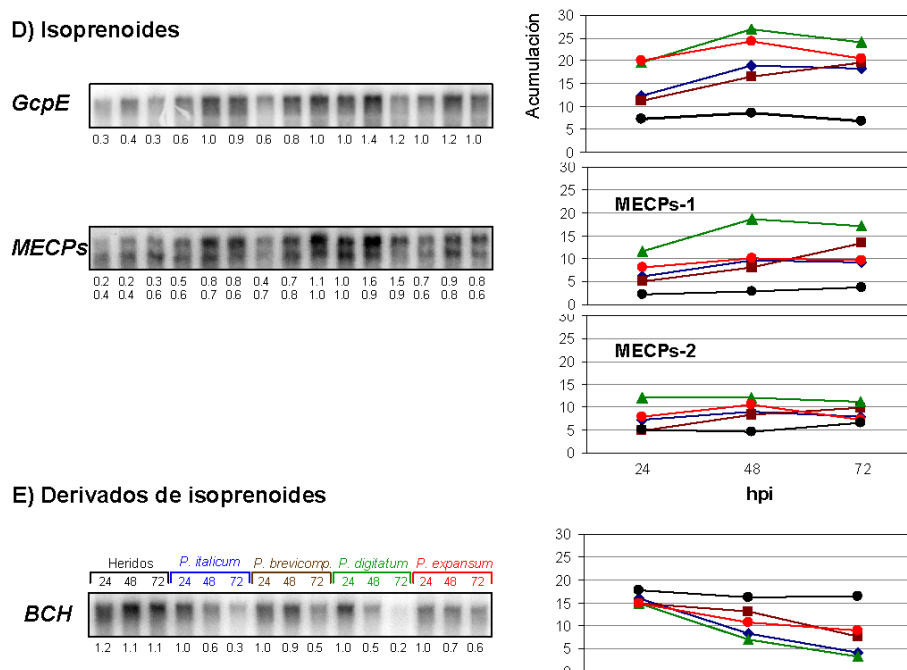


Figura 53. Análisis Northern de genes relacionados con el metabolismo de alcaloides durante la infección por hongos del género *Penicillium* (véase detalles en el pie de la Figura 51). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: cafeína sintasa (*CS*, N12F02), nectarinas 5 (*BBE-1*, N09B03),

En lo referente al metabolismo de isoprenoides (Figura 54, D), el gen *GcpE*, que codifica una proteína de biosíntesis de isoprenoides, mostró una inducción por la infección, que es ligeramente mayor por *P. digitatum* y *P. expansum*, respecto a la producida por *P. italicum* y *P. brevicompactum*. El gen *MECPs*, que codifica una metileritritol-ciclofosfato sintasa, expresó dos transcritos que tienen perfiles de expresión bastante semejantes, aunque uno de ellos (*MECPs* -1) tiene mayor expresión por la herida.



Sobre derivados de isoprenoides (Figura 54, E) se realizó hibridación del gen de la *BCH*, que codifica una β -caroteno hidroxilasa, enzima implicada en la biosíntesis de determinados carotenoides. Este gen sufrió una represión de su expresión como respuesta a la infección por hongos, y ésta fue más rápida cuanto más virulento es el hongo sobre el fruto.

Finalmente, se realizaron hibridaciones con sondas pertenecientes a genes cuya implicación en el metabolismo no es conocida, pero que mostraron una expresión diferencial durante el proceso de infección (Figura 55, F). *DCN* muestra la característica de que, aunque es un gen de respuesta a la infección, tiene mayor expresión por *P. expansum* que por *P. italicum*. *AQP* tiene un patrón de expresión semejante a *BCH*, con mayor represión de la expresión cuanto más virulento es el hongo. Finalmente, *P-21* tiene un patrón de expresión que coincide con la virulencia de los hongos sobre frutos cítricos.

F) Expresión diferencial

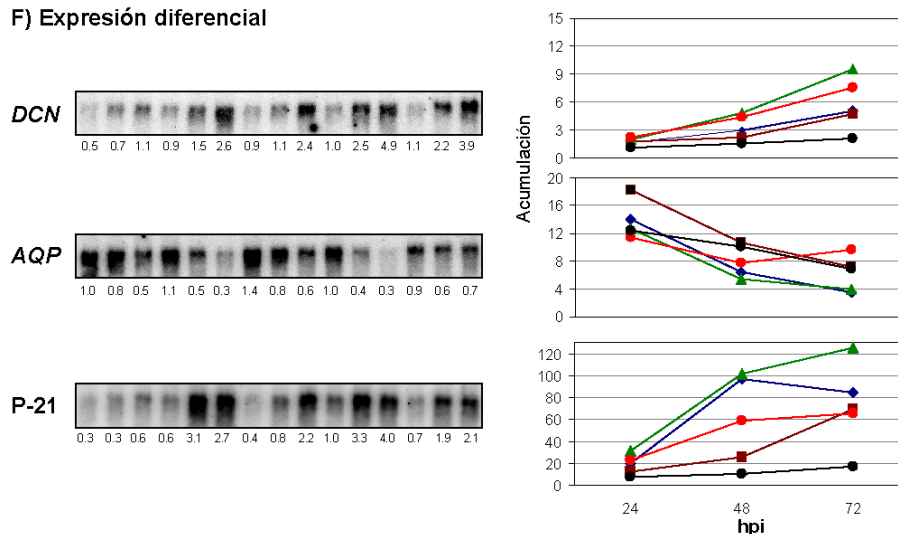


Figura 55. Análisis Northern de genes de localización metabólica desconocida durante la infección por hongos del género *Penicillium* (véase detalles en el pie de la Figura 51). Las sondas utilizadas para la hibridación se sintetizaron a partir de genes con homología con: dicianina (*DCN*, N11B04), acuaporina (*AQP*, N13F07) y P0486B06.7 (*P-21*, N03A05).

DISCUSIÓN

1. Caracterización molecular de la interacción fruto-patógeno.

Los primeros estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en las respuestas de defensa de los cítricos frente a infecciones fúngicas permitieron la identificación de determinados genes con inducción de su expresión durante esta interacción. De este modo, en diferentes variedades de cítricos se confirmó la expresión de determinados genes de defensa, como algunos que codifican proteínas PR (quitinasas y β -1,3-glucanasas) o enzimas relacionadas con el metabolismo de fenilpropanoides (PAL), en respuesta a la infección por *P. digitatum* (McCollum, 2000; Porat *et al.*, 2002).

El empleo de la genómica funcional supone una nueva alternativa para el estudio de los procesos biológicos que ocurren durante la interacción entre la planta y el patógeno durante la infección (Ramonell y Somerville, 2002; Koltai y Volpin, 2003). El desarrollo de nuevas herramientas genómicas, como las micromatrices de cDNA, ha permitido un importante avance en la identificación y el estudio de la expresión de genes de plantas implicados en las respuestas de defensa frente a patógenos (Bulow *et al.*, 2007). Sin embargo, existen pocos trabajos sobre el empleo de técnicas de análisis de expresión génica global en frutos como respuesta a la infección por patógenos. Un ejemplo es el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la interacción entre frutos de manzana y el hongo *P. expansum* mediante la técnica de “differential display” (DD) RT-PCR, que permitió la identificación de genes con expresión diferencial implicados tanto en la patogénesis del hongo, como en la respuesta del fruto a la infección (Sánchez-Torres y González-Candelas, 2003). De este modo se identificaron dos genes de manzana con inducción específica durante la interacción fruto-patógeno: una fosfatasa 2C, implicada en la síntesis de enzimas que actúan como reguladores negativos de rutas como la respuesta a herida mediada por ABA o en la respuesta a estrés mediada por MAP-quinasa, y una β -glucosidasa, que parece estar implicada en la liberación de compuestos tóxicos a partir de precursores glicosilados inactivos (Carrera y Prat, 1998; Meskiene *et al.*, 1998). Por otro lado, la construcción de una biblioteca substractiva de cDNA ha permitido estudiar la expresión diferencial de genes de frutos de fresa durante el proceso de infección por *Colletotrichum acutatum* (Casado-Díaz *et al.*, 2006). Este trabajo sugiere que la infección por dicho hongo provoca en el fruto la represión de genes putativamente

relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas, como las quitinasas, POXs y β -1,3-glucanasas.

A pesar de su gran importancia agronómica, hasta el momento no se ha realizado ningún estudio a gran escala sobre la respuesta de los frutos cítricos a la infección por hongos.

1.1. Infección de frutos cítricos por hongos del género *Penicillium*.

La infección de los frutos cítricos por hongos del género *Penicillium* constituye la principal causa de pérdidas durante la postcosecha de los mismos. La podredumbre verde y la podredumbre azul, provocada por los hongos *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente, son las principales enfermedades postcosecha de frutos cítricos en todo el mundo. Sin embargo, otros hongos del género *Penicillium*, como *P. expansum*, causante de la podredumbre azul en manzanas, o *P. brevicompactum*, no son patógenos de frutos cítricos, bien porque el hongo no posee la capacidad para desarrollarse en el mismo o porque el fruto activa de forma rápida y eficaz los mecanismos de defensa para evitar la infección (Macarasin *et al.*, 2007). A pesar de la importancia de su control, se conoce relativamente poco sobre los determinantes de la susceptibilidad de los frutos cítricos a hongos del género *Penicillium*, como un componente esencial de la respuesta a la infección.

Tras hacer un estudio de la incidencia de la infección causada por los aislados PHI-1 de *P. italicum*, PHI-8 de *P. brevicompactum*, PHI-26 de *P. digitatum* y PHI-65 de *P. expansum* en naranjas 'Navelate', se observó que en los frutos inoculados con *P. digitatum* o *P. italicum* la infección progresó en un 90% y un 70% de las heridas al quinto día después de la inoculación, respectivamente (Figura 49). Por su parte, *P. expansum* y *P. brevicompactum*, descritos como hongos de poca o nula capacidad infectiva sobre frutos cítricos, tuvieron un desarrollo muy bajo o inexistente en las mismas condiciones de inoculación. Estos datos confirmaron la capacidad infectiva y no infectiva de cada una de las especies de *Penicillium* analizadas sobre cítricos.

A partir de este experimento, se realizó un análisis de la expresión de determinados genes, relacionados con la respuesta del fruto cítrico a la

infección, en muestras inoculadas con estos cuatro hongos. Como se analizará a continuación, los resultados de este experimento pusieron de manifiesto la existencia de diferentes patrones de expresión génica en respuesta a la inoculación de hongos patógenos y no patógenos del género *Penicillium* de frutos cítricos. De forma general, los resultados obtenidos apoyan el trabajo de otros autores que sugieren que la virulencia o no virulencia de unos y otros hongos se debe en gran parte a su capacidad de superar las barreras de defensa del fruto (Morrissey y Osbourn, 1999). Además, el comportamiento observado en el caso de determinados genes sugiere una inactivación por parte del patógeno de algunos de los mecanismos de defensa del fruto, tal y como indican otros autores (Macarisin *et al.*, 2007).

Debido a la gran capacidad infectiva que *P. digitatum* tiene sobre frutos cítricos, y con el fin de estudiar las respuestas de los mismos frente a la infección por patógenos, se escogió a *P. digitatum* como modelo central para el estudio de las mismas.

1.2. Variabilidad experimental del patosistema fruto cítrico-*P. digitatum*.

El diseño de un plan experimental previamente al estudio de un sistema biológico es necesario para maximizar la cantidad y calidad de la información que se puede obtener (Allison *et al.*, 2006).

En las hibridaciones de matrices de cDNA pueden llevarse a cabo dos tipos de réplicas: las réplicas técnicas, que suponen la realización de diferentes hibridaciones con una misma muestra de RNA, y las réplicas biológicas, que implican la realización de hibridaciones a partir de diferentes muestras biológicas. El empleo de réplicas introduce la variabilidad en el análisis de los resultados y permite que los datos puedan ser analizados mediante el uso de métodos estadísticos que asignan un nivel de confianza a los resultados finales (Yang y Speed, 2002). Las réplicas técnicas permiten estimar el efecto de la variabilidad intrínseca al método empleado, mientras que las réplicas biológicas permiten, además, tener en cuenta las diferencias experimentales de muestras biológicas teóricamente equivalentes (Allison *et al.*, 2006). Aunque en los primeros análisis de matrices no se realizaban réplicas biológicas, actualmente no se tiene ninguna duda de su importancia (Yang y Speed, 2002). Sin embargo, hay algunos casos en los que las réplicas técnicas tienen

también un papel importante. En aquellos sistemas donde los muestreos son difíciles de obtener, las réplicas técnicas pueden ser tan útiles como las réplicas biológicas. Es difícil determinar cuántas réplicas son necesarias en un determinado experimento para obtener la suficiente validez estadística, sin embargo algunos autores sugieren que tres réplicas pueden ser suficientes (Lee *et al.*, 2000).

En el caso de la hibridación de las macromatrices se realizaron réplicas técnicas, llevándose a cabo tres hibridaciones para cada una de las condiciones de estudio. Sin embargo, en el caso de las hibridaciones con las micromatrices, dada la mayor disponibilidad de las mismas, se realizaron tres réplicas biológicas a partir de frutos de diferentes árboles de un mismo campo, durante dos campañas diferentes, y dos réplicas técnicas de cada una de las réplicas biológicas. Esta característica del análisis con las micromatrices proporciona, por tanto, una gran fuerza estadística a los resultados obtenidos.

El estudio de un sistema biológico mediante la utilización de herramientas genómicas de alto rendimiento, como el análisis de expresión génica haciendo uso de macro- y micromatrices, debe permitir finalmente la selección de genes candidatos para su estudio en profundidad (Koltai y Volpin, 2003). Las técnicas de alto rendimiento no deben ser usadas de forma independiente, sino que deben ser confirmadas mediante el empleo de otro tipo de aproximación que permita el estudio de genes individuales. Por ello, se utilizó la técnica de hibridación Northern a partir de sondas obtenidas de las bibliotecas construidas durante este trabajo. La hibridación Northern ha permitido no sólo la confirmación de la expresión de genes de especial interés, sino también el estudio temporal de su expresión en respuesta tanto a herida como a la infección.

El uso de diferentes réplicas biológicas durante dos campañas diferentes en el análisis con las micromatrices ha permitido reconocer una variabilidad en la expresión de una serie de genes del fruto cítrico por causas inherentes a la propia campaña, pero difíciles de tener en cuenta, como pueden ser las bajas o altas temperaturas, la carencia o exceso de agua, la cantidad de luz recibida o la aplicación de algún tipo de compuesto químico en la planta o sobre el fruto. Como ejemplo se muestra la expresión de un unigen de la micromatriz con homología a una lipoxigenasa (unigen 7117), formado por 6 clones (Figura 56).

El perfil de expresión se ha realizado a partir de los valores medios de las dos réplicas técnicas realizadas para las tres réplicas biológicas en

las cuatro condiciones de estudio: tratamiento con aire (C), tratamiento con ET (E), herida (W) e infección con *P. digitatum* (I). La réplica biológica 1 procede de la campaña 03/04, mientras que las réplicas 2 y 3 fueron tomadas durante la campaña 04/05, con un mes de diferencia entre ambas. Los valores de expresión muestran que, tanto la herida como la infección inducen la expresión del gen en los frutos de la primera campaña más que en los dos muestreos realizados durante la segunda. Además, el tratamiento con ET supone una mayor represión de la expresión del gen en los dos muestreos realizados durante la segunda campaña, mientras que durante la campaña 03/04 no se produce apenas cambio de expresión por el tratamiento con ET respecto al tratamiento con aire. Las lipoxigenasas son enzimas que catalizan la bioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados (Porta y Rocha-Sosa, 2002). Estas enzimas han sido relacionadas con la biosíntesis de JA en respuesta a la herida y a estreses bióticos, aunque también están relacionadas con otros procesos como la maduración de los frutos (Royo *et al.*, 1996; Baysal y Demirdoven, 2007) Por ello, su expresión puede estar relacionada con la respuesta del fruto a la herida o la infección por *P. digitatum*, pero además puede estar influida por otro tipo de factores.

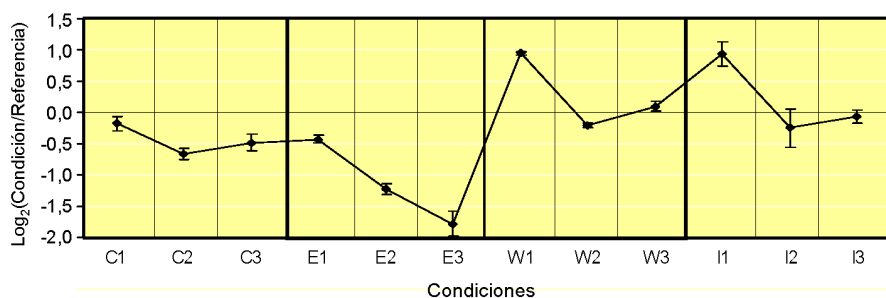


Figura 56. Nivel de expresión del unigen 7117 presente en la micromatriz, con homología a una lipoxigenasa. El unigen está formado por 6 clones diferentes. La image muestra la media y la desviación típica de los valores de expresión de las réplicas técnicas, expresadas como el logaritmo en base dos del cociente entre la expresión en cada condición respecto a la referencia. Se estudiaron 4 condiciones diferentes: tratamiento con aire (C), tratamiento con ET (E), herida (W) e infección con *P. digitatum* (I). En cada condición se realizaron tres réplicas biológicas (1, 2 y 3) y dos réplicas técnicas de cada réplica biológica.

Este mismo efecto se ha observado también en nuestros análisis Northern. La Figura 46 muestra un estudio realizado mediante análisis

Northern de la respuesta de los frutos al pretratamiento con aire, ET o 1-MCP en tres muestreos diferentes. En esta figura se observa cómo la expresión de un mismo gen puede variar en gran medida entre diferentes muestreos. Por ello, para tener en cuenta esta posible variabilidad entre muestras o campañas, a la hora de estudiar la expresión de un gen en unas condiciones determinadas por hibridación Northern se intentó, en la medida de lo posible, realizar varias hibridaciones de la misma sonda con filtros elaborados en diferentes experimentos, e incluso con diferentes variedades de frutos.

2. Aplicación de herramientas genómicas en el estudio de la interacción fruto cítrico-*P. digitatum*.

2.1. Análisis de secuencias.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado tres **bibliotecas de cDNA** con el fin de estudiar los mecanismos implicados en la respuesta de defensa de los frutos cítricos al ataque por *P. digitatum*. Estas bibliotecas están basadas en dos tipos de aproximaciones diferentes; por un lado, en el marco del CFGP (Forment *et al.*, 2005), y como parte de uno de los objetivos del proyecto, se elaboraron dos colecciones de ESTs, que permitieron obtener una visión general de la expresión génica de los frutos cítricos durante el proceso de infección. La colección **RindPdig24** se construyó a partir de RNA de frutos de mandarina 'Clemenules' a las 24 horas después de ser heridos e inoculados con una solución de esporas de *P. digitatum*. El estudio de la anotación funcional y abundancia relativa de un número suficiente de clones que forman parte de esta biblioteca permite obtener una representación de la expresión génica global en un momento determinado de la infección, en el que se sabe que se está produciendo alta expresión de genes del fruto como respuesta al ataque del hongo (Marcos *et al.*, 2005). **PostharvP1** es una colección enriquecida en cDNAs de longitud completa elaborada a partir de muestras de frutos de mandarina 'Clemenules' solamente heridos, por un lado, y de frutos heridos e inoculados con una solución de *P. digitatum*, por otro. En ambos casos, se utilizaron muestras de tejido a las 8, 16 y 24 horas después de la herida o

la inoculación. Esta biblioteca estará, por ello, enriquecida en mayor cantidad de genes, conteniendo la secuencia completa o, al menos, el extremo 5' del gen, procedentes del fruto durante diferentes momentos del proceso infectivo, y, además, de genes con expresión debida específicamente al estrés causado por la herida en el fruto durante los mismos tiempos. Su estudio, por tanto, podrá aportar información complementaria sobre los mecanismos moleculares de la respuesta del fruto en respuesta a herida e infección. Finalmente, la colección **RindPdigS** fue construida, anteriormente a la realización de esta tesis, en el Laboratorio de Postcosecha del IATA. Esta biblioteca se obtuvo mediante la técnica de SSH y está enriquecida en fragmentos de cDNA procedentes de genes que se expresan más abundantemente en la corteza de naranjas 'Navelina' a las 24 h después de la inoculación por *P. digitatum* con respecto a un control de respuesta a herida (Gonzalez-Candelas *et al.*, 2005). El estudio de los clones que forman parte de esta biblioteca aporta información sobre los mecanismos moleculares específicos del fruto cítrico como respuesta a la infección por *P. digitatum*. Además, durante su síntesis se realizó un proceso de normalización con el fin de igualar la abundancia de clones correspondientes a genes de baja y alta expresión, de modo que su estudio permite detectar genes con un bajo nivel de expresión, que son difíciles de detectar en una biblioteca de cDNA convencional (Diatchenko *et al.*, 1996).

Las ESTs pertenecientes a estas tres bibliotecas de cDNA de respuesta de los frutos cítricos a la infección, RindPdig24, PostharvP1 y RindPdigS, han sido incorporadas a la base de datos del CFGP, junto al resto de colecciones que forman parte del proyecto. Dentro del CFGP existen actualmente 53 bibliotecas procedentes de diferentes tejidos, como tallos, hojas, raíces o frutos, y diferentes estadios fisiológicos, de respuesta a estreses bióticos y abióticos, y de procesos postcosecha de los frutos cítricos. La base de datos del CFGP contiene en la actualidad 27.551 unigenes. Al analizarse de forma conjunta las secuencias de las tres bibliotecas estudiadas en esta tesis con respecto al resto de colecciones del CFGP, se observó que el 26% de sus unigenes no estaban presentes en ninguna otra biblioteca de cDNA del CFGP, en el que hay 15 bibliotecas de cDNA provenientes de frutos (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>). Este hecho muestra, por un lado, la importancia de trabajar con bibliotecas de cDNA específicas a partir de los tejidos sometidos a los procesos de estudio en lugar de utilizar colecciones de ESTs de expresión general del fruto para estudiar

condiciones específicas de estrés. Por otro lado, también sugiere que la infección por *P. digitatum* induce en el fruto una expresión específica de genes relacionados con la respuesta de defensa frente a este organismo.

En aquellas bibliotecas de cDNA en las que no se realiza ningún proceso de sustracción o de normalización, como es el caso de RindPdig24 y PostharvP1, la abundancia de un determinado cDNA es proporcional al nivel de expresión relativa de su correspondiente gen y, además, es indicativo de los procesos biológicos que se han activado en los tejidos de procedencia. Por lo tanto, los unigenes con mayor número de ESTs se corresponden con genes de alta expresión durante el proceso de infección, que a su vez, podrían estar implicados en procesos biológicos inducidos en el fruto (Tabla 8). En una biblioteca sustractiva, como RindPdigS, los unigenes que contienen mayor número de ESTs corresponden, en cambio, a genes que tienen diferencias significativas en los niveles de expresión entre el tejido de estudio y el tejido control (Tabla 5). En el caso de RindPdigS, por tanto, los unigenes más abundantes corresponden a genes con expresión diferencial durante la infección, ya que el tejido de estudio y el tejido control provienen de frutos heridos e infectados con *P. digitatum* y frutos solamente heridos, respectivamente. Entre los genes más abundantes en RindPdigS, encontramos un unigen con una pauta de lectura con homología a una proteína de unión a FAD (P-03), presuntamente implicada en el metabolismo de alcaloides (Facchini, 2001), un unigen con homología a DAHP sintasa (P-01), que forma parte de la ruta del siquimato, precursora de aminoácidos aromáticos (Herrmann y Weaver, 1999), y dos unigenes con homología a ACC oxidasa (P-07 y P-08), que codifica el último enzima en la ruta de biosíntesis de ET (Broekaert *et al.*, 2006) (Tabla 5). Estos resultados obtenidos a partir del uso de una biblioteca sustractiva, sugieren (i) la importancia del metabolismo secundario en la respuesta específica a la infección, y (ii) la importancia del ET como hormona señalizadora de las respuestas de los frutos durante el proceso de infección.

Comparando los resultados de las diferentes bibliotecas se identifican genes con alta representación en todas ellas, como es el caso de las metalotioneínas (Tabla 8). Estas proteínas de bajo peso molecular son muy abundantes tanto en el reino animal como vegetal (Kagi y Schaffer, 1988). Su presencia en cítricos ya ha sido descrita, habiéndose demostrado su inducción por ET, infección, herida, senescencia y frío (Moriguchi *et al.*, 1998). Aunque se desconoce la función precisa de estas

proteínas, su patrón de expresión las relaciona con la interacción entre planta y patógeno (Choi *et al.*, 1996), senescencia (Buchanan-Wollaston, 1994) y desarrollo (Hamer, 1986). Debido a la capacidad de estas proteínas para unirse a metales pesados, se cree que deben tener una función importante en detoxificación al secuestrar las ROS producidas durante el estrés oxidativo (Mir *et al.*, 2004).

Es de destacar la presencia de unigenes muy representados en alguna de las bibliotecas pero poco presentes, o incluso ausentes, en las restantes. Este hecho parece indicar la existencia de diferencias en los patrones de expresión de las correspondientes muestras. El caso más destacado es el del unigen más abundante de la biblioteca PostharvP1, con 13 representantes, que presenta homología a un factor de elongación 1-alfa, relacionado con la biosíntesis de proteínas, y que no aparece en ninguna de las otras dos bibliotecas (Tabla 8). Este resultado sugiere que el gen que codifica el factor de elongación 1-alfa sea de expresión transitoria temprana, y que su expresión no llegara a las 24 horas después de la infección, ya que PostHarvP1 es la única biblioteca de cDNA con muestras tomadas antes de ese tiempo. Otra posibilidad es que este gen posea una alta expresión en respuesta a la herida y que dicha expresión debe ser reprimida durante la infección, pues no aparece en ninguna de las colecciones que contienen únicamente RNA procedente de tejido de frutos infectados. La probabilidad de que este gen aparezca con tanta abundancia en una biblioteca formada por más de mil clones y no en las demás es tan baja que se puede descartar el hecho de que este resultado sea un efecto casual debido a la selección de los clones al azar.

Por último, la presencia de varios unigenes sin homología en bases de datos entre los más abundantes de cada biblioteca es otro hecho a destacar. El análisis conjunto de las colecciones RindPdig24 y PostharvP1 mostró la presencia de tres unigenes con 4 o más ESTs correspondientes a genes sin homología en bases de datos (Tabla 8). Por otro lado, RindPdigS también presentó tres unigenes formados por 4 o más ESTs, correspondientes a genes sin homología (Tabla 5). Dos de ellos, P-02 y P-05, se indujeron diferencialmente por la infección frente al resto de condiciones, sin embargo, el unigen P-53, formado por 4 ESTs, se indujo más por ET y aire que por infección y herida. Además, los clones N14G12 y N17C02, sin homología en bases de datos, mostraron una expresión específica durante la infección (). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos implicados en la respuesta de defensa de frutos cítricos

durante el proceso de infección que son desconocidos hasta el momento y que, a juzgar por el nivel de expresión de los genes, deben estar desempeñando un papel importante durante el mismo. No se debe descartar la posibilidad de que alguno de estos genes provengan de *P. digitatum*, pues como se ha comentado, P-02 y P-05 tienen una expresión diferencial durante la infección.

El análisis comparativo de ontologías génicas (GO) en la categoría de “proceso biológico”, para las tres colecciones de infección en comparación con el conjunto de colecciones del CFGP, no mostró grandes diferencias en las diferentes categorías entre las colecciones, salvo en los casos de “biosíntesis”, “respuesta a estímulos” y “metabolismo de aminoácidos y derivados” que son más abundantes en las tres bibliotecas de cDNA provenientes de frutos infectados (Tabla 9). Estos resultados son esperables si tenemos en cuenta que las tres bibliotecas de cDNA provienen de tejidos en donde asumimos (según los resultados presentados) que se está produciendo un redireccionamiento del metabolismo del fruto como respuesta a estrés tanto abiótico, debido a la herida, como biótico por causa de la infección por *P. digitatum*, y en los que se está induciendo la síntesis de ciertos compuestos relacionados con defensa mediante la desviación del metabolismo general de la planta hacia rutas del metabolismo secundario. Además, se observa una sobrerrepresentación en la colección RindPdigS de genes relacionados con “muerte celular”. Al analizar más detalladamente este resultado encontramos un gen con homología a hidroxigeraniol oxidoreductasa (Unigen 7075), relacionado con el metabolismo de alcaloides (véase apartado discusión 3.4) y que además es uno de los unigenes con mayor expresión en infección por *P. digitatum* respecto a aire, según los resultados de hibridación con micromatrices (Tabla 19), y un gen con homología a una proteína de transporte (“importin-alpha re-exporter”) (Unigen C18016G07) relacionado con procesos de apoptosis celular. La activación de la muerte celular como respuesta a la infección está descrito como un mecanismo de defensa frente a la infección por microorganismos biótrofos al impedir el desarrollo del patógeno (Torres *et al.*, 2006), pero no es adecuado en la respuesta a microorganismos necrótrofos ya que la degradación celular abastece al patógeno de nutrientes que permiten su desarrollo. Algunos autores sugieren que estos procesos pueden estar inducidos por el propio microorganismo necrótrofo para, de este modo, aumentar su patogenicidad (Govrin y Levine, 2000).

2.2. Hibridaciones de matrices.

Las matrices de cDNA constituyen una herramienta de alto rendimiento que permite el estudio de los cambios de expresión de cientos o incluso miles de genes en un único experimento de hibridación, por ello ya han sido utilizadas para el estudio de la expresión génica de frutos en otras especies de plantas (Alba *et al.*, 2004).

Previamente a la realización de este trabajo se construyó una **macromatriz**, formada por 1.436 ESTs individuales, a partir de la biblioteca de cDNA RindPdigS (véase materiales y métodos, 7). Por otra parte, como parte de uno de los objetivos del CFGP, se construyó una primera **micromatriz**, denominada 7K, que contiene un total de 12.671 ESTs agrupadas en al menos 6.333 unigenes, aportados por los diferentes grupos que forman parte del consorcio (véase materiales y métodos, 8) (Forment *et al.*, 2005).

Ambas matrices fueron hibridadas con muestras obtenidas a partir de tejidos de frutos cítricos sometidos a las cuatro condiciones de estudio: tratamiento con aire, ET, herida, e inoculación con *P. digitatum*. La macromatriz fue hibridada con RNA procedente de naranjas 'Navelate', mientras que la micromatriz se hibridó con muestras de mandarinas 'Clemenules'. Los resultados de las hibridaciones han permitido estudiar el perfil de expresión de cada uno de los genes en las diferentes condiciones (véase material adicional).

El análisis de los resultados de hibridación mediante la elaboración de diagramas de Venn ha permitido detectar diferentes perfiles de expresión de genes de frutos cítricos en respuesta a la infección, herida y tratamiento con ET. De los clones presentes en la macromatriz se observó que el 25% de ellos tenían inducción de la expresión durante el proceso de infección respecto al tratamiento con aire (Figura 23). Además, 24 clones poseían expresión solamente por causa de la infección, lo que sugiere una expresión específica durante este proceso. De ellos, 14 clones han sido secuenciados, destacando la presencia de 4 clones que forman parte del unigen P-62, y que presentan homología con cafeína sintasa (CS). La enzima codificada por este gen está implicada en la síntesis de alcaloides derivados de purinas lo que sugiere la implicación de estos compuestos de

forma específica durante la respuesta de los frutos a la infección por patógenos (véase apartado discusión 3.4).

Por otro lado, el análisis de los resultados de hibridación de las micromatrices aporta una visión global de la expresión de los genes del fruto en respuesta a la infección. El análisis de las secuencias que forman parte de la micromatriz permitió reconocer la presencia de diferentes clones con homología a un mismo gen. Gracias a la aplicación de las herramientas informáticas se agruparon en un único unigen aquellos clones de la micromatriz cuyas secuencias son realmente parte de un mismo gen. De este modo, cada clon perteneciente a un agrupamiento fue considerado como una réplica de un mismo unigen. Debido a que las micromatrices contienen una cantidad mucho mayor de clones, y que la proporción de los mismos que han sido secuenciados es mucho más elevada que en el caso de los clones presentes en la macromatriz, el análisis de los perfiles de expresión mediante la realización de diagramas de Venn se realizó mediante el estudio de unigenes y no de clones, como en el caso de las macromatrices, por lo que el análisis de los resultados de las hibridaciones de las micromatrices aportan una información que refleja mejor la realidad biológica del patosistema. Estos resultados muestran diferentes perfiles de expresión de los unigenes con respuesta diferencial durante la infección.

Así pues, durante este trabajo se han utilizado dos aproximaciones metodológicas diferenciadas: hibridación de una macromatriz que contiene una colección sustraída de ESTs y de una micromatriz con una representación global de genes de cítricos. Aun asumiendo que las poblaciones de cDNAs impresos en ambas no son equiparables por los motivos anteriormente expuestos, se pueden comparar los resultados obtenidos con ambas aproximaciones. Un modo de hacerlo es mediante el estudio de la expresión de los unigenes con mayor diferencia de expresión entre la condición de infección (I) respecto a la de aire (A) (Tabla 19).

Tabla 19. Unigenes con mayor expresión en infección por *P. digitatum* (I) respecto a aire (A), según los resultados de hibridación con macromatrices y micromatrices.

Macromatrices			
Categoría funcional	Unigen	Log₂(I/A)	N°ESTs
Sin homología.	P-61	3,8	2
Proteína de apoptosis celular [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	N13E10	3,7	1
Citocromo P450 79A1 [<i>Sorghum bicolor</i>]	P-43	3,6	2
Acetiltransferasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	N17B07	3,4	1
Nectarina 5 [<i>Nicotiana langsdorffii</i>]	P-27	3,2	3
Sin secuenciar	N11G07	3,1	1
Proteína con dominio de unión a FAD [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	P-03	3,1	9
Nectarina 5 [<i>Nicotiana langsdorffii</i>]	N14G04	3,1	1
Fenilalanina amonio liasa [<i>Citrus clementina</i>]	N06E02	3,0	1
Sin secuenciar	N12B08	3,0	1
Sin secuenciar	N16F03	2,9	1
Sin secuenciar	N12G05	2,8	1
Poligalacturonasa [<i>Penicillium digitatum</i>]	N06E04	2,7	1
Proteína relacionada con deshidratación [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	N07E06	2,7	1
Dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	P-46	2,7	4
Sin secuenciar	N03D03	2,7	1
Proteína expresada [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	N07B09	2,7	1
Receptor de glutamato [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	N07C10	2,6	1
Sin secuenciar	N11F04	2,6	1
Sin secuenciar	N11F02	2,6	1

Micromatrices			
Categoría funcional	Unigen	Log₂(I/A)	N°ESTs
Sin homología.	C04002B12	4,6	1
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	C03003D11	3,7	1
Sin homología.	C05039C02	3,6	1
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	C04011E02	3,6	1
Sin homología.	C18004E04	3,6	1

Discusión

Citocromo P450 79A2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	C08011E05	3,5	1
Proteína de unión a cobre [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	C04006G10	3,3	1
Ciclofilina [<i>Ricinus communis</i>]	6693	3,3	3
Sin homología.	C04016G06	3,2	1
Dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	7056	3,1	2
Sin homología.	C02013H11	3,1	1
10-hidroxigeraniol oxidoreductasa [<i>Camptotheca acuminata</i>]	7075	3,1	2
1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa [<i>Citrus sinensis</i>]	4356	3,1	2
Dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C04017A03	2,9	1
Sin homología.	C04016B10	2,9	1
Fenilalanina amonio liasa [<i>Citrus clementina</i>]	6764	2,8	2
Catecol O-metiltransferasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	C02008G03	2,8	1
1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa [<i>Citrus sinensis</i>]	7230	2,7	10
S-adenosilmetionina sintetasa [<i>Litchi chinensis</i>]	C02019B06	2,7	1
Citocromo P450 79A2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	C02021C08	2,6	1

Este análisis muestra correspondencias evidentes. Los unigenes P-27, P-03 y el clon N14G04 de la macromatriz tienen alineamientos adyacentes, separados por secuencias de restricción RsaI, con homología a *nectarina 5* de *Nicotiana langsdorffii* (Figura 57), y son muy similares a los unigenes C03003D11 y C04011E02 presentes en la micromatriz, que son homólogos a *CPRD2*, otra oxidoreductasa con dominio de unión a FAD, como la *nectarina 5*. El unigen N06E02 de la macromatriz y el unigen 6764 de las micromatrices, con homología a *PAL*, forman actualmente parte de dos unigenes distintos en la base de datos del CFGP, presentando una identidad del 87%. El unigen de las macromatrices P-43, con homología a *citocromo P450 79A1*, y el C02021C08 de las micromatrices, con homología a *citocromo P450 79A2* presentan una identidad del 57%, aunque mantienen una región de aproximadamente 300 pb muy conservada. Por último, los unigenes P-46, de la macromatriz, y 7056, de la micromatriz, ambos con homología a *dicianina*, forman parte de un mismo unigen en la base de datos del CFGP.

Al comparar los resultados de expresión de estos unigenes se observa, por ejemplo, que el unigen N06E02 de la macromatriz y el unigen 6764 de la micromatriz, con homología a *PAL* tienen unas *ratios* de expresión, expresadas como Logaritmo en base 2, entre infección y control

de 3,0 y 2,8, respectivamente (Tabla 19). Los unigenes P-46, de la macromatriz, y 7056 de la micromatriz con homología a *dicianina* y que forman parte de un mismo unigen tienen unas ratios de 2,7 y 2,9. Estos resultados, aunque se refieran a casos puntuales, muestran la uniformidad entre las determinaciones de los niveles de expresión obtenidos en las macro- y micromatrices.

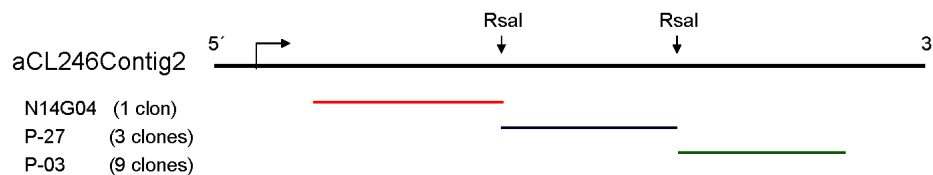


Figura 57. Esquema del alineamiento de los unigenes N14G04, P-27 y P-03, pertenecientes a la biblioteca de cDNA RindPdigS, con el unigen aCL246Contig2 de la base de datos del CFGP, con homología a Nectarina 5. Estos tres unigenes tienen alineamientos adyacentes, separados por secuencias de restricción Rsal.

En cualquier caso, el uso de dos aproximaciones diferentes nos ha permitido la obtención de información complementaria para el conocimiento de un mismo sistema. La correcta interpretación de estos resultados puede ayudar a reconocer los procesos biológicos que tienen lugar en el fruto cítrico en respuesta a la infección por el hongo patógeno *P. digitatum*.

2.3. Anotación funcional global de la respuesta del fruto cítrico a la infección por *P. digitatum*.

Además del estudio individual de genes, de sus niveles de expresión y de su abundancia, el empleo de otras herramientas de genómica funcional, como el análisis de anotación funcional, permiten determinar los procesos biológicos sobrerrepresentados en un sistema biológico a partir de la presencia de los genes relacionados con los mismos.

Mediante el empleo del paquete informático FatiGO+ (Babelomics, <http://gepas.bioinfo.cipf.es>) se realizó un análisis de anotación funcional

por ontologías génicas (GO) para determinar los procesos biológicos sobrerrepresentados en los frutos cítricos durante la infección por *P. digitatum*. Para poder hacernos una idea de los cambios globales de expresión génica en una condición determinada y obtener resultados significativos, este tipo de análisis debe realizarse sobre grandes colecciones de genes con representación homogénea del genoma de un organismo. Por este motivo los estudios de anotación funcional se realizaron únicamente a partir de los resultados obtenidos de la hibridación de las micromatrices, ya que incorporan cerca de 7.000 genes de cítricos cuyo aislamiento no ha estado sesgado como en el caso de la biblioteca sustractiva de las macromatrices.

A pesar de las limitaciones del análisis por ontologías génicas (GO) como consecuencia de tener que trabajar únicamente con aquellos genes de cítricos con homólogo en *A. thaliana*, el estudio de las anotaciones funcionales es útil para tener una visión general de los procesos que se inducen o reprimen como respuesta a la infección por *P. digitatum*. Además, los resultados fueron apoyados mediante el uso de la herramienta "OMICS Viewer", incluida en el paquete informático "AraCyc 4.0". Este programa nos permitió realizar una representación gráfica de las rutas metabólicas de *A. thaliana*, teniendo en cuenta los cambios de expresión de todos los genes significativos, incluyendo además, el nivel de expresión de los mismos (Figura 35, , Figura 37, y Figura 39).

El análisis GO al comparar la condición de infección respecto a herida mostró que entre los procesos biológicos no redundantes, inducidos significativamente en respuesta a la infección, se encuentran sobrerrepresentados los "procesos de biosíntesis de la familia de aminoácidos aromáticos, ruta del siquimato" ($p = 0,0318$), "procesos biosintéticos de aminoácidos azufrados" ($p = 0,0105$), y "procesos de biosíntesis de isopentenil bifosfato (IPP), ruta independiente del mevalonato" ($p = 0,0318$) (Tabla 14). Estos resultados se ven apoyados por los análisis realizados con el programa "AraCyc 4.0", en los que se muestran representados la síntesis de aminoácidos aromáticos, el metabolismo de fenilpropanoides, la biosíntesis de isoprenoides y el metabolismo de la metionina y ciclo de SAM, que revelan la inducción de los genes que forman parte de estas rutas en respuesta a la infección (Figura 35, Figura 37, y Figura 39). Entre los genes que forman parte de estos procesos biológicos se encuentran algunos relacionados con la síntesis de aminoácidos precursores del metabolismo secundario, como

EPSPs y *DAHP*, que codifican 3-fosfosiquimato-1-carboxibiniltransferasa y 3-desoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato sintasa, respectivamente; cuya expresión diferencial fue posteriormente confirmada mediante hibridación Northern (Figura 41). Lo mismo ocurre con varios genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides, como *PAL* y *COMT* (Figura 42). Este conjunto de resultados sugiere la implicación del **metabolismo secundario** en la respuesta de defensa a la infección (véase Discusión, apartado 3).

Por otro lado, durante la infección están sobrerrepresentados los “procesos metabólicos de S-adenosilmetionina” ($p = 0,0083$) y los “procesos biosintéticos de hormonas” ($p = 0,0445$) (Tabla 14). El análisis realizado con “AraCyc 4.0” apoya los resultados, ya que muestra inducidas la ruta de síntesis de ET a partir de metionina, el ciclo de la metionina y el ciclo de SAM, y la ruta de síntesis de JA, donde se observa que en respuesta a la infección hay inducción de los genes de estas rutas presentes en la micromatriz (Figura 35 y). Estos resultados sugieren que tanto el **ET** como el **JA** tienen un papel importante en la respuesta de los frutos cítricos a la infección por *P. digitatum* (véase Discusión, apartado 4).

Inmediatamente después del reconocimiento de cualquier patógeno, las primeras reacciones detectables en las plantas son la formación de **ROS**, las cuales, además de ser tóxicas frente al patógeno, pueden favorecer el refuerzo de la pared celular haciéndola más resistente a la penetración y degradación enzimática por parte del patógeno o actuar como moléculas de transducción de señal, contribuyendo a la puesta en marcha de la compleja red de señalización que desencadenará todas las respuestas de defensa de la planta (Levine *et al.*, 1994; Lamb y Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2006). El análisis GO entre la condición de infección respecto a herida, mostró una sobrerrepresentación de genes relacionados con “respuesta al estrés oxidativo” ($p = 0,0107$) (Tabla 14). Hay que tener en cuenta que este resultado corresponde a un nivel GO 5, que es un nivel bajo y, por lo tanto, bastante general. Este resultado no solamente incluye genes directamente relacionados con el estrés oxidativo, como aquellos implicados en la síntesis de varias peroxidasas y descarboxilasas, sino también genes del metabolismo relacionados más indirectamente, como dos genes relacionados con la síntesis de una gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y una fenilalanina amonio-liasa.

Diversos estudios realizados por nuestro grupo han relacionado el estrés oxidativo con la respuesta de defensa de los frutos cítricos frente a diferentes estreses bióticos y abióticos (Sala y Lafuente, 2004; Ballester *et al.*, 2006). En los estudios realizados por Ballester *et al.* (2006) se observó un aumento de la actividad POX insoluble en la zona de maceración del flavedo infectado por *P. digitatum*, lo que sugiere que esta enzima podría contribuir a aumentar la resistencia del tejido externo frente al ataque por patógenos.

La alta producción de ROS durante la infección de patógenos puede inducir la muerte de las células del huésped cercanas al desarrollo de la infección (Torres *et al.*, 2006). En el caso de la infección por microorganismos bio- y hemibiótrofos esta muerte localizada ayuda a confinar al patógeno, evitando su proliferación por el resto de la planta. Sin embargo, cuando la infección está causada por organismos necrótrofos, la muerte celular puede facilitar una mejor progresión del patógeno por el huésped al aprovecharse de los compuestos de degradación celular producidos (Govrin y Levine, 2000). El estudio de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo presentes en la micromatriz (Tabla 17), muestra que entre los genes relacionados con el metabolismo de ROS reprimidos por la infección se encuentran varios genes *CAT* y *SOD*, cuyas enzimas están implicadas en la eliminación de ROS. Estos cambios de expresión génica podrían estar relacionados con una acumulación de H₂O₂, lo que induciría la muerte celular, favoreciendo el desarrollo del hongo necrótrofo. Esta aparente contradicción podría ser debida a una alteración de la expresión génica de la planta mediada por el patógeno para favorecer el desarrollo de la infección. Sin embargo, este resultado contradice trabajos recientes que sugieren lo contrario. Estudios realizados acerca de los mecanismos de patogenicidad de *P. digitatum* sobre frutos cítricos muestran como *P. digitatum* suprime la producción de H₂O₂ en frutos cítricos, inhibiendo la respuesta mediada por ROS en el fruto (Macarisin *et al.*, 2007). La Tabla 17 muestra también la inducción de varias glutathion S-transferasas, glutathion peroxidasas y ascorbato peroxidasas durante el proceso de infección. Estas moléculas pueden estar implicadas en la inducción de medidas que contrarresten el estrés oxidativo generado por las ROS. Este mecanismo está descrito en plantas, observándose que su activación se produce para evitar los daños celulares (Mittler *et al.*, 2004), lo que apoya los resultados anteriores, contradiciendo lo descrito por Macarisin *et al.*, (2007). Los mecanismos de las plantas que controlan el nivel de las ROS son complejos. En *A. thaliana* se han descrito

al menos 152 genes implicados en el control de las ROS (Mittler *et al.*, 2004). Esta red de genes relacionados con el metabolismo de las ROS supone una constante regulación para controlar la defensa frente a patógenos y el daño celular.

La única anotación funcional que sufre represión durante el proceso de infección respecto a herida es la “respuesta a estrés” ($p = 0,0194$) (Tabla 14). Fijándonos en las anotaciones funcionales de infección y herida frente a aire, se observa que ambos procesos tienen una sobrerrepresentación de genes que se reprimen relacionados con la “**respuesta a estímulos abióticos**”. Algunos autores sugieren que las respuestas a estrés biótico y abiótico comparten varios componentes de señalización comunes que relacionarían ambos tipos de respuestas (Chini *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores han sugerido la idea de que las plantas han desarrollado estrategias para evitar la producción simultánea de proteínas implicadas en las respuestas al estrés abiótico y al ataque por patógenos (Anderson *et al.*, 2004). La regulación de la expresión génica durante la infección parece estar implicada no sólo en la inducción de diferentes mecanismos de defensa, sino también en la represión de las actividades celulares no necesarias y la movilización de los recursos necesarios para hacer frente, lo más eficientemente posible, al problema que se enfrenta (Logemann *et al.*, 1995).

Durante el ataque por patógenos, en las plantas se produce una acumulación de **proteínas relacionadas con la patogénesis** (proteínas PR: “pathogenesis-related proteins”) (Van Loon *et al.*, 2006b). Éstas son proteínas intra y extracelulares, producidas por la planta, e inducidas por diversos estreses, que juegan un papel importante en la respuesta de defensa de las mismas. Algunas de estas proteínas poseen actividad antimicrobiana frente a hongos y bacterias *in vitro*, aunque su expresión en plantas transgénicas reduce únicamente un limitado número de enfermedades, dependiendo de la naturaleza de la proteína, la especie de planta y el patógeno implicado (Van Loon *et al.*, 2006b). La expresión de los genes que codifican estas proteínas está regulada por una compleja red de moléculas de señalización que además del ET, incluye SA, JA y ABA (Adie *et al.*, 2007b). Un ejemplo de la interrelación entre diversas hormonas en la regulación de genes que codifican proteínas PR es la inducción por SA de varios genes PR que son reprimidos por la expresión del gen *MPK4*, implicado en la inducción de genes mediados por JA (Lorenzo y Solano, 2005). *MPK4*, que codifica una MAP quinasa 4, fue el

primer gen identificado como regulador de la interacción entre JA y SA. El mutante *mpk4* exhibe una SAR constitutiva, lo que implica, como se ha visto en otros mutantes relacionados con la acumulación de SA, una mayor resistencia a la infección por determinados patógenos (Petersen *et al.*, 2000).

Existen pocos trabajos acerca de la implicación de genes que codifican proteínas PR en cítricos. La generación de naranjos transgénicos capaces de producir osmotina (PR-5), gracias a la inserción de un gen procedente de tomate, los ha hecho resistentes frente a *P. citrophthora* (Fagoaga *et al.*, 2001). En frutos cítricos se ha detectado la expresión de genes que codifican miraculinas tras la inoculación fúngica o el tratamiento con MeJA pero que se ve reprimida por el tratamiento con SA (Tsukuda *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en la hibridación de la micromatriz muestran la inducción de 6 genes que codifican miraculinas durante la infección, lo que confirma su importancia durante este proceso (véase material adicional).

Se ha descrito que la aplicación de diversos tratamientos que inducen resistencia frente a patógenos en frutos cítricos, provoca el aumento de la expresión de quitinasas. Por ejemplo, la aplicación de luz UV, ET, herida, BABA o el agente de biocontrol *C. oleophilla*, induce en pomelos la expresión de *chi1*, que codifica una quitinasa, (Porat *et al.*, 2001). Este gen presenta una homología del 98% con los unigenes 635, 3183 y 6931 presentes en la micromatriz 7K. Si se estudia el patrón de expresión de estos unigenes, se observa que ninguno de ellos se induce por la infección. Esta aparente contradicción con lo descrito previamente puede deberse a que nuestro estudio de micromatrices solamente refleja la expresión en un momento puntual del desarrollo de la infección, por lo que para confirmar su implicación, se debería hacer un estudio temporal de su expresión durante el proceso de infección. Sin embargo, otros genes que codifican diferentes tipos de quitinasas sí se inducen a las 24 hpi, como es el caso de los unigenes C18009A05, 6912, 6989 y 5509.

Se ha descrito la implicación de varios genes de frutos cítricos que codifican β -1,3-glucanasas en respuesta a varios tratamientos, entre ellos la infección por *P. digitatum* (Porat *et al.*, 2002; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006). Los genes *gns1* y *CrglcQ* aislados por estos autores no están incluidos en las micromatriz analizada, sin embargo, de las 8 β -1,3-glucanasas presentes en la micromatriz, 4 de ellas se inducen durante la

infección, lo que apoya la implicación de las glucanasas durante la respuesta a la infección.

Los resultados de hibridación de las micromatrices, mostraron cambios de expresión de genes que codifican diferentes proteínas PR como respuesta a la infección (Tabla 18). Este análisis reveló que, de los 80 unigenes de la micromatriz que codifican proteínas PR, 21 están inducidos en los frutos infectados respecto a los frutos control, pero además hay 14 que se reprimen por la infección. De entre los reprimidos, es de resaltar que 9 codifican proteínas de transferencia de lípidos (LTP) - PR 14-, las cuales, sin embargo, han sido descritas por otros autores como mediadoras de la respuesta temprana de las plantas frente a patógenos, interviniendo en el reconocimiento del patógeno por parte de la planta (Blein *et al.*, 2002). Estudios sobre la infección de *A. thaliana* por patógenos necrotizantes han sugerido la implicación de una LTP apoplástica en la respuesta de señalización de defensa a larga distancia mediada por SA, a través de la unión a otra molécula de naturaleza lipídica (Maldonado *et al.*, 2002). Algunos autores han sugerido que el patógeno puede inducir la represión de genes implicados en defensa. Estudios realizados mediante el empleo de bibliotecas sustractivas de cDNA muestran que el patógeno *Colletotricum acutatum* durante la infección de fresas es capaz de reprimir la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa de las plantas, como quitinasas, POXs y β -1,3-glucanasas (Casado-Díaz *et al.*, 2006).

Por otro lado, la causa de que exista diferencia en la expresión de los diferentes genes que codifican proteínas PR puede deberse a que no todas ellas estén relacionadas con la respuesta a patógenos. Está descrito que la senescencia o algunos estreses abióticos, como la herida o el estrés por frío, pueden también inducir la síntesis de algunas proteínas PR (Broekaert *et al.*, 2000; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006). Muchas proteínas relacionadas con defensa se producen de forma constitutiva en tejidos florales, y un número sustancial de proteínas PR están presentes en el polen. Este hecho sugiere que estas proteínas pueden estar desempeñando diferentes funciones en las plantas a parte de la respuesta frente a patógenos. Es posible que la micromatriz contenga genes implicados en la síntesis de proteínas PR que no estén relacionados con defensa, ya que, como se ha mencionado, la micromatriz contiene genes provenientes de varias bibliotecas generadas a partir de diferentes tejidos, en diversas situaciones de desarrollo y respuesta a estreses bióticos y

abióticos (Forment *et al.*, 2005). De hecho, si estudiamos los genes PR presentes en la micromatriz con anotación GO se observa que están implicados en procesos biológicos muy diversos, como “metabolismo de carbohidratos”, “transporte de lípidos”, “rutas de señalización mediadas por ET”, “respuesta a patógenos”, “respuesta a herida”, o “respuesta a estímulos relacionados con ácido abscísico”.

Las rutas de transducción de señal mediadas por SA, JA y ET tienen como destino el núcleo y los cambios en la expresión génica a través de la actuación de diversos **factores de transcripción**, que conlleva la inducción y represión coordinada de la expresión de grupos de genes (Kunkel y Brooks, 2002). Estudios realizados mediante la hibridación de micromatrices de cDNA en *A. thaliana* han permitido la identificación de un gran número de factores de transcripción implicados en la ruta de transducción de señal mediada por SA, JA y ET, que controlan la expresión de muchos genes relacionados con la respuesta a estrés (Chen *et al.*, 2002). Entre los genes que se inducían específicamente durante la infección se encontraron algunos que pertenecen a las superfamilias AP2/EREBP, proteínas Myb, WRKY y algunos tipos de proteínas con dedos de zinc.

Los resultados de anotación funcional muestran que únicamente la condición de infección respecto a aire tiene sobrerrepresentada la “respuesta inmune innata” ($p = 0,0289$) y la “respuesta de defensa, interacción incompatible” ($p = 0,0103$). El estudio más detallado de estas categorías muestran genes relacionados con procesos de señalización y síntesis de JA, como aquellos que codifican una MPK4, una LOX2 o una proteína LSD1 (“Lesion Simulating Disease 1”), implicadas en la respuesta frente a patógenos y en muerte celular (Mateo *et al.*, 2004; Brodersen *et al.*, 2006). En estos procesos se observa únicamente un gen que codifica una quitinasa, lo que sugiere poca implicación de las proteínas PR en estos procesos.

El estudio de los unigenes de la micromatriz relacionados con transcripción y señalización confirmó que algunos de ellos están inducidos o reprimidos diferencialmente durante la infección (Tabla 16). De entre los genes que codifican factores de transcripción, los que tienen una mayor inducción en infección respecto a herida codifican una proteína NAM y una proteína Spf1. Las proteínas NAM (“No Apical Meristem”) son factores de transcripción implicados en procesos de desarrollo, como la formación de

meristemos y de órganos florales, pero también en el control hormonal de la planta y en la respuesta de defensa (Duval *et al.*, 2002). El factor de transcripción Spf1 es necesario para el control del aporte de carbono en el crecimiento celular. La expresión de *Spf1* depende de la presencia de nutrientes y responde rápidamente a situaciones de estrés (Ishiguro, 1994 901 /id}. El siguiente gen que codifica un factor de transcripción con mayor expresión diferencial durante la infección es de tipo WRKY. Las proteínas WRKY son una superfamilia de factores de transcripción con más de 100 representantes en *A. thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000). Algunos miembros de esta familia están implicados en la regulación de varios procesos fisiológicos de plantas, entre los que se incluye el desarrollo de tricomas, la senescencia o la defensa frente a patógenos, actuando como reguladores positivos y negativos de la respuesta a la enfermedad (Eulgem y Somssich, 2007). De hecho, un mecanismo utilizado para la inducción de las respuestas de defensa de las plantas consiste en la inactivación de las proteínas que inhiben a los factores de transcripción WRKY (Eulgem y Somssich, 2007).

Respecto a la represión de factores de transcripción, los que sufren mayor regulación negativa son dos genes que codifican proteínas ASR. Estos genes están inducidos por ABA, y parecen estar implicados en procesos del desarrollo de la planta, como la senescencia y el desarrollo del fruto, y en respuestas a estreses abióticos, como la deshidratación, sal, frío y el defecto de luz (Cakir *et al.*, 2003).

3. Redireccionamiento del metabolismo celular del fruto en respuesta a la infección por *P. digitatum*. Implicación del metabolismo secundario.

El estudio de las categorías funcionales de los clones obtenidos en las bibliotecas génicas RindPdigS, RindPdig24 y PostharvP1, junto con el análisis de la anotación funcional mediante ontologías génicas (GO) a partir de los resultados de la hibridación de micromatrices, han aportado información sobre los procesos biológicos implicados en la respuesta de los frutos cítricos a la infección por *P. digitatum*, la herida y el tratamiento con ET. Estos resultados han demostrado que durante la infección por dicho hongo se produce una inducción de varias rutas metabólicas, tanto del metabolismo primario como secundario, observándose que el metabolismo

de fenilpropanoides, isoprenoides y alcaloides están muy representados en las diferentes aproximaciones realizadas durante este trabajo.

El análisis de la distribución de las ESTs de la biblioteca RindPdigS con homólogos en *A. thaliana* en categorías funcionales, usando la base de datos del MIPS, mostró que el 38% de los clones relacionados con metabolismo forman parte del “metabolismo secundario”, el 27% del “metabolismo de aminoácidos” y el 6% del “metabolismo de lípidos, ácidos grasos e isoprenoides” (Tabla 4). De los 365 clones secuenciados válidos de RindPdigS, se han encontrado 65 clones con categoría funcional relacionada con el metabolismo secundario (18% del total), los cuales han sido agrupados en un total de 30 unigenes (Figura 58).

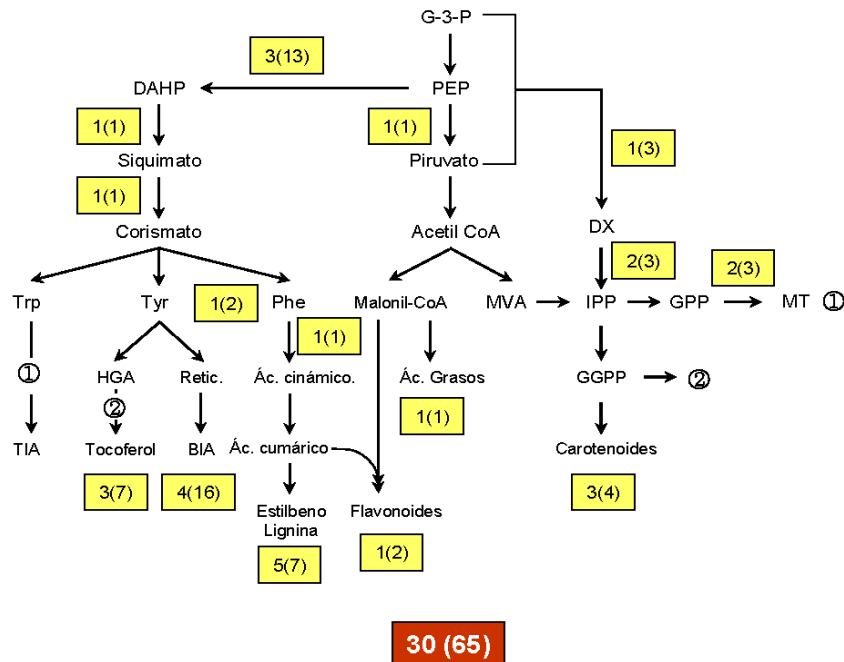


Figura 58. Esquema de las rutas del metabolismo secundario de frutos cítricos en las que se indica en los cuadros el número de unigenes de la biblioteca RindPdigS en esa parte de la ruta, y entre paréntesis el número de clones pertenecientes a esos unigenes. G-3-P: gliceraldehido-3-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; Pyr: piruvato; DAHP: 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato; Trp: triptófano; Tyr: tirosina; Phe: fenilalanina; TIA: alcaloide terpenoide indólico; HGA: ácido homogentísico; Retic: reticulina; BIA: alcaloide benzilisoquinólic; DX: desoxixilulosa; MVA: ácido mevalónico; IPP: Isopentenildifosfato; GPP: geranildifosfato; GGPP: geranilgeranildifosfato; MT: monoterpenos. ① y ② indican interacción entre diversas rutas.

La representación gráfica de la localización metabólica de estos unigenes presentes en la macromatriz muestra cómo la infección parece estar produciendo una activación de las rutas metabólicas relacionadas con fenilpropanoides, isoprenoides y alcaloides (Figura 58).

El estudio de las hibridaciones de las micromatrices ha mostrado también, tanto a nivel de genes individuales como a nivel de las anotaciones funcionales globales, una sobrerrepresentación de genes relacionados con el metabolismo secundario que están inducidos por la infección (Tabla 12 y Tabla 15). Los datos más relevantes sobre las rutas más significativas se discuten con más detalle a continuación.

3.1. Biosíntesis de corismato/siquimato.

Gran cantidad de compuestos del metabolismo secundario se producen a partir de moléculas sintetizadas en otras rutas del metabolismo primario. La **ruta del siquimato** dirige el metabolismo de la glucosa hacia la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) (Herrmann y Weaver, 1999). Estas moléculas del metabolismo primario son punto de partida para la biosíntesis de determinados compuestos que forman parte del metabolismo secundario. Muchos metabolitos derivados de estos tres aminoácidos están descritos como agentes antimicrobianos, y su síntesis está inducida durante la infección (Herrmann, 1995).

En los resultados de la secuenciación de los clones de RindPdigS, se observa que la distribución en categorías funcionales de las ESTs con homólogo en *A. thaliana*, usando la base de datos del MIPS, muestra una alta proporción de genes relacionados con el “metabolismo de aminoácidos” (Tabla 4). En la Figura 58 se puede advertir cómo esta biblioteca sustractiva tiene representación de las reacciones que suponen el desvío de fosfoenolpiruvato (PEP) hacia la síntesis de corismato. Por otro lado, las bibliotecas RindPdig24 y PostharvP1 tienen también alta representación de genes implicados en estas rutas. Uno de los clones más abundantes en ambas colecciones codifica una fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa, que forma parte de la ruta del siquimato (Tabla 8). El estudio de la anotación funcional muestra que dentro de los procesos biológicos inducidos durante la infección respecto de la herida se encuentran sobrerrepresentados los “procesos de biosíntesis de la familia

de aminoácidos aromáticos, ruta del siquimato” (Tabla 14). El uso de la herramienta “OMICS Viewer” apoya estos resultados presentando inducción por infección de los genes implicados en la ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano y fenilalanina (Figura 37).

La primera reacción de la ruta del siquimato es la condensación de PEP con eritrosa-4-fosfato para formar 3-desoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato (DAHP) gracias a la acción de la enzima DAHP sintasa (Herrmann y Weaver, 1999). Estudios en *A. thaliana* sugieren la existencia de al menos dos genes *DAHP* (*DHSI* y *DHSII*) (Keith *et al.*, 1991). Estos autores proponen la existencia de una expresión diferencial de estos dos genes; *DHSI* parece tener una inducción de su expresión tanto por herida como por la infección con el patógeno *Pseudomonas syringae*, mientras que *DHSII* no sufre inducción por estos tratamientos. Estos resultados sugieren que *DHSI* y *DHSII* tienen diferentes funciones fisiológicas, para permitir a la planta una regulación independiente de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos por distintos requerimientos fisiológicos, como la síntesis de proteínas o el metabolismo secundario.

Los sustratos de la reacción catalizada por la DAHP, el PEP y la eritrosa-4-fosfato, son dos intermediarios de la ruta glicolítica y de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, respectivamente. Al analizar los resultados de las hibridaciones de las micromatrices mediante el uso del programa informático “OMICS viewer” se observó que entre las rutas que se inducen por la infección se incluye la ruta oxidativa de las pentosas fosfato como sobrerrepresentada entre los procesos inducidos durante la infección. La inducción de estas rutas durante la infección es un proceso ya descrito en otras plantas. Así, el tratamiento de cultivos celulares de *Petroselinum crispum* con elicitores del hongo *Phytophthora megasperma* supone un aumento inmediato en la producción de CO₂, y la activación de las enzimas claves en la regulación del flujo de carbono hacia la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato (Norman *et al.*, 1994).

El estudio de expresión por hibridación Northern del gen *DAHP* confirma la inducción de su expresión en respuesta a herida y especialmente durante la infección, tanto en naranjas ‘Navelate’ como mandarinas ‘Clemenules’ (Figura 41). El estudio del gen *EPSPs*, que codifica la 3-fosfosiquimato-1-carboxibiniltransferasa implicada en un paso previo a la síntesis de corismato, muestra inducción por la herida e infección en naranjas ‘Navelate’, sin embargo su nivel de expresión en

mandarinas 'Clemenules' es mucho menor y sólo muestra una clara inducción por ET, al igual que ocurre en los frutos de naranja (Figura 41).

La ruta del siquimato es el punto de partida para la síntesis de compuestos fenólicos cuya función está relacionada con la respuesta frente a patógenos, como los flavonoides y las cumarinas (Ortuño *et al.*, 1997; Angioni *et al.*, 1998; Afek *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 2004). Diferentes trabajos han demostrado la implicación de varios de estos compuestos, como la escoparona, umbeliferona y escopoletina en la respuesta de los frutos cítricos a la infección (véase apartado 3.3).

3.2. Biosíntesis de Isopentenildifosfato (IPP).

Los isoprenoides constituyen un grupo muy numeroso y heterogéneo de compuestos del metabolismo primario, como los carotenoides, la clorofila y el ABA, entre otros, y del metabolismo secundario, como la xantosina o el fitol. Todos ellos derivan de una unidad estructural común, el isopentenildifosfato (IPP) (Lichtenthaler, 1999). En plantas superiores, la **síntesis de IPP** puede tener lugar a través de dos rutas, la del mevalonato, y la del metileritritolfosfato (MEP) (Figura 59)(Lichtenthaler, 1999).

Estudios realizados mediante el uso de precursores marcados sugieren que los triterpenos, sesquiterpenos, y politerpenos están producidos en el citosol a través de la ruta del mevalonato, mientras que los monoterpenos se forman en los plastidios a través de la vía del MEP (Herrmann, 1995). Esta compartimentación coincidiría con la función de los correspondientes compuestos derivados en la fotosíntesis (cloroplasto) o como constituyentes de las membranas de las células de la planta (ruta citosólica) (Nugroho y Verpoorte, 2002).

El análisis de las bibliotecas de cDNA RindPdigS, RindPdig24 y PostharvP1 muestra la presencia de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides en todas ellas, sugiriendo la importancia de estas rutas metabólicas durante la respuesta a la infección (Tabla 4 y Tabla 8). De hecho, el gen de la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, enzima clave en la vía del MEP, es de los unigenes más abundantes en RindPdig24 y PostharvP1 (Tabla 8).

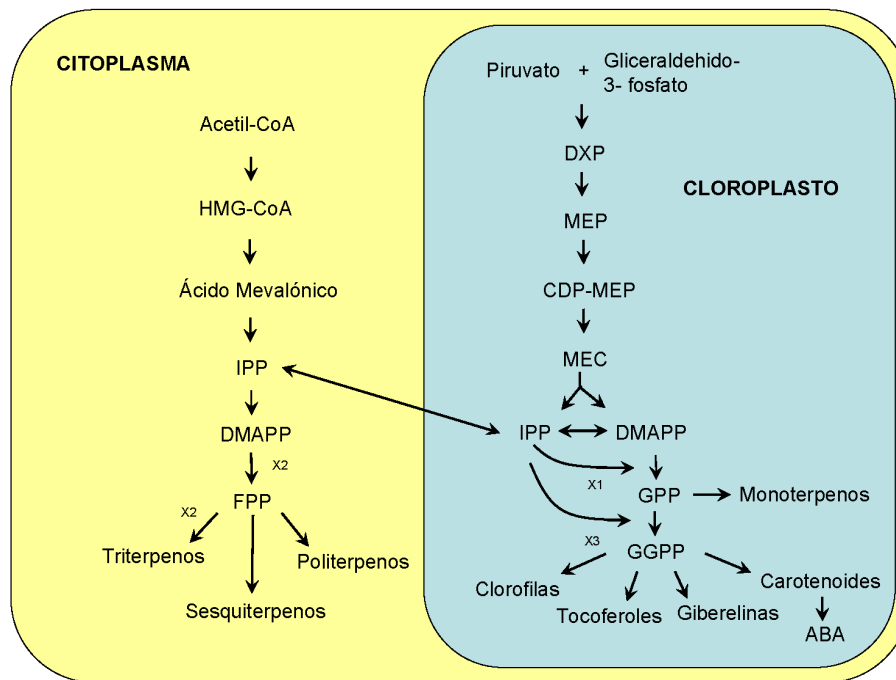


Figura 59. Biosíntesis de IPP en las células vegetales mediante la ruta del mevalonato en el citosol y la ruta del MEP en los plastidios, indicándose los metabolitos principales derivados de ambas rutas. IPP: isopentenildifosfato, DMAPP: dimetilalil pirofosfato, FPP: farnesil pirofosfato, DXP: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, MEP: 2-metileritritol-4-fosfato, CDP-MEP: 4-difosfocitidil-2-metileritritol-2-fosfato, MEC: 2-metileritritol-2,4-ciclodifosfato, GPP: geranyl pirofosfato, GGPP: geranylgeranyl pirofosfato, ABA: ácido abscísico.

El estudio de la anotación funcional de los resultados de micromatrices, muestra la inducción durante la infección respecto de la herida del proceso biológico “biosíntesis de isopentenil bifosfato (IPP), ruta independiente del mevalonato” con un nivel de anotación GO más profundo. Este nivel GO más alto refleja un mayor detalle en la anotación, lo que sugiere una inducción de la rama MEP (Tabla 14). Esta conclusión se apoya con el análisis mediante el programa informático “OMICS viewer” que mostró cómo la herida, y en mayor medida la infección por *P. digitatum*, suponen la inducción de genes implicados en la síntesis de IPP por la vía del MEP, mientras que la vía del mevalonato queda reprimida (Figura 39). Los resultados indican que la síntesis de IPP en respuesta a herida e infección se induce específicamente a través de la vía del MEP, y

sugieren una selección en el direccionamiento del metabolismo debido a la infección por patógenos mediante la inducción/represión de rutas alternativas.

La inducción del metabolismo de isoprenoides y sus derivados durante la infección se confirma con los resultados de expresión génica obtenidos mediante hibridación Northern. Se puede observar que existen diferentes patrones de expresión diferencial (). GcpE y DXS, implicados en la ruta de síntesis de IPP vía MEP muestran inducción por la infección, confirmando los resultados de anotación funcional. Los resultados de hibridación de genes relacionados con derivados de isoprenoides, muestran una inducción a tiempos cortos del gen que codifica una ácido homogentísico geranylgeranyl transferasa (*HGGT*) (). Sin embargo, tanto tocoferol ciclasa (*TC*) como β -caroteno hidroxilasa (*BCH*) sufren una represión de la expresión durante la infección, lo que sugiere una inhibición de las rutas de síntesis de tocoferoles y carotenoides, que se encuentran más abajo, sugiriendo un nuevo redireccionamiento del metabolismo de isoprenoides durante la infección.

Existen trabajos que demuestran la presencia de isoprenoides en los aceites esenciales de frutos cítricos. Estudios realizados sobre frutos cítricos infectados con *P. digitatum* y *P. italicum* han comprobado la presencia de monoterpenos, como geraniol y nerol, y de sesquiterpenos, como β -farneseno y α -elemeno, en los aceites esenciales, y se ha visto que hay una correlación positiva entre el contenido de algunos de estos compuestos y la inhibición del desarrollo de patógenos fúngicos, especialmente de *P. digitatum* (Caccioni *et al.*, 1998). Otros autores han demostrado la presencia de compuestos antifúngicos en las glándulas de aceite de limones inmaduros (Rodov *et al.*, 1995). Entre estos compuestos se identificó alta concentración del monoterpeno citral y las cumarinas o furanocumarinas limetina, isopimpinellina y 5-geranoxi-7-metoxicumarina. Estos compuestos están preformados en el fruto, lo que indica que su ruta de síntesis no requeriría ser inducida por la presencia del patógeno tal y como se deduciría de nuestros resultados. Sin embargo, su concentración disminuye considerablemente con la maduración del fruto, por lo que es posible que la inducción de la biosíntesis de isoprenoides a partir de metileritritol como consecuencia de la infección por *P. digitatum* ocurra solamente en frutos maduros.

3.3. Metabolismo de fenilpropanoides.

Está descrito que, en plantas, el metabolismo de fenilpropanoides sufre modificaciones en respuesta a diferentes tipos de estrés, entre ellos el ataque por patógenos (Dixon y Paiva, 1995). Diferentes estudios han descrito la implicación de genes relacionados con esta familia de compuestos en las respuestas de los frutos cítricos frente a diversos estreses, como las radiaciones gamma, la aplicación de ET o el desarrollo de la infección por *P. digitatum* (McCollum, 2000; Lafuente *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 2005).

Se ha estudiado la presencia de compuestos fenólicos en cítricos, especialmente cumarinas, flavanonas, flavonas y flavonoides en la corteza y zumo de frutos de diferentes cítricos (Nogata *et al.*, 2006; Peterson *et al.*, 2006). Sin embargo se sabe bastante poco sobre la implicación de estos compuestos durante la infección de los frutos. Los estudios sobre la presencia de compuestos fenólicos en frutos cítricos como respuesta a la infección por patógenos se han centrado en las cumarinas y los flavonoides. Como ya se ha comentado, la umbeliferona es una fitoalexina que se acumula en el albedo de pomelos inmaduros infectados por *P. digitatum* (Afeq *et al.*, 1999). La escoparona es otra fitoalexina que se detecta en el flavedo de limones inoculados con *P. digitatum*, mientras que no se detecta en frutos sanos (Kim *et al.*, 1991a). Se ha observado que tanto la presencia de escoparona como de otra cumarina, la escopoletina, reducen la incidencia de la infección en heridas infectadas por *P. digitatum* (Angioni *et al.*, 1998). Por otro lado, dentro de los flavonoides, se ha estudiado la implicación de las flavanonas y las polimetoxiflavonas en frutos cítricos infectados con *P. citrophthora* (Del Rio *et al.*, 2004).

La fenilalanina, precursor de la síntesis de fenilpropanoides, es uno de los aminoácidos derivados de la ruta del siquimato. Este aminoácido aromático se transforma en ácido cinámico por acción de la enzima PAL (Dixon *et al.*, 2002). Esta enzima es clave en el metabolismo de fenilpropanoides, ya que es la primera en la ruta, dando lugar a la síntesis de diversos compuestos relacionados con las respuestas de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos (Dixon y Paiva, 1995). En este trabajo hemos observado que *PAL* es uno de los genes con mayor expresión en infección respecto a aire según los resultados de hibridación tanto con macro- como con micromatrices (Tabla 19). Este hecho concuerda con resultados previos en frutos cítricos que muestran una inducción en la

expresión de este gen en respuesta al ataque por patógenos, tanto en pomelos como en naranjas 'Navelina' (McCollum, 2000; Marcos *et al.*, 2005; Ballester *et al.*, 2006).

Además, se sabe que la actividad PAL en frutos cítricos muestra un aumento en respuesta a la infección por *P. digitatum* en la piel del fruto (Ballester *et al.*, 2006), por tratamientos de inducción de resistencia como luz UV (Droby *et al.*, 1993a) o por el empleo de elicitores químicos o biológicos (Fajardo *et al.*, 1998), lo que relaciona el metabolismo de fenilpropanoides con las respuestas de defensa de los cítricos frente a la infección por patógenos.

El estudio de la anotación funcional GO muestra que los “procesos metabólicos de fenilpropanoides” están sobrerrepresentados entre aquellos procesos biológicos que se inducen durante la infección y la herida frente a aire (Tabla 15). Estos resultados están apoyados, además, por los obtenidos mediante el uso de la herramienta de visualización de rutas, en donde se puede apreciar que la infección por *P. digitatum* produce una inducción del metabolismo general de fenilpropanoides a partir de la fenilalanina (Figura 38).

En el análisis de hibridación Northern se observa que, en general, el patrón de expresión de aquellos genes estudiados, relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides, como *PAL*, *AT*, *OX*, *CYP79A1*, *COMT* o *CaOMT*, corresponde a una ligera inducción en respuesta a la herida y una alta inducción como respuesta a la infección, lo que confirma los resultados obtenidos por las otras aproximaciones (Figura 42).

Los genes *OMT* están implicados en la metilación de diversos compuestos, como fenilpropanoides, alcaloides y algunos isoprenoides. La metilación de compuestos fenólicos es un paso importante en diferentes procesos, entre otros la síntesis de moléculas implicadas en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Dixon y Paiva, 1995). Pero la función más estudiada de las *OMTs* se refiere a su implicación en la biosíntesis de ligninas (Anterola y Lewis, 2002). La síntesis de lignina está relacionada con las respuestas de defensa de las plantas al ataque por patógenos. Se ha comprobado, en limones, que la infección por *P. digitatum* induce la acumulación de estos compuestos alrededor del punto de inoculación (Nafussi *et al.*, 2001). Estas moléculas hacen más resistentes las paredes celulares, dificultando que la zona de infección sea degradada por las

enzimas líticas del hongo. Además evitan la difusión de enzimas y toxinas del hongo, y de agua y nutrientes de la planta.

Se ha descrito que las ROS pueden actuar como intermediarios inductores de la síntesis de fitoalexinas (Apostol *et al.*, 1989). El H₂O₂ actúa en la síntesis de compuestos fenólicos como ligninas y suberinas por acción de la peroxidasa (POX). A partir de los resultados de hibridación de las micromatrices hemos observado que de los 9 unigenes con homología a POX, dos se inducen por la infección y dos se reprimen, mientras que los otros 5 no muestran cambios de expresión (Tabla 18). Estos resultados sugieren diferentes implicaciones en el metabolismo de cada uno de ellos. El estudio mediante análisis Northern de la expresión de un gen POX (C06015A10) muestra una alta expresión por la herida, pero que se atenúa en la infección a partir de las 24 horas (Figura 42).

La inducción de la expresión de diferentes *citocromo P450* durante la infección se ha observado en todas las aproximaciones realizadas (Tabla 12 y Figura 42). Los citocromos P450 están implicados en la síntesis de diferentes compuestos, desde componentes estructurales (fenilpropanoides, ácidos grasos y esteroides), a moléculas de señalización (oxilipinas, brasinosteroides, ácido abscísico y ácido giberélico) y compuestos de defensa (alcaloides, terpenos y cumarinas) (Schuler *et al.*, 2006). Diferentes estudios relacionan a los citocromo P450 con la síntesis de compuestos fenólicos, flavonoides y cumarinas (Bourgaud *et al.*, 2006; Ayabe y Akashi, 2006; Ehling *et al.*, 2006). Las hibridaciones Northern muestran la expresión de dos genes que codifican una citocromo P450 79A1 (*CYP79A1*) que se induce durante la infección, y una citocromo monoxigenasa (*CYPM*) con represión durante la herida y la infección (Figura 42). Estos resultados sugiere la diversificación de funciones de estos genes en el metabolismo de los cítricos.

Todos estos resultados apoyan otros trabajos realizados en el "Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha" del IATA que han demostrado un cambio en la expresión de genes de frutos cítricos relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides tanto en respuesta a la infección por *P. digitatum* como a la aplicación de tratamientos de inducción de resistencia frente a este patógeno, sugiriendo la implicación de estos compuestos en la respuesta de defensa de los frutos cítricos a la infección por patógenos (Ballester, 2007).

3.4. Metabolismo de alcaloides.

Los **alcaloides** son un grupo de metabolitos secundarios relacionados, entre otros aspectos, con la respuesta de las plantas a la infección por patógenos (Ziegler y Facchini, 2008). Éstos se clasifican en 4 grupos atendiendo a su naturaleza: los alcaloides terpenoides indólicos (TIAs), sintetizados a partir del aminoácido Trp, los alcaloides benzilisoquinólicos (BIAs) como la morfina o la berberina, que provienen de la Tyr, los alcaloides tropano como la nicotina o la cocaína, cuyo precursor es la ornitina, y los alcaloides derivados de purinas como la cafeína, que proceden de la xantosina (Facchini, 2001).

Al igual que los isoprenoides y fenilpropanoides, hay estudios que demuestran el efecto antimicrobiano de ciertos alcaloides presentes en las plantas. Diversos trabajos muestran cómo la tomatina y la solanina reducen el crecimiento de *S. cerevisiae* y *A. brassicicola* en ensayos *in vitro* (Fewell y Roddick, 1993; Simons *et al.*, 2006), mientras que la cafeína y la teobromina retardan el crecimiento de *C. pernicioso* (Aneja y Gianfagna, 2001). Sin embargo, hay pocos alcaloides detectados hasta el momento en cítricos, y se limitan a la cafeína, la teobromina, la teofilina y la paraxantina en flores (Kretschmar y Baumann, 1999) y el ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroharmano-3-carboxílico en frutos y zumos (Herraiz y Galisteo, 2003).

Un resultado relevante de nuestro trabajo es que el análisis de la biblioteca sustractiva RindPdigS, enriquecida en genes que se expresan diferencialmente durante la infección, nos ha permitido identificar la presencia en frutos cítricos de genes que, en función de las homologías de secuencia que presentan, parecen estar relacionados con la biosíntesis de todos los grupos de alcaloides (Figura 58). La presencia en RindPdigS de 10-hidroxigeraniol oxidorreductasa (unigen N06D12) y de geraniol 10-hidroxilasa (P-48), enzimas implicados en la ruta de síntesis de monoterpenos a partir de IPP, sugiere la inducción de la ruta de síntesis de los TIAs durante la infección, aunque, según las hibridaciones de las macromatrices, sólo la primera muestra inducción en esta condición respecto a aire (véase material adicional). La implicación de los TIAs en la defensa de las plantas frente a patógenos ya ha sido descrita por algunos autores, como es el caso de la actividad antifúngica de la estrictosidina frente al hongo fitopatógeno *P. infestans* en *Catharanthus roseus* (Luijendijk *et al.*, 1996).

El aminoácido Tyr sufre una serie de descarboxilaciones, ortohidroxilaciones y desaminaciones para producir dopamina e hidroximetilacetaldehído, precursores de los BIAs (Rueffer y Zenk, 1987). La berberina, sanguinarina y palmatina son ejemplos de BIAs detectados en la interacción de plantas con herbívoros y microorganismos (Schmeller *et al.*, 1997; Freile *et al.*, 2003). Un paso en la síntesis de berberina está catalizado por una oxidorreductasa dependiente de FAD, llamada “berberine bridge enzyme” (BBE) por el tipo de reacción que cataliza, formando un enlace único en la naturaleza (el llamado “puente de la berberina”) (Facchini *et al.*, 2004). En los clones secuenciados de RindPdigS se han encontrado 3 unigenes (P-03, P-27 y N04D12) con homología a BBE o a genes implicados en la síntesis de proteínas similares que presentan también un dominio de unión a FAD (FBD, véase material adicional). Gracias a la secuenciación del gen completo (comunicación personal, González-Candelas, L.), sabemos que los tres unigenes son fragmentos adyacentes de un mismo gen. Por este motivo, todos ellos comparten un mismo patrón de expresión con inducción durante la infección. En las micromatrices hay presentes 4 unigenes con homología a BBE (unigenes 3442, 6798, 7144 y C03004A11), observándose que, excepto 7144, todos ellos se inducen durante la infección. La expresión diferencial de estos genes se confirmó mediante hibridación Northern. La hibridación de las sondas P-03 (FBD), P-27 (BBE-1) y N04D12 (BBE-2) mostró inducción debido a la infección tanto en naranjas ‘Navelina’, como en mandarinas ‘Clemenules’ (Figura 43).

La presencia del gen que codifica una tropinona reductasa (TR) en RindPdigS, (unigen N08F02), sugiere la implicación de los alcaloides tropano en la respuesta a la infección. Sin embargo, no hay evidencias claras de una relación de estos compuestos con la respuesta de las plantas a la presencia de patógenos. De hecho, la calistegina, un tipo de alcaloide tropano presente en *Calystegia sepium*, no influye en el desarrollo del hongo patógeno *Stagonospora convolvuli in vitro* y su concentración en la planta no depende de la infección por dicho hongo (Hoke y Drager, 2004). Los resultados de la hibridación Northern con el gen TR mostraron una ligera inducción por la herida y que es mayor durante la infección, con un pico temprano de expresión que revelaría una inducción rápida de estos compuestos en respuesta a patógenos (Figura 43).

El metabolismo de los alcaloides derivados de la purina aparece también representado en la respuesta a la infección. El gen de la cafeína sintasa (CS), está presente en RindPdigS (unigen P-62), siendo uno de los más abundantes de la colección con 4 representantes. CS codifica una enzima implicada en la síntesis de cafeína a partir de xantosina. Este compuesto se encuentra en las semillas, hojas, y frutos de más de 60 plantas, en las que actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertas clases de insectos cuando se alimentan de éstas (Facchini, 2001). En el caso de los cítricos, no se ha detectado la presencia de cafeína en frutos pero si en flores y hojas (Stewart, 1985; Kretschmar y Baumann, 1999). El estudio de la expresión de CS por hibridación de las macromatrices mostró una clara expresión diferencial durante el proceso de infección por *P. digitatum* (Tabla 5 y). La posterior hibridación Northern de este gen confirmó su expresión diferencial durante este proceso (Figura 43), siendo uno de los ejemplos significativamente específicos de infección. Otros trabajos realizados en nuestro laboratorio para estudiar la presencia de compuestos fenólicos por HPLC en frutos cítricos no ha permitido detectar cafeína en frutos donde se está induciendo la CS a causa de un tratamiento de inducción de resistencia, aunque se observó que el tratamiento de inducción de resistencia induce la formación de dos compuestos fluorescentes, con máximos de absorbancia similares al de diversos alcaloides, lo que sugiere la posible implicación de derivados de alcaloides entre los mecanismos de defensa de los frutos cítricos (Ballester, 2007). Hay que tener presente que el hecho de que se observe una inducción en frutos cítricos de genes con homología a otros implicados en el metabolismo de alcaloides no demuestra que se estén produciendo estos alcaloides en el fruto.

Por otro lado, el estudio de la anotación funcional mostró a los “procesos biosintéticos de derivados de aminoácidos” entre los procesos biológicos sobrerrepresentados durante la infección y la herida respecto a aire (Tabla 15). Este resultado sugiere que la síntesis de compuestos del metabolismo secundario a partir de aminoácidos, como los alcaloides o fenilpropanoides está activada en frutos cítricos en respuesta a la herida y la infección por *P. digitatum*, apoyando así los resultados obtenidos en el resto de aproximaciones.

Como se ha descrito, existen diferentes trabajos que han confirmado la presencia de compuestos del metabolismo secundario durante la respuesta a la infección (Darvill y Albersheim, 1984; Bednarek *et*

al., 2005), pero son muy escasos los estudios acerca de los cambios en la expresión génica de los frutos cítricos que llevan a la producción de estos compuestos. En este trabajo, el conjunto de resultados obtenidos en relación a la expresión de genes relacionados con el metabolismo secundario apunta a un cambio de la expresión génica del fruto cítrico como respuesta a la infección por *P. digitatum* hacia la biosíntesis de alcaloides, isoprenoides y fenilpropanoides. Estos resultados en sí sugieren la presencia de compuestos del metabolismo secundario durante la respuesta a la infección, pero para confirmarlo habría que hacer estudios sobre la concentración de estos compuestos en los frutos cítricos y evaluar su actividad antimicrobiana.

En el “Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha” del IATA se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* la posible actividad antifúngica de diferentes compuestos fenólicos sobre diversos hongos fitopatógenos del género *Penicillium* (Ballester, 2007). Estos trabajos han confirmado que la aplicación de cumarinas, especialmente escoparona y umbeliferona, retrasa el crecimiento de *P. digitatum*, sugiriéndose que pueda ser importante en la defensa del fruto para dar tiempo a la activación de otros mecanismos de defensa, como la cicatrización, que ayudarían a proteger el fruto frente a la colonización por parte del patógeno (Lai *et al.*, 2003). Otros trabajos muestran cómo la infección por *P. citrophthora* provoca en naranjas ‘Valencia’ una disminución de flavanonas y flavonas polimetoxiladas (Del Rio *et al.*, 2004). Sin embargo, no se observaron cambios relevantes en estos compuestos en la piel de naranjas ‘Navelina’ durante el proceso de infección por *P. digitatum*.

3.5. Expresión de genes del metabolismo secundario en los frutos cítricos por la interacción con diferentes hongos del género *Penicillium*.

Para comparar el comportamiento de los frutos cítricos durante la interacción con diferentes hongos, patógenos y no patógenos, del género *Penicillium*, se hizo un estudio de los cambios de expresión de diferentes genes relacionados con el metabolismo secundario en respuesta a herida y a la inoculación con *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum* y *P. brevicompactum* en naranjas ‘Navelate’ (Figura 52, Figura 53 y Figura 55).

El patrón de expresión más general observado para la mayoría de los genes estudiados en este contexto, como es el caso de los genes *COMT*, *AT-1* o *P-21*, consiste en un nivel de expresión relativamente bajo y uniforme por efecto de la herida, y una inducción como consecuencia de la interacción con cualquiera de los cuatro hongos, aunque con mayor intensidad y rapidez en los hongos patógenos de cítricos, especialmente *P. digitatum* (Figura 52, Figura 53 y Figura 55). Estos resultados, por tanto, indicarían que la capacidad infectiva de *P. digitatum* y *P. italicum* no se debe a una deficiencia en la activación de los mecanismos de defensa por parte del fruto, sino, más bien, a que a pesar de la inducción de respuesta del fruto, el hongo debe tener la capacidad de superar las defensas, y de esta forma infectarlo. El hecho de que *P. expansum* y *P. brevicompactum* no induzcan la expresión en el fruto de estos genes, o lo hagan en menor medida, parece indicar que estos hongos no tienen la capacidad por sí mismos de infectar al fruto cítrico, por lo que éste no necesita activar los diferentes mecanismos de defensa.

Sin embargo, el patrón de expresión de otros genes determinados no correlaciona por completo con esta hipótesis. *GcpE* y *DCN*, por ejemplo, tienen mayor expresión en respuesta a la inoculación con *P. expansum* que con *P. italicum* (Figura 53 y Figura 55). El caso de *PAL* es incluso más llamativo, pues *P. expansum* es el hongo que provoca la mayor expresión de este gen, mayor incluso que la causada por *P. digitatum* (Figura 52). Además, se sabe que *P. digitatum* tiene la capacidad de inhibir la actividad *PAL* como mecanismo de disrupción de la respuesta de defensa del fruto (Lisker *et al.*, 1983), por lo que estos resultados corroborarían indirectamente la importancia de la actividad de este enzima en la inducción de las respuestas de defensa frente a hongos patógenos. Este resultado es de resaltar si tenemos en cuenta la importancia de *PAL* como primer paso en la síntesis de los fenilpropanoides (Dixon *et al.*, 2002).

Los niveles relativamente altos de expresión de ciertos genes frente a la infección por *P. expansum* sugieren la activación por parte del fruto cítrico de una respuesta activa de defensa frente a este hongo, y que no ocurre en respuesta a la inoculación por *P. brevicompactum*, siendo ambos hongos no patógenos de frutos cítricos. *P. expansum* es un patógeno de frutos de semilla, como la manzana, pero incapaz de infectar frutos cítricos, mientras que *P. brevicompactum* no es patógeno potencial de frutos. Por tanto, estos resultados sugieren la capacidad por parte del fruto cítrico de

inducir diferencialmente respuestas de defensa eficaces frente a la presencia de un posible patógeno.

Estudios realizados sobre los mecanismos de patogenicidad de *P. digitatum* sobre frutos cítricos indican que este hongo tiene la capacidad de inhibir la respuesta mediada por ROS en el fruto, sugiriendo que la capacidad infectiva de *P. digitatum* en frutos cítricos se debe a su capacidad de suprimir al menos este componente de las respuestas de defensa de los mismos (Macarasin *et al.*, 2007). Este comportamiento se corresponde con un patrón de expresión en el cual solamente los hongos patógenos de frutos cítricos son capaces de suprimir de forma activa la expresión de genes de defensa, mientras que los hongos no patógenos no producirían cambios de expresión. Este patrón de expresión ha sido observado en alguno de los genes estudiados por análisis Northern, como el caso de *UGT*, implicado en la síntesis de una enzima que cataliza la transferencia de un grupo glicosil desde un UDP-azúcar a otra molécula hidrofóbica, y cuya expresión en los frutos infectados por los hongos patógenos es inferior a la expresión en los frutos control o los frutos inoculados con hongos no patógenos (Figura 52).

Por ello, los resultados obtenidos mediante hibridación Northern de genes relacionados con metabolismo secundario, sugieren que el ataque por diferentes hongos del género *Penicillium* induce una compleja respuesta del fruto cítrico donde están implicados diversos genes relacionados con diferentes rutas, tanto si el ataque está producido por organismos patógenos de frutos cítricos como no patógenos. Las diferentes respuestas de los frutos a la infección por cada uno de los patógenos sugiere la inducción de una respuesta diferencial para cada tipo de microorganismo.

4. Señalización de respuestas de defensa del fruto cítrico a la infección. Implicación del etileno.

La defensa de las plantas como respuesta al ataque por patógenos está regulada por una compleja red de rutas de señalización, en la que están implicadas hormonas como el ET, JA, SA y ABA (Mahalingam *et al.*, 2003; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Robert-Seilantantz *et al.*, 2007; Adie *et al.*, 2007b). Los resultados obtenidos al estudiar los procesos inducidos en

infección respecto a herida, mostraron sobrerrepresentación de los "procesos biosintéticos de hormonas", lo que sugiere que la infección por *P. digitatum* induce en los frutos cítricos la síntesis de hormonas implicadas en la respuesta de los mismos frente a este tipo de estrés, tal como han propuesto estos autores (Tabla 14).

Por otro lado, en el mismo análisis, la "respuesta sistémica dependiente de ET y JA" está sobrerrepresentada al comparar la condición de infección respecto a aire (Tabla 15). Este resultado concuerda con la idea general sobre el efecto cooperador o sinérgico entre el ET y el JA en la activación de las respuestas de las plantas frente a patógenos (Rojo *et al.*, 2003; Lorenzo y Solano, 2005). Entre los genes inducidos en esta categoría se encuentran genes implicados en la síntesis de quinasas, lipoxigenasas y MAP quinasas implicadas en la mediación de la respuesta frente a patógenos.

Además, en este grupo se encuentran varios genes implicados en la síntesis de JA y MeJA, como 12-oxofitodienoato reductasa, lipoxigenasa o s-adenosil-L-metionina:carboxil metiltransferasa. Diferentes moléculas derivadas del metabolismo de lípidos, como la oxilipina JA y otras derivadas de él, tienen un papel importante en la respuesta de las plantas a la presencia de patógenos (Mueller, 1997). Está descrito que la activación de una fosfolipasa A por la presencia del patógeno supone la formación de ácidos grasos, como el linoleico y linolénico, a partir de fosfolípidos de membrana, que derivan a la formación de JA y otros compuestos volátiles implicados en transducción de la señal en defensa (Chandra *et al.*, 1996). En frutos cítricos, la inhibición de la fosfolipasa A2 mediante aplicación de ácido aristolóquico, tuvo el efecto inesperado de incrementar la incidencia de podredumbres, lo que subraya la relevancia del metabolismo de ácidos grasos en las respuestas de defensa del fruto, bien como mecanismo de señalización o como producción de compuestos antimicrobianos (oxilipinas) (Alferez *et al.*, 2008). La inducción de la expresión de genes relacionados con la síntesis de oxilipinas durante la infección de *A. thaliana* por *Pseudomonas*, junto con el hecho de que la aplicación de diferentes oxilipinas provocan la acumulación de callosa y la producción de ROS, apoyan la implicación de estas moléculas en la respuesta de las plantas a la infección (Vellosillo *et al.*, 2007).

Está generalmente aceptado que, así como el ET y JA están implicados en la respuesta de las plantas a la infección por organismos

necrótrofos, el SA juega un papel importante en la respuesta a la infección por organismos biótrofos (Lorenzo y Solano, 2005; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Esta afirmación es muy general, ya que existen trabajos que sugieren un efecto sinérgico entre estas tres hormonas en la respuesta a patógenos. Estudios realizados mediante el empleo de micromatrices en el patosistema *A. thaliana-Alternaria* sugieren la existencia de nodos comunes entre las diferentes rutas de señalización durante la respuesta de defensa de las plantas, incluso entre las rutas mediadas por SA y JA (Schenk *et al.*, 2000; Glazebrook *et al.*, 2003). Sin embargo, la anotación funcional de los resultados de las micromatrices no muestra que haya una respuesta mediada por SA durante la infección de frutos cítricos por *P. digitatum* (Tabla 14 y Tabla 15). Las categorías de “respuesta a estímulos mediada por SA” a nivel 4 de GO, “rutas de señalización mediadas por SA” a nivel 6, “procesos metabólicos relacionados con SA” a nivel 8 y “SAR, rutas de señalización mediadas por SA” a nivel 9, no muestran una significación estadística al comparar la condición de infección o herida respecto a aire (datos no mostrados).

La implicación del ABA en la respuesta de las plantas a estreses abióticos, como la deficiencia de agua, sal y frío está bien caracterizada (Seo y Koshiba, 2002; Zhu, 2002). En *A. thaliana* se ha descrito que, en general, existe una interacción antagonista entre la ruta de señalización mediada por ABA y las rutas mediadas por ET y JA (Anderson *et al.*, 2004). De hecho, se ha observado que en algunos organismos el tratamiento con ABA suprime la síntesis de fitoalexinas e inhibe la transcripción y la actividad de PAL (Ward *et al.*, 1989). Sin embargo, recientes estudios muestran evidencias de que el ABA es un componente importante de la red de señales activadas durante la defensa de las plantas frente a algunos, pero no todos, los patógenos necrótrofos. El ABA potencia la defensa de las plantas a través de al menos dos mecanismos independientes: la inducción de la síntesis de callosa (Ton y Mauch-Mani, 2004), y la regulación de la expresión de genes de defensa por inducción de la biosíntesis de JA (Adie *et al.*, 2007a). La función diferencial de esta hormona en diversas interacciones planta-patógeno sugiere que el nivel en la concentración de ABA podría ser clave en la regulación precisa de las defensas de la planta contra un patógeno determinado, tal y como se ha sugerido en el caso del ET, JA y SA (Jalali *et al.*, 2006). Sin embargo, del mismo modo que en el caso del SA, el estudio de la anotación funcional mediante GO realizado a partir de los resultados de las micromatrices no ha mostrado ninguna respuesta mediada por ABA sobrerrepresentada

durante la infección de los frutos cítricos por *P. digitatum* (Tabla 14 y Tabla 15).

Entre los procesos biológicos reprimidos durante la infección respecto a los frutos control se encuentra la “respuesta a estímulos abióticos” (Tabla 15). Si estudiamos los genes reprimidos en esta categoría, se observa la presencia de varias dehidrinas (*LEA*). Este resultado coincide con el estudio de los unigenes de la micromatriz con mayor represión en infección respecto a herida, donde también se detecta la presencia de tres *LEA* (unigenes 5533, 5584 y 7050) (Tabla 13). Se sabe que la expresión de muchos genes que codifican dehidrinas está inducida por la aplicación de ABA (Giordani *et al.*, 1999; Caruso *et al.*, 2002). Este efecto podría ser una manifestación de la interferencia de las rutas de señalización de estrés biótico reguladas por el SA, JA y ET con las rutas mediadas por ABA.

En experimentos de deshidratación en frijoles se observó la inducción de 10 genes, a los que se les llamó *CPRD* (“Cowpea clones responsive to dehydration”) (Luchi *et al.*, 1996). En general, este tipo de estrés supone la producción de altos niveles de ABA. Así, se observó que algunos de estos genes se inducían por aplicación de ABA, como *CPRD8* y *CPRD22*, pero otros no, como *CPRD14*. En las micromatrices hay presentes 4 unigenes con homología a *CPRD2*, dos de los cuales, 2332 y 4436, son de los que más se inducen durante la infección (Tabla 12). Aunque el gen *CPRD2* de frijol responde significativamente al estrés hídrico, a diferencia de las dehidrinas, no se ha confirmado si su expresión está mediada o no por la aplicación de ABA (Luchi *et al.*, 1996).

4.1. Producción de etileno en la respuesta del fruto a la infección.

Cuando un fruto cítrico es infectado por un hongo se produce un aumento en la producción de ET, debido tanto al fruto como al hongo (Achilea *et al.*, 1985a; Achilea *et al.*, 1985b). El ET es una hormona vegetal implicada en el control de distintos procesos de desarrollo y estrés de la planta (Wang *et al.*, 2002). La implicación del ET en la activación de procesos relacionados con la defensa de las plantas contra la infección por patógenos es compleja y un tanto controvertida (Thomma *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002; Kunkel y Brooks, 2002), ya que el ET puede promover la

susceptibilidad, resistencia o tolerancia dependiendo de la interacción planta-patógeno que se estudie (Bent *et al.*, 1992; Thomma *et al.*, 1999; Hoffman *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Geraats *et al.*, 2003; Berrocal-Lobo y Molina, 2004). En este trabajo de tesis se ha estudiado la regulación de la biosíntesis de ET en frutos cítricos en respuesta a la infección por hongos del género *Penicillium*, y su posible implicación en la regulación de la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa durante este proceso.

Un tipo de aproximación para estudiar la implicación del ET en un proceso determinado consiste en el uso de 1-MCP, molécula que se une irreversiblemente a los receptores celulares de esta hormona, bloqueando su percepción y la transmisión de la señal (Blankenship y Dole, 2003). Durante la realización de este trabajo se estudió el efecto del pretratamiento con 1-MCP sobre el desarrollo de la infección en mandarinas 'Clemenules' inoculadas con *P. digitatum* (Figura 18), y la producción de ET en estos mismos frutos (Figura 19). Los resultados mostraron que el 1-MCP es capaz de alterar no sólo la susceptibilidad de los frutos a la infección, sino también la producción de ET. Estos resultados concuerdan con otros trabajos que muestran cómo la aplicación de ET en plantas de tomate reduce la susceptibilidad a la infección por *B. cinerea*, mientras que el pretratamiento con 1-MCP aumenta la incidencia de infección (Diaz *et al.*, 2002). Sin embargo, los trabajos de aplicación de 1-MCP previos no han mostrado en los frutos cítricos infectados por hongos un efecto concluyente, ya que existen resultados contradictorios; naranjas almacenadas durante 4 semanas a 20 °C mostraron un incremento de podridos al ser pretratadas con 1-MCP (Porat *et al.*, 1999), sin embargo este tratamiento no supuso un incremento del podrido de pomelos infectados con *P. digitatum* (Mullins *et al.*, 2000). Trabajos realizados por nuestro grupo con naranjas 'Navelate' infectadas con este hongo mostraron que el tratamiento con 1-MCP supone un aumento de la susceptibilidad a la infección, un aumento en la producción de ET y un cambio en la expresión de los genes implicados en los últimos pasos de la biosíntesis de ET (Marcos *et al.*, 2005).

El aumento en la producción de ET a causa del tratamiento de los frutos con 1-MCP detectado en nuestros experimentos puede ser debido a que al no percibir el fruto la presencia de ET, no se induzca el mecanismo de autoinhibición de su propia síntesis, y continúe la producción de ET por encima de los niveles normales de los controles. Este efecto de la

inhibición de la acción del ET en su propia síntesis ya se ha descrito anteriormente en frutos de otras variedades (Lafuente *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 2005). Sin embargo, también cabría otra explicación, ya que al inhibir el 1-MCP la percepción del ET, podría ser que no se indujeran los mecanismos de defensa del fruto mediados por esta hormona, lo que supondría un rápido desarrollo del hongo, que sería el causante de la sobreproducción del ET.

Los resultados obtenidos mediante hibridación Northern muestran que, en general, los genes que sufren inducción por el tratamiento con ET, no se inducen o incluso se reprimen por el tratamiento con 1-MCP (Figura 41, Figura 42, Figura 43 y). Estos resultados sugieren que el 1-MCP produce una inactivación de las respuestas de defensa mediadas por ET en los frutos cítricos y confirma la implicación de esta hormona en la expresión de genes relacionados con diferentes aspectos de la respuesta del fruto cítrico a la infección.

4.2. Estudio de la inducción de la síntesis de etileno durante la infección por anotación funcional.

El estudio de la anotación funcional de nuestros resultados indica que entre los procesos biológicos sobrerrepresentados durante la infección respecto a la herida se encuentran los “procesos metabólicos de la metionina” (Tabla 14). Este resultado fue además apoyado por los obtenidos mediante el uso de la herramienta de visualización de rutas, que mostraron conjuntamente a las rutas de “síntesis de ET a partir de metionina”, “ciclo de la metionina” y “ciclo de SAM”, con expresión diferencial inducida durante el proceso de infección (Figura 35).

La elaboración de las tres bibliotecas de cDNA, RindPdig24, PostharvP1 y RindPdigS permitió la obtención de ESTs correspondientes a varios genes relacionados con el ciclo de la metionina y el ciclo de SAM. De hecho, uno de los unigenes más abundantes en RindPdig24 y PostharvP1 es una S-adenosilmetionina sintetasa 2 (*SAMS2*) implicada en la síntesis de S-adenosilmetionina (Tabla 8). El análisis Northern de estos genes ha permitido hacer un estudio de su expresión en respuesta a la herida, la infección y el tratamiento con ET (Figura 45). Estos resultados muestran diversidad en los cambios de expresión como respuesta a los diferentes tratamientos, lo que sugiere una complejidad en la regulación de

la expresión de los genes implicados en el ciclo de la metionina y el ciclo de SAM. Sin embargo, se puede decir que, además de *CsACS1*, *CsACS2* y *CsACO*, solamente *SAMS2* parece inducirse durante la infección, lo que otorga a estos genes una mayor importancia en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la biosíntesis de ET durante la infección por hongos del género *Penicillium*.

Debido a su importancia en la biosíntesis de ET, se estudiaron los cambios de expresión de ***CsACS1***, ***CsACS2*** y ***CsACO*** en frutos mandarina 'Clemenules' en respuesta a herida y a la infección con *P. digitatum*. Hasta la actualidad estos son los únicos genes que codifican las enzimas ACS y ACO aislados en frutos cítricos por diferentes grupos de investigación (Mullins *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2005), aunque no se puede descartar la posibilidad de que haya algún gen más implicado. De hecho, en los diferentes proyectos internacionales de genómica de cítricos se han identificado diferentes ESTs que corresponden a nuevos genes que presuntamente codifican enzimas de estas familias.

Resultados previos en naranjas 'Navelate' demostraron que durante el desarrollo del daño por frío de los frutos se produce una elevada expresión de *CsACS1* (Zacarias *et al.*, 2003). Nuestro grupo también demostró que la infección de estos frutos por *P. digitatum* inducía la expresión de *CsACS1* y que esta expresión precedía a la de *CsACS2*, pero que es *CsACS2* el que tenía un patrón de expresión que mejor se correlacionaba con la producción de ET (Marcos *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis en mandarinas 'Clemenules' coinciden con los obtenidos en naranjas 'Navelate', pero además aportan información adicional sobre la expresión de los genes implicados en la síntesis de ET a tiempos cortos (Figura 17). Se ha observado que, en respuesta a herida, se produce un pico de expresión muy temprano de *CsACS2*, a las 8 horas, y otro de *CsACS1* a las 16 horas. Paralelamente, se realizó un estudio de la evolución de la producción de ET (Figura 16). De esta manera se ha podido comprobar que esta expresión temprana de *CsACS1* y *CsACS2* no se correlaciona con un aumento en la producción de ET del fruto, lo que sugiere la existencia de algún tipo de regulación postranscripcional de estos genes. Estudios realizados con *A. thaliana* proponen que la actividad de ACS está regulada a nivel post-traducciona, y que este mecanismo de regulación es importante en la biosíntesis de ET (Woeste *et al.*, 1999; Chae y Kieber, 2005).

Por otro lado, los resultados también muestran una expresión temprana de CsACO en respuesta a la herida, que prácticamente desaparece a las 48 horas, pero que en el caso de frutos infectados se solapa con la expresión debida a la infección por el hongo, que comenzaría entre las 16 y 24 horas. Estos resultados sugieren que la producción de ET de frutos de mandarina 'Clemenules' debida a la herida y a la infección por *P. digitatum* no está regulada únicamente por los cambios de expresión de CsACS1, CsACS2 y CsACO, lo que implica la posible existencia de otros genes de estas mismas familias génicas no descritos hasta el momento, o bien una regulación post-traducciona posterior de los enzimas codificados.

Seguidamente se realizó un estudio de los cambios en la expresión de CsACS1, CsACS2 y CsACO debido a la inoculación de los hongos patógenos *P. digitatum* y *P. italicum*, y no patógenos *P. expansum* y *P. brevicompactum*, en naranjas 'Navelate' para caracterizar los cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ET como respuesta a la presencia de diferentes hongos del género *Penicillium* (Figura 51). Los resultados mostraron que CsACS1, CsACS2 y CsACO se expresan en respuesta tanto a hongos patógenos como no patógenos. Sin embargo, en el caso de *P. digitatum* y *P. italicum* los niveles de expresión son mayores y más tempranos que en el caso de *P. expansum* y *P. brevicompactum*, donde la expresión empieza a observarse a las 48 o 72 horas. Estos resultados sugieren que la infección por hongos patógenos no se debe a un retraso en la expresión de la respuesta mediada por ET respecto a los no patógenos, si no más bien, a que los hongos no patógenos del género *Penicillium* no tienen la capacidad de infectar al fruto, por lo que éste no requiere la inducción temprana de los mecanismos de defensa, al menos de aquellos mediados por la presencia de ET, tal como se ha sugerido para el caso de la respuesta de otros genes implicados en la síntesis de enzimas relacionadas con el metabolismo secundario (apartado 3.5).

4.3. ¿Está implicado el etileno en la respuesta de defensa del fruto durante la infección?

Como se ha descrito anteriormente, nuestros resultados indican que la infección supone en frutos cítricos un cambio en su expresión génica, dirigido preferencialmente a la activación de genes relacionados con rutas del metabolismo secundario (Tabla 14 y Tabla 15). Por otro lado,

hemos estudiado cómo los frutos cítricos activan la biosíntesis del ET cuando son atacados por *P. digitatum* (Figura 16). Es, por tanto, apropiado analizar hasta qué punto el ET puede estar implicado en el redireccionamiento del metabolismo del fruto durante el proceso de infección.

La Tabla 5 muestra cómo los unigenes más representados de RindPdigS presentan diferentes perfiles de expresión en las diferentes condiciones de estudio. El patrón de expresión más frecuente consiste en una alta inducción por infección, y en menor medida, pero también significativa, por herida y ET. Este es el caso de varios genes con homología a una proteína con dominio de unión a FAD (P-03), a una DAHP sintasa (*DAHP*) (P-01), a una ACC oxidada (*ACO*) (P-07) y a una proteína embrionaria abundante (*EMB*) (P-10). Otros genes muestran una mayor inducción en respuesta a ET, como un gen con homología a cistinosina (*CTNS*) (P-04) u otro gen con homología con una proteína de la familia de las ciclasas (*CFP*) (P-14). Estos resultados vuelven a sugerir la implicación del ET en la activación de procesos que se inducen durante la respuesta a la infección.

Por otro lado, los estudios de la anotación funcional a partir de los cambios de expresión génica en respuesta al tratamiento con ET, muestra que la aplicación exógena de esta hormona no supone la inducción ni represión de ningún proceso biológico (Tabla 15). Sin embargo, está descrito que el ET tiene un papel específico en la inducción de los procesos celulares implicados en las respuestas de defensa de las plantas a la infección (Broekaert *et al.*, 2006). Diferentes trabajos han sugerido que esta hormona induce en las plantas la expresión de proteínas PR, como β -1,3-glucanasas (PR-2), quitinasas (PR-3 y PR-4) y defensinas (PR-12) (Ohme-Takagi y Shinshi, 1990; Eyal *et al.*, 1993; Penninckx *et al.*, 1996; Thomma *et al.*, 2002a; Chakravarthy *et al.*, 2003). Además, el ET juega un papel importante en la inducción de compuestos del metabolismo secundario con actividad antimicrobiana, también llamados fitoalexinas, aunque su actuación parece ser dependiente del tipo de fitoalexina y de la ruta metabólica implicada (Broekaert *et al.*, 2006). También se ha estudiado, aunque en menor medida, la implicación del ET en la formación de barreras estructurales frente a la entrada de patógenos (Ecker y Davis, 1987). El endurecimiento de la pared celular mediante la acumulación de proteínas ricas en hidroxiprolina está inducida por la aplicación de esta hormona (Esquerre-Tugaye *et al.*, 1979). Un factor a tener en cuenta es la

importancia de la interacción del ET con otras hormonas vegetales para la determinación de la respuesta global del fruto a la infección por un determinado patógeno (Wang *et al.*, 2002). Hay estudios que sugieren que las rutas implicadas en las respuestas de defensa de las plantas están controladas por una compleja red de señalización en la que están implicadas no sólo el ET, JA, SA y ABA, sino también otras hormonas menos estudiadas, como las giberelinas, las citoquininas o los brasinosteroides (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Así, aunque los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la inhibición de la percepción del ET por los frutos cítricos aumenta la susceptibilidad de los mismos al desarrollo de la infección causada por *P. digitatum*, lo que sugiere la implicación directa de esta hormona en la inducción de respuestas de defensa de los frutos durante la infección, no es descartable la participación de otras hormonas en la regulación de estas respuestas.

En cada una de las aproximaciones realizadas para estudiar el perfil transcripcional de los frutos cítricos en respuesta a la infección hemos intentado conocer qué fracción de los genes que se inducen o reprimen durante la infección tienen una expresión mediada por la presencia de ET. Mediante la realización de diagramas de Venn se ha estudiado la respuesta de los genes presentes en la macro- y en la micromatriz por el tratamiento con ET, herida e infección por *P. digitatum* con respecto a aire (Figura 23 y Figura 33). Gracias a estos estudios se ha observado que casi la mitad de los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a la infección, también modifican su expresión en respuesta a ET. Estos diagramas no reflejan, sin embargo, la presencia de genes con patrones de expresión más complejos todavía, con inducción en alguna/s condición/es y represión en otra/s. Dada la implicación del ET como molécula señalizadora de la respuesta a la infección, es de prever la presencia de genes en el fruto cuya expresión está mediada por la presencia de esta hormona, y por tanto inducida o reprimida simultáneamente por el ET y la infección. La hibridación Northern permitió detectar, sin embargo, la presencia de genes relacionados con la respuesta del fruto a la infección que muestran diferentes comportamientos en respuesta al tratamiento con ET (Figura 47 y Figura 48). De este modo se observaron, tanto en naranjas 'Navelate' como en mandarinas 'Clemenules', genes que se inducen o reprimen por ET e infección simultáneamente, pero también otros genes que se inducen por ET y sin embargo se reprimen durante la infección, y al revés. Los resultados obtenidos sugieren la implicación de esta hormona en el control de la

expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta de los frutos cítricos a la infección por *P. digitatum*. Sin embargo, los diferentes patrones de expresión obtenidos en cada una de las aproximaciones realizadas, reflejan la complejidad de los mecanismos de regulación de la expresión génica en esta respuesta, y sugieren la implicación de otras moléculas de señalización en este proceso.

El estudio a nivel particular de la expresión de genes implicados en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario mediante hibridación Northern confirmó que parte de ellos tienen una expresión mediada por la presencia de ET. De los genes implicados en la síntesis de aminoácidos precursores del metabolismo secundario se observó que un gen con homología a *DAHP*, muestra inducción por la aplicación de ET en naranjas 'Navelate', pero no en mandarinas 'Clemenules' (Figura 41). Este es un ejemplo de disparidad de resultados entre diferentes frutos cítricos que se ha observado en varias ocasiones. También puede deberse a un "efecto campaña", ya que, como se ha observado en los ejemplos de la Figura 46, en cada muestreo existen factores que condicionan en mayor o menor grado la expresión de los genes.

Sobre el efecto del ET en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides, en los estudios por hibridación Northern se observa la expresión de un gen con homología a *PAL* que no muestra inducción por la aplicación de ET (Figura 42). Este resultado concuerda con los resultados de hibridación obtenidos en las micromatrices, donde hay presentes dos unigenes con homología a *PAL* (6764 y C02002A11) con un nivel bajo de expresión en infección (véase material adicional). Sin embargo, los resultados de hibridación de las macromatrices muestran la presencia de un unigen con homología a *PAL* que se induce por ET. Este resultado coincide con los obtenidos en trabajos realizados por nuestro grupo que indicaron una inducción de la expresión de un gen con homología a *PAL* por efecto del pretratamiento con ET en naranjas 'Navelate' (Marcos *et al.*, 2005). También se ha observado que el tratamiento de frutos cítricos con ET aumenta transitoriamente la actividad *PAL* y produce una reducción del daño por frío en frutos sometidos a bajas temperaturas (Lafuente *et al.*, 2001). Otros genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides, como acetiltransferasa (*AT*) o UDP-glucosil transferasa (*UGT*) han mostrado una clara inducción por ET (Figura 42). Sin embargo, otros genes de la ruta de fenilpropanoides, como los que codifican dos metiltransferasas (*COMT* y *CaOMT*) no muestran una

inducción por ET (Figura 42). Estudios sobre cambios en el contenido y en la biosíntesis de fitoalexinas en frutos de banana detectaron que el tratamiento con ET induce la expresión de *PAL* y la producción de ciertos fenilpropanoides (Kamo y Hirai, 2000). En el caso de frutos cítricos, la aplicación en pomelos de *C. oleophilla* como agente biocontrol supone en los frutos la inducción de la síntesis de ET, aumentando la actividad *PAL*, la acumulación de ciertas fitoalexinas, como la umbeliferona, la escoparona y la escopoletina, y la expresión de genes que codifican una quitinasa y una β -1,3-glucanasa, resultando en una menor incidencia de la infección por *P. digitatum* (Droby *et al.*, 2002).

En cuanto a genes relacionados con el metabolismo de alcaloides, también se ha detectado disparidad en su expresión como respuesta al tratamiento con ET (Figura 43). En las hibridaciones realizadas con naranjas 'Navelate', se observa que dos genes, con homología a *TR* y a *BBE* (*BBE-2*), están inducidos por ET, sin embargo, el resto de genes estudiados relacionados con el metabolismo de alcaloides, incluyendo otro gen con homología a *BBE* (*BBE-1*), no sufren inducción por el tratamiento con esta hormona. Estos resultados parecen indicar que, en general, la inducción de genes relacionados con el metabolismo de alcaloides ocurre por una vía independiente de ET.

Por otro lado, los resultados sugieren que el metabolismo de isoprenoides y derivados de isoprenoides está inducido en algún punto de la ruta por la aplicación de ET, como en el caso de *GcpE* o *DXS*, cuyos enzimas están implicados en la síntesis de IPP a partir de metileritritol (). Estos resultados confirman los obtenidos en el análisis de anotación funcional en el que se observa la inducción de la ruta del MEP por ET (Figura 39).

En resumen, los resultados obtenidos parecen concordar con la idea general de que la función del ET en la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos durante la infección es dependiente del tipo de compuesto y de la ruta metabólica implicada (Broekaert *et al.*, 2006).

Es probable que la inducción de respuestas de defensa mediada por la ruta de señalización del ET no sea del tipo "todo o nada", sino que el nivel de ET constituya uno de los factores implicados en la respuesta final, siendo su papel más relevante en unos casos que en otros. Por ejemplo, se ha visto que concentraciones moderadas de ET estimulan la producción

de la fitoalexina β -tujaplicina en cultivos celulares de *Cupressus lusitanica*, sin embargo el exceso de ET reduce su síntesis por debajo incluso de los niveles de cultivos no tratados (Zhao *et al.*, 2004). Por este motivo, algunos autores sugieren que la importancia de la concentración de ET en el nivel, o incluso en la dirección, de la respuesta de defensa de las plantas, puede haber conducido a la evolución de patógenos productores de ET. Estos patógenos, como *P. digitatum*, serían capaces de evitar o alterar las respuestas de defensa de las plantas al interferir en los niveles endógenos de ET (Aloni *et al.*, 1998).

Por último, cabe estudiar la implicación del ET en la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas PR. pues son el grupo más extensamente estudiado de proteínas implicadas en la respuesta de defensa relacionadas con el ET (Broekaert *et al.*, 2000). Las proteínas PR constituyen un amplio grupo de proteínas producidas tanto local como sistémicamente en la respuesta a estrés biótico. En los últimos años se han realizado muchos estudios que demuestran la implicación del ET en la regulación de la expresión de diferentes clases de genes *PR* (Van Loon *et al.*, 2006a). Los resultados obtenidos en el análisis de los resultados de las micromatrices han mostrado que el 26% de los genes que codifican proteínas PR se inducen en respuesta a la infección, de las cuales, más de la mitad también lo hace por ET (Tabla 18). Sin embargo, los niveles de expresión son relativamente bajos, y representan una respuesta minoritaria si la comparamos con la inducción de rutas del metabolismo secundario que, con mucho, dominan la expresión diferencial de respuesta a la infección.

El estudio de la expresión génica de frutos cítricos durante la infección por el hongo *P. digitatum*, mediante el empleo de técnicas de alto rendimiento, nos ha permitido profundizar en la caracterización de las respuestas de defensa de los frutos en respuesta a la infección por hongos del género *Penicillium*. Los resultados obtenidos por las diferentes aproximaciones muestran una inducción de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides, isoprenoides y alcaloides, lo que sugiere un papel relevante de estos compuestos del metabolismo secundario durante la respuesta a la infección. Por otra parte, tanto la producción de ET, como la inducción de la expresión de los genes relacionados con su biosíntesis y la respuesta de genes del fruto cítrico al tratamiento con dicha hormona, sugieren que el ET desempeña un papel

importante en la señalización de, al menos, parte de las respuestas del fruto cítrico durante dicho proceso.

CONCLUSIONES

1. La construcción de dos bibliotecas de cDNA a partir de frutos cítricos heridos e infectados con *P. digitatum* y su análisis, junto al de una tercera biblioteca enriquecida en genes relacionados con la infección, ha permitido obtener una visión global de los genes que se expresan en el fruto durante estos procesos. Se han secuenciado un total de 2.505 clones distintos, que se agrupan en 1.941 unigenes. El 25% del total de clones (626) no tienen homología en las bases de datos públicas. Por otra parte, el 26% del conjunto de estos unigenes no están presentes en ninguna otra biblioteca de cDNA del CFGP. Estos datos indican que la respuesta del fruto cítrico a la infección presenta particularidades importantes que son relativamente desconocidas.
2. La hibridación de macromatrices y micromatrices de cDNA, así como la confirmación de los resultados mediante hibridación Northern, ha permitido la identificación de un conjunto amplio y variado de genes con expresión diferencial durante los procesos estudiados, en especial durante la infección por *P. digitatum*. Algunos ejemplos significativos son los genes que codifican una DAHP sintasa, dos citocromos P450, 79A1 y 79A2, una nectarina 5, y una ACC oxidasa.
3. La aplicación de distintas herramientas informáticas de anotación funcional de los resultados ha permitido comprobar que el fruto cítrico muestra una inducción de las rutas del DAHP/siquimato/corismato (precursores de aminoácidos aromáticos) y de la síntesis de IPP (precursor de isoprenoides) como respuesta a la infección, ambas implicadas en el desvío del metabolismo primario hacia la biosíntesis de precursores del metabolismo secundario. Ello se enmarca en una inducción de rutas metabólicas secundarias de biosíntesis de compuestos relacionados con defensa, lo que sugiere un redireccionamiento del metabolismo del fruto cítrico como respuesta a la infección por *P. digitatum*.
4. La ruta de síntesis de IPP se induce durante la infección específicamente por la vía cloroplástica del metileritritolfosfato, permaneciendo reprimida la vía citoplásmica del mevalonato.
5. La infección induce en frutos cítricos la expresión de genes relacionados con el metabolismo de todos los tipos mayoritarios de alcaloides. La especificidad de esta inducción con la infección es muy marcada en

algunos casos, como en el de un gen que codifica una cafeína sintasa implicada en la biosíntesis de alcaloides derivados de purina.

6. El metabolismo de fenilpropanoides se induce por herida y en mayor medida en la respuesta a la infección. Los análisis realizados han mostrado la expresión diferencial de genes implicados en la biosíntesis de fenilpropanoides, incluyendo *PAL*, clave en la biosíntesis de fenilpropanoides, pero también distintas O-metil transferasas (*OMT*) o citocromos P450.
7. La inducción de muerte celular en la planta, así como un aumento del estrés oxidativo, son dos características de la respuesta incompatible frente a la infección por microorganismos biótropos que se asocian a una defensa eficaz de la planta. Sin embargo, durante la interacción entre el fruto cítrico y *P. digitatum*, un hongo necrotrofo, se observa una inducción de estos procesos, posiblemente debida a la acción del propio patógeno.
8. Mediante el estudio de la expresión de genes implicados en los últimos pasos de la síntesis de ET en frutos de mandarina, hemos demostrado una marcada regulación temporal y diferencial. Se produce una inducción temprana de *CsACS1*, *CsACS2* y *CsACO* en respuesta a herida, que no se correlaciona con un aumento en la producción de ET del fruto, lo que confirmaría la existencia de mecanismos de regulación postranscripcional de estos genes.
9. Los resultados de hibridación con macromatrices y micromatrices han mostrado que el 50% y el 47%, respectivamente, de los genes que se inducen en respuesta a la infección no se inducen por herida. Además, el 46% y el 45% de los genes que se inducen por la infección también lo hacen por el tratamiento con ET, lo que indica que aunque esta hormona es un mediador de una parte importante de la respuesta a la infección, existen otros mecanismos adicionales de regulación.
10. El patrón general de expresión de los genes estudiados en respuesta a la infección por diferentes hongos del género *Penicillium* muestra una inducción más rápida e intensa frente a los patógenos *P. digitatum* y *P. italicum*, lo que sugiere la activación por parte del fruto de una respuesta

que en cualquier caso parece ineficaz. Sin embargo, existen desviaciones significativas de este patrón general. Así, los resultados con *PAL* sugieren la capacidad de *P. digitatum* de inhibir parte de la respuesta de defensa del fruto. Los resultados con otros genes, como *GcpE* y *DCN* sugieren, además, la capacidad por parte del fruto cítrico de inducir en ciertos casos respuestas de defensa que serían eficaces frente a la presencia de un organismo no patógeno. Estos resultados, en general, muestran una respuesta diferenciada del fruto cítrico frente a los hongos estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, G. B., Morgan, P. W., Saltveit, M. E.** (1992). Ethylene in plant biology. Academic Press. San Diego, USA.
- Abougoukh, A. A. y Labavitch, J. M.** (1983). The invivo role of bartlett pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiological Plant Pathology* 23: 123-135.
- Achilea, O., Chalutz, E., Fuchs, Y., Rot, I.** (1985a). Ethylene biosynthesis and related physiological-changes in *Penicillium digitatum*-infected grapefruit (*Citrus paradisi*). *Physiological Plant Pathology* 26: 125-134.
- Achilea, O., Fuchs, Y., Chalutz, E., Rot, I.** (1985b). The contribution of host and pathogen to ethylene biosynthesis in *Penicillium digitatum*-infected citrus fruit. *Physiological Plant Pathology* 27: 55-63.
- Adie, B. A., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M. M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J. J., Schmelz, E. A., Solano, R.** (2007a). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1665-1681.
- Adie, B., Chico, J., Rubio-Somoza, I., Solano, R.** (2007b). Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 160-177.
- Afek, U., Orenstein, J., Carmeli, S., Rodov, V., Joseph, M. B.** (1999). Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. *Phytochemistry* 50: 1129-1132.
- Agrios, G. N.** (2007). Plant Pathology. Academic Press. San Diego, USA.
- Aharoni, A. y Vorst, O.** (2002). DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology* 48: 99-118.
- Al-Shahrour, F., Mínguez, P., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Dopazo, J.** (2005). BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Research* 33: 460-464.
- Alba, R., Fei, Z. J., Payton, P., Liu, Y., Moore, S. L., Debbie, P., Cohn, J., D'Ascenzo, M., Gordon, J. S., Rose, J. K. C. et al.** (2004). ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant Journal* 39: 697-714.
- Alberola, T. M., García-Martínez, J., Antúnez, O., Viladevall, L., Barceló, A., Arino, J., Pérez-Ortín, J. E.** (2004). A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *International Microbiology* 7: 199-206.
- Alfárez, F., Lluch, Y., Burns, J. K.** (2008). Phospholipase A2 and postharvest peel pitting in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 49: 69-76.
- Allison, D. B., Cui, X. Q., Page, G. P., Sabripour, M.** (2006). Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nature Reviews Genetics* 7: 55-65.

- Aloni, R., Wolf, A., Feigenbaum, P., Avni, A., Klee, H. J.** (1998). The never ripe mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls on tomato stems. *Plant Physiology* 117: 841-849.
- Alonso, J. M., García-Martínez, J. L., Chamarro, J.** (1992). 2-Dimensional gel-electrophoresis patterns of total, *in vivo* labeled and *in vitro* translated polypeptides from orange flavedo during maturation and following ethylene treatment. *Physiologia Plantarum* 85: 147-156.
- Alonso, J. M. y Stepanova, A. N.** (2004). The ethylene signaling pathway. *Science* 306: 1513-1515.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W., Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anderson, J. P., Badruzsafari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Ebert, P. R., Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460-3479.
- Andrews, J. H.** (1992). Biological-control in the Phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635.
- Aneja, M. y Gianfagna, T.** (2001). Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis perniciosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 13-16.
- Angioni, A., Cabras, P., D'hallewin, G., Pirisi, F. M., Reniero, F., Schirra, M.** (1998). Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in citrus fruit. *Phytochemistry* 47: 1521-1525.
- Anterola, A. M. y Lewis, N. G.** (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.
- Apostol, I., Heinstein, P. F., Low, P. S.** (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* 90 (1): 109-116.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Arcas, M. C., Botía, J. M., Ortuño, A. M., Del Río, J. A.** (2000). UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *European Journal of Plant Pathology* 106: 617-622.
- Ardi, R., Kobiler, I., Jacoby, B., Keen, N. T., Prusky, D.** (1998). Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 269-285.

- Ariza, M. R., Larsen, T. O., Petersen, B. O., Duus, J. O., Barrero, A. F.** (2002). *Penicillium digitatum* metabolites on synthetic media and citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6361-6365.
- Arras, G.** (1996). Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology* 8: 191-198.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Hofte, M.** (2008). Global switches and fine-tuning--ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 709-719.
- Audenaert, K., De Meyer, G. B., Hofte, M. M.** (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128: 491-501.
- Ayabe, S. i. y Akashi, T.** (2006). Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Reviews* 5: 271-282.
- Baker, C. J. y Orlandi, E. W.** (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321.
- Ballester, A. R.** (2007). Resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de los frutos cítricos. Bases moleculares y metabolismo de fenilpropanoides. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Ballester, A. R., Lafuente, M. T., González-Candelas, L.** (2006). Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology* 39: 115-124.
- Barkai-Golan, R.** (1986). Detection of polygalacturonase enzymes in fruits of both a normal tomato and its nonripening *Nor* mutant infected with *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology* 76: 42-45.
- Barkai-Golan, R.** (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Barkai-Golan, R., Kahan, R. S., Padova, R.** (1969). Synergistic effects of gamma radiation and heat on development of *Penicillium digitatum* *in vitro* and in stored citrus fruits. *Phytopathology* 59: 922-4.
- Barmore, C. R. y Brown, G. E.** (1979). Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus-fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 69: 675-678.
- Barry, C. S., Llop-Tous, M. I., Grierson, D.** (2000). The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology*. 123: 979-986.
- Baysal, T. y Demirdoven, A.** (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 491-496.

- Beudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., Giraudat, J.** (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1116.
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, N. J., Hahlbrock, K.** (2005). Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*. 138: 1058-1070.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J. J., Carmeli, S.** (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1217-1221.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y.** (2000). On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 25: 60-83.
- Bennett, J. W. y Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.
- Beno-Moualem, D. y Prusky, D.** (2000). Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90: 553-559.
- Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R., Staskawicz, B. J.** (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 372-378.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R.** (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal* 29: 23-32.
- 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: 763-770.
- Biale, J. B.** (1940). Effect of emanations from several species of fungi on respiration and color development of citrus fruits. *Science* 91: 458-459.
- Biale, J. B. y Shepheid, A. D.** (1941). Respiration of citrus fruits in relation to metabolism of fungi. I. Effects of emanations of *Penicillium digitatum*, Sacc, on lemons. *American Journal of Botany* 28: 263-270.
- Bittner, N., Butow, R., DeRisi, J., Diehn, N., Everwine, J., Epstein, C., Glynne, R., Grimmond, S., Ideker, T., Kacharmina, J. E., Katsabanis, S., Khan, J., Lee, J., Liu, C. L., Marciano, P., Marincola, F. M., McIntosh, T., Monte, D., Pollac, J. R., Rhodius, V., Somerville, S., Tom, E., Wang, E., Wei, J. S., Willhite, D., Ybarra, S.** (2003). Expression analysis of RNA. En: DNA microarrays: A molecular cloning manual. Bowtell, D. y Sambrook, J., eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 110-228.
- Bland, J. M. y Altman, D. G.** (1995). Multiple significance tests - the Bonferroni method .10. *British Medical Journal* 310: 170.

- Blankenship, S. M. y Dole, J. M.** (2003). 1-methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* 28: 1-25.
- Bleecker, A. B. y Kende, H.** (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 161-18.
- Blein, J. P., Coutos-Thevenot, P., Marion, D., Ponchet, M.** (2002). From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science* 7: 293-296.
- Boch, J., Joardar, V., Gao, L., Robertson, T. L., Lim, M., Kunkel, B. N.** (2002). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Microbiology* 44: 73-88.
- Bonattera, A., Mari, M., Casalini, L., Montesinos, E.** (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology* 84: 93-104.
- Bos, L. y Parlevliet, J. E.** (1995). Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review of Phytopathology* 33: 69-102.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., Matern, U.** (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews* 5: 293-308.
- Brendel, V., Kurtz, S., Walbot, V.** (2002). Comparative genomics of *Arabidopsis* and maize: prospects and limitations. *Genome Biology* 3: reviews 1005. 1-1005.
- Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H. B., Shijiang, Z., Newman, M., Shokat, K. M., Rietz, S., Parker, J., Mundy, J.** (2006). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant Journal* 47: 532-546.
- Broekaert, W., Terras, F. R. G., Cammue, B.** (2000). Induced and preformed antimicrobial proteins. *En: Mechanisms of resistance to plant disease*. Slusarenko, A. J., Fraser, R. S. S., Van Loon, L. C., eds. pp 371-478.
- Broekaert, W. F., Delaure, S. L., De Bolle, M. F. C., Cammue, B. P. A.** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 44: 393-416.
- Brown, A. E. y Swinburne, T. R.** (1980). The Resistance of immature Banana fruits to Anthracnose [*Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx.]. *Journal of Phytopathology* 99: 70-80.
- Brown, G. E.** (1975). Factors affecting postharvest development of *Collectotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. *Phytopathology* 65: 404-409.
- Brown, G. E. y Hyoung, S. L.** (1993). Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* .

- Buchanan-Wollaston, V.** (1994). Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus* (Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein). *Plant Physiology*. 105: 839-846.
- Bulow, L., Chindler, M., Ehl, R.** (2007). PathoPlant: a platform for microarray expression data to analyze co-regulated genes involved in plant defense responses *Nucleic Acids Research*. 35: D841-D845.
- Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A., Ruberto, G.** (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* 43: 73-79.
- Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., Atanassova, R.** (2003). A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 2165-2180.
- Cantu, D., Vicente, A. R., Greve, L. C., Dewey, F. M., Bennett, A. B., Labavitch, J. M., Powell, A. L. T.** (2008). The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 859-864.
- Carrera, E. y Prat, S.** (1998). Expression of the Arabidopsis *abi1-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *The Plant Journal* 15: 765-771.
- Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G., Carpin, S.** (2002). Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 1033-1042.
- Casado-Díaz, A., Encinas-Villarejo, S., de los Santos, B., Schilirò, E., Yubero-Serrano, E. M., Amil-Ruiz, F., Pocovi, M. I., Pliego-Alfaro, F., Dorado, G., Rey, M. et al.** (2006). Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiologia Plantarum* 128: 633-650.
- Chae, H. S. y Kieber, J. J.** (2005). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science* 10: 291-296.
- Chakravarthy, S., Tuori, R. P., D'Ascenzo, M. D., Fobert, P. R., Despres, C., Martin, G. B.** (2003). The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* 15: 3033-3050.
- Chandra, S., Heinstein, P. F., Low, P. S.** (1996). Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiology*. 110: 979-986.
- Chappell, J.** (1995). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology*. 107: 1-6.
- Chen, W. Q., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H. S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G. Z., Whitham, S. A. et al.** (2002). Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.

- Cheong, J. J. y Choi, Y. D.** (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19: 409-413.
- Chini, A., Grant, J. J., Seki, M., Shinozaki, K., Loake, G. J.** (2004). Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *The Plant Journal* 38: 810-822.
- Choi, D., Kim, H. M., Yun, H. K., Park, J. A., Kim, W. T., Bok, S. H.** (1996). Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and Tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*. 112: 353-359.
- Cohen, S., Cohen, E., Schiffmannadel, M., Volcani, Z.** (1978). Respiration rate and ethylene evolution of lemon infected by *Pseudomonas syringae*. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* 91: 355-358.
- Cohen, Y., Gisi, U., Niderman, T.** (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83: 1054-1062.
- Darvill, A. G. y Albersheim, P.** (1984). Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 243-275.
- Dauveny, H. A. y Pepin, H. S.** (1977). Evaluation of strawberry clones for fruit rot resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102: 431-435.
- Davidse, L. C.** (1986). Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology* 24: 43-65.
- De Gara, L., De Pinto, M. C., Tommasi, F.** (2003). The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 863-870.
- De Torres-Zabala, M., Truma, W., Bennet, M., Lafforgue, G., Mansfield, J. W.** (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo Journal* 26: 1434-1443.
- Del Río, J. A., Arcas, M. C., Benavente-García, O., Ortuño, A.** (1998). Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum Species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4423-4428.
- Del Río, J. A., Gómez, P., Baidez, A. G., Arcas, M. C., Botía, J. M., Ortuño, A.** (2004). Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1913-1917.
- Delledonne, M., Xia, Y. J., Dixon, R. A., Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.

- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C.** (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13454-13459.
- Dempsey, D. A., Shah, J., Klessig, D. F.** (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 547-575.
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M., Hofte, H.** (1998). Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays. *The Plant Journal* 14: 643-652.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. et al.** (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6025-6030.
- Díaz, J., ten Have, A., van Kan, J. A. L.** (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 129: 1341-1351.
- Dixon, R. A. y Paiva, N. L.** (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dixon, R. A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., Wang, L.** (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C. L., Wisniewski, M.** (1993a). Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathology* 42: 418-424.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C. L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D., Chalutz, E.** (1993b). Pilot testing of *Pichia Guilliermondii*. A biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control* 3: 47-52.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E., Porat, R.** (2002). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* 92: 393-399.
- Durrant, W. E. y Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- Duval, M., Hsieh, T.-F., Kim, S. Y., Thomas, T. L.** (2002). Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* 50: 237-248.

- Ecker, J. R. y Davis, R. W.** (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 5202-5206.
- Eckert, J. W.** (1978). Pathological disease of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Biochemistry* 2: 243-250.
- Eckert, J. W. y Ogawa, J. M.** (1985). The chemical control of postharvest diseases. Sub-Tropical and Tropical Fruits. *Annual Review of Phytopathology* 23: 421-454.
- Eckert, J. W. y Ratnayake, M.** (1994). Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum*-Conidia. *Phytopathology* 84: 746-750.
- Ehltling, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R., Werck-Reichhart, D. I.** (2006). Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews* 5: 239-270.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N.** (1994). Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 417-432.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Wilson, C. L.** (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 103-110.
- Elad, Y. y Evensen, K.** (1995). Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85: 637-643.
- Esquerre-Tugaye, M. T., Lafitte, C., Mazau, D., Toppan, A., Touze, A.** (1979). Cell surfaces in plant-microorganism interactions: II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiology*. 64: 320-326.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., Somssich, I. E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-206.
- Eulgem, T. y Somssich, I. E.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 366-371.
- Eyal, Y., Meller, Y., Lev-Yadun, S., Fluhr, R.** (1993). A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *The Plant Journal* 4: 225-234.
- Facchini, P. J.** (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 29-66.
- Facchini, P. J., Bird, D. A., St-Pierre, B.** (2004). Can Arabidopsis make complex alkaloids? *Trends in Plant Science* 9: 116-122.
- Fagoaga, C., Rodrigo, I., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J. J., Arnau, J., Pina, J. A., Navarro, L., Peña, L.** (2001). Increased tolerance to *Phytophthora*

- citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7: 175-185.
- Fajardo, J. E., McCollum, T. G., McDonald, R. E., Mayer, R. T.** (1998). Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biological Control* 13: 143-151.
- FAO.** (2007). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [On-line]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>.
- Fewell, A. M. y Roddick, J. G.** (1993). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chacocine. *Phytochemistry* 33: 323-328.
- Flor, H.** (1971). Current status of the gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G., Mauch-Mani, B.** (2005). Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? *Journal of Phytopathology* 153: 377-383.
- Fontecave, M., Atta, M., Mulliez, E.** (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 243-249.
- Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agustí, J., Alamar, S. Alos, E., Andres, F., Arribas, R., Beltrán, J. P., Berbel, A., Blazquez, M. A., Brumos, J., Canas, L. A., Cercos, M., Colmenero-Flores, J. M., Conesa, A., Establés, B., Gandía, M., García-Martínez, J. L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gomez, G., González-Candelas, L., Granell, A., Guerri, J., Lafuente, M. T., Madueno, F., Marcos, J. F., Marques, C., Martínez, F., Martínez-Godoy, M. A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallás, V., Perez-Amador, M. A., Perez-Valle, J., Pons C., Rodrigo, I., Rodriguez, P. L., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talón, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, Ch., Zacarías, L. Conejero, V.** (2005). Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology* 57: 375-391.
- Freile, M. L., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzaretí, V., Enriz, R. D.** (2003). Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia* 74: 702-705.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., 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: 436-442.
- Fukuda, H., Ogawa, T., Tanase, S.** (1993). Ethylene production by microorganisms. *Advances in Microbial Physiology, Vol 35* 35: 275-306.
- Gao, Z., Chen, Y. F., Randlett, M. D., Zhao, X. C., Findell, J. L., Kieber, J. J., Schaller, G. E.** (2003). Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 34725-34732.

- Geraats, B. P. J., Bakker, P. A. H. M., Laurence, C. B., Achuo, E. A., Hofte, M., Van Loon, L. C.** (2003). Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. *Phytopathology* 93: 813-821.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., McCourt, P.** (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Giordani, T., Natali, L., D'Ercole, A., Pugliesi, C., Fambrini, M., Vernieri, P., Vitagliano, C., Cavallini, A.** (1999). Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Molecular Biology* 39: 739-748.
- Girke, T., Todd, J., Ruuska, S., White, J., Benning, C., Ohlrogge, J.** (2000). Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiology*. 124: 1570-1581.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Metraux, J. P., Zhu, T., Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal* 34: 217-228.
- González-Candelas, L., Sánchez-Torres, P., Alamar, S., Establés, B., Ballester, A. R., Sánchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarías, L., Marcos, J. F., Lafuente, M. T., Forment, J., Granell, A.** (2005). Genomic approaches to postharvest biotic and abiotic stresses of citrus fruit. *Acta Horticulturae*.
- Govrin, E. y Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757.
- Gross, D. C. y Cody, Y. S.** (1985). Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 403-410.
- Gundlach, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M., 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 United States of America* 89: 2389-2393.
- Guo, H. y Ecker, J. R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 40-49.
- Gutterson, N. y Reuber, T. L.** (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 465-471.
- Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stocker, R. H. et al.** (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.

- Hall, A. E., Findell, J. L., Schaller, G. E., Sisler, E. C., Bleecker, A. B.** (2000). Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 123: 1449-1458.
- Hamer, D. H.** (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55: 913-951.
- Hammerschmidt, R.** (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77-84.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G.** (2000). Responses to plant pathogens. En: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L., eds. American Society of Plant Physiologists. Rockville -Maryland- USA, pp 1102-1156.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hancock, J. T., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., Neill, S. J.** (2002). Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 611-617.
- Harberd, N. P.** (2003). Botany: relieving DELLA restraint. *Science* 299: 1853-1854.
- Heath, M. C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 315-319.
- Hedden, P., Phillips, A. L., Rojas, M. C., Carrera, E., Tudzynski, B.** (2001). Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution? *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 319-331.
- Herraiz, T. y Galisteo, J.** (2003). Tetrahydro- β -carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7156-7161.
- Herrmann, K. M.** (1995). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*. 107: 7-12.
- Herrmann, K. M. y Weaver, L. M.** (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 473-503.
- Hoffman, T., Schmidt, J. S., Zheng, X. Y., Bent, A. F.** (1999). Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* 119: 935-949.
- Hoke, D. y Drager, B.** (2004). Calystegines in *Calystegia sepium* do not inhibit fungal growth and invertase activity but interact with plant invertase. *Plant Biology* 6: 206-213.
- Hopke, J., Donath, J., Blechert, S., Boland, W.** (1994). Herbivore-induced volatiles: the emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters*. 352: 146-150.

- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H., Money, N. P.** (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88: 11281-11284.
- Howell, J. T. y Davis, M. R.** (2005). Plant defense mechanisms against fungal pathogens: polygalacturonase inhibitor proteins. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 5-15.
- Huckelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45: 101-127.
- Ilag, L. y Curtis, R. W.** (1968). Production of ethylene by fungi. *Science* 159: 1357-1358.
- Ishiguro, S. y Nakamura, K.** (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and α -amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics MGG* 244: 563-571.
- Ismail, M. A. y Brown, G. E.** (1979). Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured "Valencia" orange flavedo. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104: 126-129.
- Jalali, B. L., Bhargava, S., Kamble, A.** (2006). Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. *Journal of Phytopathology* 154: 65-74.
- Jameson, P. E.** (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Regulation* 32: 369-380.
- Johnson, P. R. y Ecker, J. R.** (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review of Genetics* 32: 227-254.
- Kagi, J. H. R. y Schaffer, A.** (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27: 8509-8515.
- Kakkar, R. K. y Sawhney, V. K.** (2002). Polyamine research in plants – a changing perspective. *Physiologia Plantarum* 116: 281-292.
- Kamo, T. y Hirai, N.** (2000). Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64: 2089-2098.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Iki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., Hirakawa, M.** (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research* 34: 354-357.
- Katz, E., Lagunes, P. M., Riov, J., Weiss, D., Goldschmidt, E.** (2004). Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric citrus fruit. *Planta* 219: 243-252.
- Kavanagh, J. A. y Wood, R. K. S.** (1967). Role of wounds in infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc. *Annals of Applied Biology* 60: 375-383.

- Keith, B., Dong, X., Ausubel, F. M., Fink, G. R.** (1991). Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8821-8825.
- Kim, J. J., Benyehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., Carmeli, S.** (1991). Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiology* 97: 880-885.
- Kinay, P., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., Margosan, D. A., Smilanick, J. L.** (2007). Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection* 26: 647-656.
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P. et al.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8849-8855.
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Spinks, C. A., Worthington, P. A. et al.** (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology* 35: 349-372.
- Knogge, W.** (1996). Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722.
- Koltai, H. y Volpin, H.** (2003). Agricultural genomics: An approach to plant protection. *European Journal of Plant Pathology* 109: 101-108.
- Kretschmar, J. A. y Baumann, T. W.** (1999). Caffeine in Citrus flowers. *Phytochemistry* 52: 19-23.
- Krishna, P.** (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 289-297.
- Kunkel, B. N. y Brooks, D. M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 325-331.
- Kurosaki, F., Amin, M., Nishi, A.** (1986). Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. *Plant Pathology* 28: 359-370.
- Lafuente, M. T., Martínez-Téllez, M. A., Zacarías, L.** (1997). Abscisic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 494-502.
- Lafuente, M. T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M. A., Sánchez-Ballesta, M. T., Dupille, E.** (2001). Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 6020-6025.
- Lai, S., Lai, A., Stange, R. R., McCollum, T. G., Schirra, M.** (2003). Characterization of the wound-induced material in *Citrus paradisi* fruit peel by carbon-13 CP-MAS. *Phytochemistry* 63: 177-183.

- 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.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J.** (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology* 8: 298-300.
- Lawton, K. A., Potter, S. L., Uknes, S., Ryals, J.** (1994). Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent. *Plant Cell* 6: 581-588.
- Lee, M. L. T., Kuo, F. C., Whitmore, G. A., Sklar, J.** (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: Statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 9834-9839.
- LeNoble, M. E., Spollen, W. G., Sharp, R. E.** (2004). Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*. 55: 237-245.
- Leubner-Metzger, G. y Meins, F. J.** (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). *En: Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Datta, S. K. y Muthukrishnan, S., eds. pp 49-76.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Lichtenthaler, H. K.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47-65.
- Lisker, N., Cohen, L., Chalutz, E., Fuchs, Y.** (1983). Fungal infections suppress ethylene induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruits. *Physiological Plant Pathology* 22: 331-338.
- Lockhart, D. J., Dong, H. L., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C. W., Kobayashi, M., Horton, H. et al.** (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14: 1675-1680.
- Logemann, E., Wu, S. C., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, I. E., Hahlbrock, K.** (1995). Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *The Plant Journal* 8: 865-876.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E., Marcos, J. F.** (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 837-846.
- López-García, B., Veyrat, A., Pérez-Payá, E., González-Candelas, L., Marcos, J. F.** (2003). Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the

- fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 89: 163-170.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., Solano, R.** (2003). Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178.
- Lorenzo, O. y Solano, R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 532-540.
- Luchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Terao, T., Shinozaki, K.** (1996). Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNAs and analysis of the expression of the corresponding genes. *Plant and Cell Physiology* 37: 1073-1082.
- Luijendijk, T. J. C., van der Meijden, E., Verpoorte, R.** (1996). Involvement of strictosidine as a defensive chemical in *Catharanthus roseus*. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1355-1366.
- Lurie, S.** (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14: 257-269.
- Macarisin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., Drovny, S.** (2007). *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 97: 1491-1499.
- Mahalingam, R., Gomez-Buitrago, A., Eckardt, N., Shah, N., Guevara-Garcia, A., Day, P., Raina, R., Fedoroff, N. V.** (2003). Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis. *Genome Biology* 4.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Cameron, R. K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* 419: 399-403.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., Dietrich, R. A.** (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403-410.
- MAPYA.** (2007). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [On-line]. Disponible en: <http://www.mapya.es>.
- Marcos, J. F., González-Candelas, L., Zacarías, L.** (2005). Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany*. 56: 2183-2193.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Mandrin, J. F., Lichou, J., Larena, I., De Cal, M. A., Melgarejo, P., Usall, J.** (2007). Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1271-1277.
- Martin, J. T.** (1964). Role of cuticle in the defense against plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 2: 81-100.

- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C. C.-C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J. E., Mullineaux, P. M., Karpinski, S.** (2004). LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology*. 136: 2818-2830.
- Matoo, A. K. y Suttle, J. C.** (1991). The plant hormone ethylene. Academic Press. Boca Raton, Florida. USA.
- Mauch-Mani, B. y Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409-414.
- McCollum, T. G.** (2000). Defensive proteins in grapefruit flavedo. Proceedings of the *International Citrus Congress, IX Congress*: 1113-1116.
- McDonald, R. E., Miller, W. R., McCollum, T. G., Brown, G. E.** (1991). Thiabendazole and ilmazalil applied at 53C reduce chilling injury and decay of grapefruit. *HortScience* 26: 397-399.
- McDowell, J. M. y Dangl, J. L.** (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 79-82.
- Mehdy, M. C.** (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*. 105: 467-472.
- Mercke, P., Crock, J., Croteau, R., Brodelius, P. E.** (1999). Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369: 213-222.
- Meskiene, I., Bogre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstotter, M., Zwerger, K., Ammerer, G., Hirt, H.** (1998). MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 1938-1943.
- Metraux, J. P.** (2002). Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 7: 332-334.
- Mir, G., Domenech, J., Huguet, G., Guo, W. J., Goldsbrough, P., Atrian, S., Molinas, M.** (2004). A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 55: 2483-2493.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F. V.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Mohan, R. y Kolattukudy, P. E.** (1990). Differential activation of expression of a suberization-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato lines by elicitors of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology*. 92: 276-280.
- Mohr, P. G. y Cahill, D. M.** (2003). Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology* 30: 461-469.
- Mohr, P. y Cahill, D.** (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with

- Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional and Integrative Genomics* 7: 181-191.
- Montaner, D., Tarraga, J., Huerta-Cepas, J., Burguet, J., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Minguéz, P., Vera, J., Mukherjee, S., Valls, J. et al.** (2006). Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Research*. 34: W486-W491.
- Moriguchi, T., Kita, M., Hisada, S., Endo-Inagaki, T., Omura, M.** (1998). Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* 211: 221-227.
- Morrissey, J. P. y Osbourn, A. E.** (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 708-724.
- Mueller, L. A., Zhang, P., Rhee, S. Y.** (2003). AraCyc: a biochemical pathway database for Arabidopsis. *Plant Physiology*. 132: 453-460.
- Mueller, M. J.** (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100: 653-663.
- Muller, K. O., Meyer, G., Klinkowski, M.** (1939). Physiologic and genetic investigations on the potato resistance to *Phytophthora infestans*. *Naturwissenschaften* 27: 763-766.
- Mullins, E. D., McCollum, T. G., McDonald, R. E.** (2000). Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 155-164.
- Mullins, E. D., McCollum, T. G., McDonald, R. E.** (1999). Ethylene: a regulator of stress-induced ACC synthase activity in nonclimacteric fruit. *Physiologia Plantarum* 107: 1-7.
- Murphy, A. M., Pryce-Jones, E., Johnstone, K., Ashby, A. M.** (1997). Comparison of cytokinin production in vitro by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 53-65.
- Mysore, K., Tuori, R., Martin, G.** (2001). Arabidopsis genome sequence as a tool for functional genomics in tomato. *Genome Biology* 2: 1003.1-1003.4
- Nafussi, B., Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Peretz, J., Ozer, B. K., D'hallewin, G.** (2001). Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 107-113.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., Yoshida, S.** (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* 33: 887-898.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J. D. G.** (2006). A Plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439.

- Nicholson, R. L. y Hammerschmidt, R.** (1992). Phenolic-compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B. F., Dangl, J. L.** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37: 579-609.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H.** (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1: 192.
- Norman, E. G., Walton, A. B., Turpin, D. H.** (1994). Immediate activation of respiration in *Petroselinum crispum* L. in response to the *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* elicitor. *Plant Physiology*. 106: 1541-1546.
- Nugroho, L. H. y Verpoorte, R.** (2002). Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 105-125.
- Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., Abadias, M., Vinas, I.** (2002). Improved control of postharvest decay of pears by the combination of *Candida sake* (CPA-1) and ammonium molybdate. *Phytopathology* 92: 281-287.
- Nürberger, T. y Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6: 335-345.
- Obagwu, J. y Korsten, L.** (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology* 28: 187-194.
- Oh, I. S., Park, A. R., Bae, M. S., Kwon, S. J., Kim, Y. S., Lee, J. E., Kang, N. Y., Lee, S., Cheong, H., Park, O. K.** (2005). Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* 17: 2832-2847.
- Ohme-Takagi, M. y Shinshi, H.** (1990). Structure and expression of a tobacco β -1,3-glucanase gene. *Plant Molecular Biology* 15: 941-946.
- Ohme-Takagi, M. y Shinshi, H.** (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173-182.
- Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A. y Del Río, J. A.** (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry* 98: 351-358.
- Ortuño, A., Botía, J. M., Fuster, M. D., Porras, I., García-Lidón, A. y Del Río, J. A.** (1997). Effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (7): 2740-2743.
- Palou, L., Smilanick, J. L., Usall, J., Viñas, I.** (2001). Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease* 85: 371-376.

- Pavoncello, D., Lurie, S., Droby, S., Porat, R.** (2001). A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiologia Plantarum* 111: 17-22.
- Pedras, M. S., Okanga, F. I., Zaharia, I. L., Khan, A. Q.** (2000). Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53: 161-176.
- Pelser, P. D. T. y Eckert, J. W.** (1977). Constituents of orange juice that stimulate germination of conidia of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 67: 747-754.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., Samblanx, G. W. D., Buchala, A., Metraux, J. P., Manners, J. M., Broekaert, W. F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Perucho, R. y Tuset, J. J.** (2002). Hongos causantes del podrido en clementinas y mandarinas en post-cosecha. *Levante Agrícola* 355: 101-106.
- 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: 1111-1120.
- Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., Holden, J. M.** (2006). Flavonones in grapefruits, lemons and limes: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 74-80.
- Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J. L., Lamarca, N., Viñas, I.** (2004). Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection* 67: 781-786.
- Poppe, L., Vanhoutte, S., Höfte, M.** (2003). Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology* 109: 963-973.
- Porat, R., McCollum, T. G., Vinokur, V., Droby, S.** (2002). Effects of various elicitors on the transcription of a β -1,3-endoglucanase gene in citrus fruit. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 150: 70-75.
- Porat, R., Vinokur, V., Holland, D., McCollum, T. G., Droby, S.** (2001). Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. *Journal of Plant Physiology* 158: 1585-1590.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R., Droby, S.** (1999). Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15: 155-163.

- Porta, H. y Rocha-Sosa, M.** (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*. 130: 15-21.
- Pozo, M. J., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J.** (2004). Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 211-222.
- Purvis, A. C. y Barmore, C. R.** (1981). Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus fruits. *Plant Physiology*. 68: 854-856.
- Rajko, R. y Heberger, K.** (2001). Conditional Fisher's exact test as a selection criterion for pair-correlation method. Type I and type II errors. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 57: 1-14.
- Ramonell, K. M. y Somerville, S.** (2002). The genomics parade of defense responses: to infinity and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 291-294.
- Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D., Douce, R.** (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7805-7812.
- Reymond, P. y Farmer, E. E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 404-411.
- Rezzonico, E., Flury, N., Meins, F., Jr., Beffa, R.** (1998). Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related β -1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiology*. 117: 585-592.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., Jones, J. D.** (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 372-379.
- Robinette, D. y Matthyse, A. G.** (1990). Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology* 172: 5742-5749.
- Rodov, V., Ben Yehoshua, S., Fang, D. G., Kim, J. J., Ashkenazi, R.** (1995). Preformed antifungal compounds of lemon-fruit: citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (4): 1057-1061.
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Kim, J. J., Shapiro, B., Ittah, Y.** (1992). Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117: 788-792.
- Rojo, E., Solano, R., Sánchez-Serrano, J. J.** (2003). Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 82-98.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A. G., Sanz, C., Stormann, K., Rosahl, S., Sánchez-Serrano, J. J.** (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry* 271: 21012-21019.

- Rueffer, M. y Zenk, M. H.** (1987). Distant precursors of benzyloquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 42: 319-332.
- Ryan, C. A.** (2000). The systemic signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Acta Biochimica Biophysica Sinica* 1477: 112-121.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M. et al.** (2003). TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34: 374-+.
- Sala, J. M. y Lafuente, M. T.** (2004). Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharvest Biology and Technology* 31: 277-285.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York.
- Sánchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M. J., Rodrigo, M. J., Granell, A., Zacarías, L., Lafuente, M. T.** (2006). Characterization of a β -1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology* 40: 133-140.
- Sánchez-Torres, P. y González-Candelas, L.** (2003). Isolation and characterization of genes differentially expressed during the interaction between apple fruit and *Penicillium expansum*. *Molecular Plant Pathology* 4: 447-457.
- Schafer, W.** (1994). Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annual Review of Phytopathology* 32: 461-477.
- Scheideler, M., Schlaich, N. L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N. C., Vingron, M., Slusarenko, A. J., Hoheisel, J. D.** (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 10555-10561.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O.** (1995). Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11655-11660.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., Fallik, E.** (2000). Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology* 21: 71-85.
- Schmeller, T., Latz-Bruning, B., Wink, M.** (1997). Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44: 257-266.

- Schuler, M., Duan, H., Bilgin, M., Ali, S.** (2006). Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews* 5: 205-237.
- Seo, M. y Koshiba, T.** (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7: 41-48.
- Shadle, G. L., Wesley, S. V., Korth, K. L., Chen, F., Lamb, C., Dixon, R. A.** (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64: 153-161.
- Silverstein, K. A. T., Graham, M. A., Paape, T. D., VandenBosch, K. A.** (2005). Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 138: 600-610.
- Simons, V., Morrissey, J. P., Latijnhouwers, M., Csukai, M., Cleaver, A., Yarrow, C., Osbourn, A.** (2006). Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2732-2740.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Henson, D. J.** (1995). Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Disease* 79: 742-747.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I. F.** (1999). Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83: 139-145.
- Smith, C. J.** (1996). Accumulation of phytoalexins: Defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist* 132: 1-45.
- Stewart, I.** (1985). Identification of caffeine in citrus flowers and leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 1163-1165.
- Stewart, I. y Whitaker, BD.** (1972). Carotenoids in *Citrus* - Their accumulation induced by ethylene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20: 448-&.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15: 317-330.
- Tarchevsky, I. A.** (2001). Pathogen-induced plant proteins (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37: 441-455.
- Thatcher, L. F., Anderson, J. P., Singh, K. B.** (2005). Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? *Functional Plant Biology* 32: 1-19.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A.** (2000). Disease development of several fungi on Arabidopsis can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 421-427.

- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Tierens, K. F. M. J., Broekaert, W. F.** (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 121: 1093-1101.
- Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A.** (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* 13: 63-68.
- Thomma, B., Cammue, B., Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.
- Timmer, L. W. y Fucik, J. E.** (1975). Effect of rainfall, drainage, tree spacing, and fungicide application on incidence of citrus brown rot. *Phytopathology* 65: 241-242.
- Ton, J. y Mauch-Mani, B.** (2004). β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal* 38: 119-130.
- Torres, M. A., Jones, J. D., Dangl, J. L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*. 141: 373-378.
- Tsukuda, S., Gomi, K., Yamamoto, H., Akimitsu, K.** (2006). Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in citrus jambhiri lush. *Plant Molecular Biology* 60: 125-136.
- Tuset, J. J.** (1987). Podredumbres de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Consellería de Agricultura y Pesca de la Generalitat Valenciana.
- Tuset, J. J.** (1999). Perspectivas del control de las podredumbres en la Postcosecha de cítricos. *Levante Agrícola*. Nº348. Especial Postcosecha: 272-280.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., Chu, G.** (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5116-5121.
- Usall, J., Pons, J., Palou, L., Viñas, I., Smilanick, J. L.** (1999). Alternativas a los productos químicos de síntesis en post-cosecha de cítricos en España y EEUU. *Phytoma* 110: 58-64.
- Van Loon, L. C., Geraats, B. P. J., Linthorst, H. J.** (2006a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11: 184-191.
- Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J.** (2006b). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Vance, C. P., Kirk, T. K., Sherwood, R. T.** (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-288.

- VanderMolen, G. E., Labavitch, J. M., Strand, L. L., DeVay, J. E.** (1983). Pathogen-induced vascular gels: Ethylene as a host intermediate. *Physiologia Plantarum* 59: 573-580.
- Vaquerizas, J. M., Dopazo, J., Díaz-Uriarte, R.** (2004). DNMA: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 20: 3656-3658.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., Hamberg, M., Castresana, C.** (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* 19: 831-846.
- Walters, D. R. y McRoberts, N.** (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* 11: 581-586.
- Wang, K. L. C., Li, H., Ecker, J. R.** (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: S131-S151.
- Ward, E. W. B., Cahill, D. M., Bhattacharyya, M. K.** (1989). Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Plant Physiology*. 91: 23-27.
- Wei, C. M., Li, J. N., Bumgarner, R. E.** (2004). Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics* 5. 87
- Williamson, C. E.** (1950). Ethylene, a metabolic product of diseased or injured plants. *Phytopathology* 40: 32.
- Wink, M.** (1998). Modes of action of alkaloids. *En: Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Roberts, M. F. y Wink, M., eds. New York, pp 301-325.
- Woeste, K. E., Ye, C., Kieber, J. J.** (1999). Two Arabidopsis mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiology*. 119: 521-530.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681-692.
- Wong, W. S., Ning, W., Xu, P. L., Kung, S. D., Yang, S. F., Li, N.** (1999). Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit. *Plant Molecular Biology* 41: 587-600.
- Yamamoto, K. y Sasaki, T.** (1997). Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Molecular Biology* 35: 135-144.
- Yang, Y. H. y Speed, T.** (2002). Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature Reviews Genetics* 3: 579-588.
- Yao, C. L., Conway, W. S., Sams, C. E.** (1995). Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathology* 85: 1373-1377.

- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K.-S., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X. et al.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Yuan, Q. P., Quackenbush, J., Sultana, R., Perte, M., Salzberg, S. L., Buell, C. R.** (2001). Rice bioinformatics. Analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. *Plant Physiology* 125: 1166-1174.
- Zacarias, L., Lafuente, M. T., Marcos, J. F., Saladie, M., Dupille, E.** (2003). Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive 'Fortune' mandarin fruit. En: *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene*. Vendrell, M., Klee, H.J., Pech, J.C., Romojaro, F., eds. IOS Press, Amsterdam: 112-117.
- Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R.** (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.
- Zhao, J., Zheng, S. H., Fujita, K., Sakai, K.** (2004). Jasmonate and ethylene signalling and their interaction are integral parts of the elicitor signalling pathway leading to β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 55: 1003-1012.
- Zhu, J. K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.
- Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., Siebert, P. D.** (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* 30: 892-897.
- Ziegler, J. y Facchini, P. J.** (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59: 735-769.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*. 136: 2621-2632.

